**1905**



**КазНИВИ**

# Министерство сельского хозяйства Республики Казахстан

**ТОО «Казахский научно-исследовательский ветеринарный институт»**

**МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

**ПО ДЕТЕКЦИИ БРУЦЕЛЛ ВИДОВ ABORTUS И MELITENSIS В РАЗЛИЧНОМ БИОЛОГИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ С ПОМОЩЬЮ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ**

**Алматы 2017**

УДК 616.981.42-022.39.

Методические рекомендации по детекции бруцелл видов abortus и melitensis в различном биологическом материале с помощью полимеразной цепной реакции, Алматы, 2017.- 10 с.

Авторы: Барамова Ш.А., Даугалиева А.Т., Адамбаева А.А., Түсіпқанұлы О., Усербаев Б.С.

Методические рекомендации предназначены для работников научно- исследовательских и практических учреждений, занимающихся вопросами идентификации микроорганизмов, а также могут представлять интерес для студентов, магистрантов и докторантов высших учебных заведений.

Методические рекомендации утверждены на заседании Ученого совета ТОО «КазНИВИ» (протокол № 4 от 20.06. 2017 года).

В рамках научно-технической программы «Научное обеспечение ветеринарного благополучия» по бюджетной программе 249 «Разработка и усовершенствование средств и методов диагностики, профилактики и лечения инфекционных, паразитарных и незаразных болезней животных**»**

Адрес: 050016, г. Алматы, пр. Райымбека, 223, тел. 8-(727)-233-72-71, е. mail: kazalmaty@mail.ru

|  |  |
| --- | --- |
| **СОДЕРЖАНИЕ** | **стр.** |
| Введение…………………………………………………………………… | 4 |
| 1. Принцип метода ……………………………………………………….. | 4 |
| 2. Отбор и подготовка материала для исследования………………... | 5 |
| 3. Лабораторное оборудование…………………………………………. | 6 |
| 4. Химические реактивы………………………………………………. | 7 |
| 5. Выделение ДНК из проб…………………………………………….. | 7 |
| 6. Проведение ПЦР…………………………………………………….. | 8 |
| 7. Гель-электрофорез продукта ПЦР………………………………… | 9 |
| 8. Учет и интерпретация результатов……………………………….. | 10 |
| 9. Заключение | 10 |

# Введение

Сохраняющаяся высокая заболеваемость бруцеллезом людей и животных оставляет актуальным вопрос о ранней и эффективной диагностике этого заболевания. Существующие методы либо длительны и многоэтапны (бактериологический), либо не исключают перекрестных ложноположительных результатов с представителями других таксонов бактерий, имеющих антигенное сходство с бруцеллами (комплекс иммунологических тестов).

Перспективным подходом к решению этого вопроса в лабораторной диагностике является использование полимеразной цепной реакции (ПЦР), превосходящей на несколько порядков по чувствительности и специфичности традиционные иммунологические тесты и позволяющей работать с исследуемым материалом без выделения чистой культуры. Данный метод дает возможность обнаруживать единичные клетки бруцелл в различном биологическом материале: крови, молоке, моче, гистологическом материале, объектах окружающей среды в ранние - от 4 до 6 часов - сроки, высокоспецифичен и максимально адаптирован к существующей лабораторной базе.

# Принцип метода

В основе метода лежит многократное повторение циклов денатурации ДНК в исследуемой пробе, отжига специфических олигонуклеотидных затравок (праймеров) и синтеза комплементарных цепей ДНК с помощью фермента. Полимеразная цепная реакция открывает возможность многократно амплифицировать (синтезировать) в пробирке участок хромосомной ДНК бруцелл размером 102 пар нуклеотидов для B. abortus и

65 пар нуклеотидов для B. melitensis. Праймеры были разработаны для бактериального ABC транспортера АТФ-связывающего белка вида B. abortus и сульфата ABC транспортера пермеазы белковых генов *CysW* вида B. melitensis. Фрагмент, специфичный только для микроорганизмов рода Brucella видов abortus и melitensis, ограничен парой олигонуклеотидных праймеров, с которых термостабильная ДНК-полимераза осуществляет синтез этого участка ДНК в присутствии 4-дезоксинуклеозидтрифосфатов (dNTP) и солевого буфера, содержащего ионы магния (Mg) 2+ и бычий сывороточный альбумин (BSA).

Синтез возможен только тогда, когда вносимая ДНК, выделенная из исследуемой пробы, окажется идентичной (комплементарной) праймерам, в противном случае амплификации не будет. Результат амплификации легко визуализируется, например, методом электрофореза в агарозном геле.

ПЦР состоит из цикла повторяющихся температурных режимов: 1-ый этап

95 °С - 3 мин. - денатурация (расхождение) двойной цепи исследуемой ДНК до двух одиночных – 1 цикл;

2-ой этап- 30 циклов.

63 °С - 40 сек. - присоединение ("отжиг") праймеров к идентичным участкам на одиночных цепях исследуемой ДНК и синтез специфичного участка ДНК, Tag-полимеразой, путем удлинения праймеров;

95 °С - 15 сек. - денатурация (расхождение) двойной цепи исследуемой ДНК.

За каждый такой цикл происходит удвоение числа копий этого участка ДНК, что можно выразить как 2 n, где n - количество циклов амплификации. Таким образом, за 30 циклов амплифицируется фрагмент ДНК, в достаточном количестве для обнаружения его методом гель- электрофореза.

В целом же вся процедура ПЦР-диагностики состоит из 3 этапов:

1. Выделение ДНК из исследуемого материала
2. ПЦР
3. Учет результатов ПЦР.

# Отбор и подготовка материала для исследования

Тест-система предназначена для выявления ДНК возбудителей бруцеллеза (микроорганизмов рода Brucella) видов abortus и melitensis в биологическом материале и в культуре бактерии методом полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Материал от каждого животного отбирают отдельным инструментом. Для исследования используют следующий клинический материал:

-содержимое брюшной полости и желудка, селезенка, печень абортированного плода;

-плацента и плодовые оболочки от абортировавших животных;

-содержимое бурс, гигром;

-кровь и молоко от абортировавших животных и (или) от животных, в сыворотке которых обнаружены агглютинины и (или) комплементсвязывающие антитела.

Отбор материала для исследования.

Жидкости (кроме крови) для исследования отбирают в объеме 10-20 мл, из тканей и органов вырезают кусочки размером 1х1х1 см (толщина кусочков может быть меньше). Лимфоузлы берут целиком.

В случае убоя животных для исследования отбирают парные лимфатические узлы с обеих сторон туши целиком (парааортальные, надвыменные, паховые, тазовые) и кусочки паренхиматозных органов (печень, селезенка).

Материал доставляют в лабораторию в день взятия или на следующий день, сохраняя при температуре от 2 до 8 °С. Допускается хранение материала при температуре не выше минус 16 °С в течение 30 дней (кроме крови).

Цельную кровь в объеме 5-10 мл берут в пробирки с предварительно добавленным антикоагулянтом (3% раствор ЭДТА из расчета 10:1).

Пробы исследуемых жидкостей, кроме крови, в объеме 10 мл (при необходимости объем проб доводят до требуемого путем добавления

физиологического раствора), центрифугируют при 3 тыс об/мин в течение 10-15 мин. Если осадок практически не виден, то в эту же пробирку вносят еще 10 мл материала и повторяют центрифугирование. Надосадочную жидкость осторожно отбирают, оставив над осадком примерно 0,2 мл жидкости. Осадок ресуспендируют в оставшейся надосадочной жидкости и 100 мкл суспензии используют для выделения ДНК.

Пробы цельной крови, консервированной ЭДТА, синовиальной жидкости, пунктаты лимфоузлов, содержимое бурс и гигром, культуры микроорганизмов используют для выделения ДНК без предварительной подготовки.

Пробы паренхиматозных органов, семенников, плодовых оболочек, плаценты (каждую отдельно) размером 1х1х1 см, а лимфотические узлы целиком, тщательно растирают в отдельных фарфоровых ступках с пестиками или в стеклянных гомогенизаторах, добавляют 1 мл стерильного физиологического раствора (примерно равный объем) и тщательно перемешивают. Смесь отстаивают при комнатной температуре в течение 30 мин, затем верхнюю фазу переносят в пробирки вместимостью 1,5 мл и 100 мкл ее используют для выделения ДНК.

# Лабораторное оборудование

* 1. Ламинарный бокс 2-го класса биологической безопасности
	2. Твердотельный термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 ° С
	3. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости
	4. Микроцентрифуга для микропробирок типа «Эппендорф» на 12000 - 14000 об./мин.
	5. Вортекс
	6. Набор механических дозаторов переменного объема
	7. Одноразовые наконечники с фильтром на 10 мкл
	8. Одноразовые наконечники с фильтром на 20 мкл
	9. Одноразовые наконечники с фильтром на 300 мкл
	10. Одноразовые наконечники с фильтром на 1000 мкл
	11. Одноразовые наконечники на 10 мкл
	12. Одноразовые наконечники на 200 мкл
	13. Пластиковые микропробирки объемом 0,2 мл
	14. Пластиковые микропробирки объемом 1,5 мл
	15. Штативы для микропробирок объемом 1,5 мл
	16. Штативы для микропробирок объемом 0,2 мл
	17. Холодильник от 2 до 8 ° С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 ° С
	18. Емкость с дезинфицирующим раствором
	19. Отдельный халат и одноразовые перчатки для каждой зоны
	20. ДНК-амплификатор
	21. ПЦР – бокс
	22. Аквадистиллятор
	23. Аппарат для горизонтального гель-электрофореза
	24. Источник напряжения постоянного тока
	25. УФ-трансиллюминатор
	26. Видеосистема с цифровой видеокамерой для регистрации результатов и передачи изображения
	27. Микроволновая печь для плавления агарозы
	28. Колба коническая из термостойкого стекла для плавления агарозы на 250 мл
	29. Мерный цилиндр на 1 л
	30. Пластиковая емкость на 5 л для дезактивации буфера и гелей, содержащих бромид этидия.

# Химические реактивы

96% этанол

Агароза (желательно использовать агарозу с низким электроэндоосмосом и высокой плотностью геля, например, фирмы SIGMA type 1 или 2)

Бромистый этидий

Растворы для выделения ДНК из проб входят в комплект реагентов

«ДНК-сорб-В».

Компоненты для проведения ПЦР и гель-электрофореза

1. Солевой ПЦР-буфер для проведения амплификации 10х:100 мМ Трис HCl, pH 8,5 при 37 °С 100 мМ MgCl21000 мМ KCl
2. Дистиллированная или деионизированная вода
3. Олигонуклеотидные праймеры: На вид abortus:

Ba прямой 5´TCCAATAATGGCGCTGTGCAAGA3´

Ba-r обратный 5´TCGAGCCAGGCTGTGGTTTCC3´ На вид melitensis:

Bm прямой 5´- TCCAAACGCTTTCCCGGACGA- 3´

Bm-r обратный 5´- GGCGAAACGGAAAAAGGTATCTCCAC- 3´

# Выделение ДНК из проб

* 1. Отбирают необходимое количество одноразовых пробирок, включая отрицательный и положительный контроли выделения. Вносят в каждую пробирку по 10 мкл внутреннего контрольного образца (ВКО) и по 300 мкл лизирующего раствора.
	2. В пробирки с лизирующим раствором и ВКО вносят по 100 мкл проб, используя наконечники с аэрозольным барьером. В пробирку отрицательного контроля выделения (ОК) вносят 100 мкл отрицательного контрольного образца (ОКО).
	3. Пробы перемешивают на вортексе и прогревают 5 мин при 65 ˚С. Процентрифугировать 5 сек при 5 тыс. об/мин. Если проба растворяется не полностью, процентрифугировать пробирку 5 мин при максимальных оборотах и использовать для выделения ДНК надосадочную жидкость, перенося ее наконечником в новую пробирку.
	4. Ресуспендировать сорбент универсальный на вортексе. В каждую пробирку отдельным наконечником добавить по 25 мкл ресуспендированного сорбента универсального. Перемешать на вортексе, поставить в штативе на 2 мин, еще раз перемешать и отстаивать в штативе на 5 мин.
	5. Осадить сорбент универсальный в пробирках центрифугированием при 5 тыс об/мин 30 с. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
	6. Добавить в пробы по 300 мкл раствора для отмывки 1, перемешать на вортексе до ресуспендирования сорбента универсального, осадить сорбент универсальный центрифугированием при 5 тыс об/мин на микроцентрифуге в течение 30 с и удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
	7. Добавить в пробы по 500 мкл раствора для отмывки 2, перемешать на вортексе до ресуспендирования сорбента универсального, процентрифугировать 30 с при 10 тыс об/мин на мироцентрифуге, удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
	8. Повторить процедуру отмывки раствором для отмывки 2, удалить надосадочную жидкость полностью.
	9. В пробирки добавить по 50 мкл ТЕ-буфера для элюции ДНК. Перемешать на вортексе. Поместить в термостат при температуре 65 оС на 5 минут, периодически встряхивая на вортексе.
	10. Процентрифугировать пробирки на максимальных оборотах микроцентрифуги в течение 1 мин. Перелейте супернатант в новую, стерильную микроцентрифужную пробирку. Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК.

Выделенные препараты ДНК можно хранить в условиях холодильника в течение недели и в течение 1 года при температуре не выше минус 16° С.

# Проведение ПЦР

ПЦР проводят только в одноразовых микропробирках с использованием одноразовых наконечников для внесения всех компонентов амплификационной смеси.

Подготавливают и пронумеровывают пробирки на 0.2 мл по числу исследуемых проб, плюс пробирки для положительного и отрицательного контролей.

На одну пробу готовят амплификационную смесь объемом 25 мкл следующего состава:

1. 2,5-кратная полностью готовая реакционная смесь, содержащая ПЦР- буфер; дезоксинуклеозидтрифосфаты, МgCl2 и Taq ДНК-полимеразу - 10 мкл
2. 10 pmol (пикомоля) прямого праймера-0,5 мкл
3. 10 pmol (пикомоля) обратного праймера-0,5 мкл
4. исследуемой пробы - 1 мкл
5. дистиллированной воды до 25 мкл

Исследуемую пробу всегда вносят в последнюю очередь, после чего всю смесь перемешивают пипетированием. В качестве положительного контроля используют клонированная ДНК референтных штамов B. melitensis и B. abortus, в отрицательном контроле используется дистиллированная вода вместо анализируемой пробы.

Пробирки закрывают и помещают в амплификатор со следующей температурно-временной программой:

1-ый этап

94 °С - 3 мин. – 1 цикл 2-ой этап

63 °С - 40 сек.

95 °С - 15 сек.

Количество циклов 2-го этапа 30. За это время в каждом цикле происходит удвоение числа копий ограниченного праймерами участка хромосомной ДНК, причем, каждая вновь синтезируемая цепь становится матрицей для присоединения праймеров и снова амплифицируется, что позволяет за 30 циклов синтезировать фрагмент ДНК в количестве достаточном для обнаружения его с помощью электрофореза в агарозном геле.

Примечания. 1. Солевой ПЦР-буфер, раствор dNTP, МgCl2, праймеры, Tag- ДНК-полимеразу обязательно хранят в морозильнике и размораживают (кроме Tag-ДНК-полимеразы) перед приготовлением амплификационной смеси.

2. Амплификационную смесь, состоящую из ПЦР-буфера, dNTP, МgCl2, Tag- ДНК-полимеразы и воды можно приготовить заранее в достаточных количествах и заморозить небольшими аликвотами.

# Гель-электрофорез продукта ПЦР

После завершения программы амплификации, пробы смешивают с 2,5 мкл раствором для нанесения проб и помещают в лунки горизонтального 2 % агарозного геля, содержащего 0,5 мкг/мл бромистого этидия. Электрофорез проводят в 1х ТВЕ-буфере в присутствии бромистого этидия в концентрации 0,5 мкг/мл, при напряжении 30 В/см в течение 25 мин., не допуская выхода красителя бромфенолового синего из геля.

Гель просматривают в Уф-свете и результат фоторегистрируют.

Примечание. Бромистый этидий является сильным мутагеном, поэтому все работы, связанные с перемещением агарозного геля, проводите в перчатках.

Дезактивация буфера и гелей.

Отработанные гели и буфер из камеры помещают в пластиковую емкость на 5 л. Добавляют 1 объем 0,5 М раствора калия перманганата и затем 1 объем 2,5 М соляной кислоты. Перемешивают и оставляют при комнатной температуре на 4-6 ч. Добавляют 1 объем 2,5 М натрия гидроксида, перемешивают. Сбрасывают нейтрализированные реактивы в канализацию.

# Учет и интерпретация результатов

Амплифицированные фрагменты идентифицируют по размеру, сравнивая флюоресцирующие в геле полосы анализируемых проб, с полосой положительного контроля. Положительными могут считаться только те пробы, амплифицированные фрагменты которых (флюоресцирующие полоски в геле) находятся строго на уровне фрагмента положительного контроля. Если в дорожках, соответствующих отрицательным контролям, выявляется специфическая полоса, значит, произошла контаминация реактивов или проб. В этом случае результаты анализа считают недействительными.

Данный метод детекции бруцелл, с используемыми праймерами и представленными температурно-временными параметрами, позволяет обнаруживать единичные клетки в пробе за 30 циклов амплификации у представителей рода Brucella, что выражается флюоресцирующей полосой в геле агарозы, размером 102 пары нуклеотидов у вида abortus и 65 пар нуклеотидов у вида melitensis.

# Заключение

ПЦР анализ с разработанными праймерами, может быть эффективным методом диагностики для идентификации и дифференциации *B. abortus* и *B. melitensis* у естественно зараженных животных в полевых условиях. Данный метод является быстрым и экономически эффективным диагностическим инструментом, для контроля и надзора вспышек бруцеллеза, борьбы с бруцеллезом животных и, следовательно, с бруцеллезом людей.