

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель Министра –

Главный государственный  
санитарный врач  
Республики Беларусь

А.А.Тарасенко

2022 г.

Регистрационный № 039-0622



МЕТОД ВЫЯВЛЕНИЯ РНК/ДНК ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ЛИХОРАДОК  
ЗАПАДНОГО НИЛА, ДЕНГЕ, ЗИКА,  
КОКСИЕЛЛЁЗА, ДИРОФИЛЯРИОЗА,  
ИНФЕКЦИИ, ВЫЗЫВАЕМОЙ БОРРЕЛИЕЙ МИЯМОТО, В  
БИОЛОГИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ  
инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

государственное учреждение «Республиканский научно-  
практический центр эпидемиологии и микробиологии»

АВТОРЫ:

канд. мед. наук, доц. Красько А.Г., Климович О.В., Семенов С.Ф.,  
Лютина Я.В., Залевская О.С.

Минск, 2022

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель Министра –

Главный государственный  
санитарный врач

Республики Беларусь

\_\_\_\_\_ А.А.Тарасенко

26.08.2022

Регистрационный № 039-0622

МЕТОД ВЫЯВЛЕНИЯ РНК/ДНК ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ЛИХОРАДОК  
ЗАПАДНОГО НИЛА, ДЕНГЕ, ЗИКА,  
КОКСИЕЛЛЁЗА, ДИРОФИЛЯРИОЗА,  
ИНФЕКЦИИ, ВЫЗЫВАЕМОЙ БОРРЕЛИЕЙ МИЯМОТО, В  
БИОЛОГИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ  
инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

государственное учреждение «Республиканский научно-  
практический центр эпидемиологии и микробиологии»

АВТОРЫ:

канд. мед. наук, доц. Красько А.Г., Климович О.В., Семенов С.Ф.,  
Лютина Я.В., Залевская О.С.

Минск, 2022

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен метод выявления РНК/ДНК возбудителей лихорадок Западного Нила, Денге, Зика, коксиеллёза, дирофиляриоза, инфекции, вызываемой боррелией Миямото, в биологическом материале с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР) с амплификацией диагностически значимых участков геномов в режиме реального времени.

Инструкция предназначена для учреждений здравоохранения, осуществляющих надзор за природно-очаговыми инфекциями и оказывающих медицинскую помощь пациентам с инфекционными заболеваниями.

## **ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ**

### **1 Показания к применению**

Инструкция может быть применена в комплексе мероприятий по организации и проведению эпидемиологического слежения за возбудителями клещевых и комариных инфекций и в организации медицинской помощи населению.

### **2 Противопоказания к применению**

Отсутствие условий для работы с возбудителями 1 – 3 групп биологического риска.

### 3 Перечень необходимых изделий медицинской техники, изделий медицинского назначения, реактивов

Таблица 1 – Изделия медицинской техники для проведения молекулярно-генетического анализа

<i>Пробоподготовка и выделение ДНК/РНК</i>
ПЦР-бокс с УФ-рециркулятором воздуха
Микроцентрифуга высокоскоростная (с ротором для 1,5 мл пробирок типа «Эппендорф», 10000-18000xg)
Твердотельный термостат (диапазон температур от –10 до +99°C)
Микроцентрифуга-вортекс
Аспиратор с колбой-ловушкой
Дозаторы пипеточные механические переменного объема, комплект (2 – 20 мкл; 20 – 200 мкл; 100 – 1000 мкл)
Холодильник (диапазон рабочих температур от +2 до +4°C)
Морозильная камера (диапазон рабочих температур от –16 до –18°C)
Весы лабораторные электронные (диапазон от 0,01 г до 210 г)
<i>Проведение ПЦР</i>
Амплификатор (термоциклер) с оптическим модулем
ПЦР-бокс с УФ-рециркулятором воздуха
Микроцентрифуга-вортекс
Твердотельный термостат (диапазон температур от –10 до +99°C)
Дозаторы пипеточные механические переменного объема, комплект (2 – 20 мкл; 20 – 200 мкл; 100 – 1000 мкл)
Холодильник (диапазон рабочих температур от +2 до +4°C)
Морозильная камера (диапазон рабочих температур от –16 до –18°C)
<i>Проведение электрофоретической детекции</i>
Микроцентрифуга-вортекс
Дозаторы пипеточные механические переменного объема, комплект (2 – 20 мкл; 20 – 200 мкл; 100 – 1000 мкл)
Холодильник (диапазон рабочих температур от +2 до +4°C)
Морозильная камера (диапазон рабочих температур от –16 до –18°C)
Система для проведения гель-электрофореза с набором модулей (включая источник питания) и аксессуаров
УФ-трансиллюминатор
Видеосистема для документации результатов гель-электрофореза с компьютером

Таблица 2 – Реактивы, используемые при проведении исследований

<i>Пробоподготовка и выделение ДНК/РНК</i>
Хлорид натрия (NaCl)
Спирт этиловый ректификованный
Фосфатный буферный раствор
Перекись водорода
Реагент «Муколизин»
Набор реагентов для выделения ДНК/РНК из проб биологического материала
Набор реагентов для получения кДНК на матрице РНК
<i>Проведение ПЦР</i>
ПЦР-буфер
ДНК-полимераза
Смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (дНТФ)
Олигонуклеотиды синтетические (праймеры и зонды)
Хлорид магния
Вода для молекулярной биологии (свободная от РНКаз/ДНКаз)
<i>Проведение электрофоретической детекции</i>
Агароза
Бромистый этидий
Буфер для электрофореза 10х ТБЭ или 50х ТАЭ
Маркер молекулярных масс (от 50 п.о., 100 п.о.)
Набор реагентов для горизонтального электрофореза в агарозном геле

Таблица 3 – Изделия медицинского назначения

Герметичные пробирки с крышками на 1,5 мл и 15 мл для забора биопроб и вакутайнеры с ЭДТА с переходником для забора крови
Пробирки типа «эппендорф», пластиковые контейнеры для сбора клещей
Транспортировочные контейнеры для упаковки и транспортировки проб в соответствии с условиями работы с патогенными биологическими агентами (ПБА) 3 группы биологического риска
ПЦР-пробирки/8-луночные стрипы/96-луночные планшеты объемом 0,2 мл с маркировкой «RNAse, DNAse free» (соответствующие типу используемого амплификатора для ПЦР в режиме реального времени)
Наконечники с аэрозольным барьером в штативах, стерильные, с маркировкой «RNAse, DNAse free» объемом 20, 200, 1000 мкл
Наконечники без фильтра 20, 200, 1000 мкл
Халаты, резиновые перчатки, штативы для пробирок

## 4 Технология осуществления метода

### 4.1 Сбор, доставка и хранение клинического и природного материала

Забор, упаковку и транспортирование материала для исследования осуществляют в строгом соответствии с санитарными нормами и правилами «Требования безопасности при осуществлении работ с условно-патогенными микроорганизмами и патогенными биологическими агентами, к организации и проведению их учета, хранения, передачи и транспортировки», утвержденными постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 6 января 2017 г. № 2.

Материал для исследования с целью выявления генетического материала возбудителей лихорадок Западного Нила, Денге, Зика, коксиселлёза, диروفилариоза и инфекции, вызываемой боррелией Миямото, представлен в таблице 4.

Таблица 4 – Материал для исследования

Инфекция	Вид исследуемого материала	Правила взятия, подготовка к исследованию методом ПЦР
Лихорадка Западного Нила	Плазма крови, сыворотка крови, спинномозговая жидкость (СМЖ)	Взятие цельной периферической крови проводится утром натощак в пробирку с 6 % раствором ЭДТА из расчета 1:20
	Моча	Первая порция утренней мочи в количестве 15–25 мл в сухой стерильный контейнер объемом 50-60 мл.

Продолжение таблицы 4

	Внутренние органы животных и секционный материал (ткани мозга, печени, селезёнки, лимфоузлов)	В стерильную посуду, соответствующую объёму проб
	Комары	В пробирки с ватно-марлевыми пробками (влажные камеры)
	Клещи	В пробирки с ватно-марлевыми пробками (влажные камеры)
Лихорадка Денге	Плазма крови, сыворотка крови	Взятие цельной периферической крови проводится утром натощак в пробирку с 6 % раствором ЭДТА из расчета 1:20
	Аутопсийный материал (печень, селезенка, легкие, лимфатические узлы, тимус, красный костный мозг)	В стерильную посуду, соответствующую объёму проб
	Комары	В пробирки с ватно-марлевыми пробками (влажные камеры)
Лихорадка Зика	Плазма крови	Взятие цельной периферической крови проводится утром натощак в пробирку с 6 % раствором ЭДТА из расчета 1:20
	Моча	Первая порция утренней мочи в количестве 15–25 мл в сухой стерильный контейнер объемом 50-60 мл.

Продолжение таблицы 4

	Тканевой (аутопсийный/биопсийный, плацента) материал	В стерильную посуду, соответствующую объему проб
	Сперма	В специальный сухой стерильный контейнер объемом 50–60 мл
	Амниотическая жидкость	В сухую одноразовую стерильную пробирку объемом 2 мл в количестве не менее 1,0 мл
	Слюна	После трехкратного полоскания полости рта физиологическим раствором слюну забирают в количестве не менее 1,0 мл в одноразовые стерильные пластиковые пробирки объемом 2 мл
	Мазки из ротоглотки	Мазки забирают сухими стерильными ватными тампонами на пластиковой основе вращательными движениями с поверхности миндалин, небных дужек и задней стенки ротоглотки. После взятия материала тампон (рабочую часть зонда с ватным тампоном) помещают в стерильную одноразовую пробирку со специальной транспортной средой.
Коксиеллёз	Кровь, ликвор	Взятие цельной периферической крови проводится утром натощак в пробирку с 6 % раствором ЭДТА из расчета 1:20



Продолжение таблицы 4

	Внутренние органы, плацента и абортный материал от животных, секционный материал, полученный от человека (ткани мозга, сердца, легких, селезенка)	В стерильную посуду, соответствующую объему проб
	Мокрота, промывные воды бронхов	В одноразовые стерильные пластиковые пробирки объемом 2 мл
	Клещи	В пробирки с ватно-марлевыми пробками (влажные камеры)
Дирофиляриоз	Комары	В пробирки с ватно-марлевыми пробками (влажные камеры)
Инфекция, вызываемая боррелией Миямото	Кровь, ликвор	Взятие цельной периферической крови проводится утром натощак в пробирку с 6 % раствором ЭДТА из расчета 1:20
	Внутренние органы животных и секционный материал	В стерильную посуду, соответствующую объему проб
	Клещи	В пробирки с ватно-марлевыми пробками (влажные камеры)

Допускается хранение вышеперечисленного клинического материала до проведения исследования в течение суток при температуре от плюс 2 до плюс 8°C или 1 недели – при температуре не выше минус 16°C. Образцы цельной крови: при температуре от 20°C до 25°C – хранятся в течение 6 часов с момента получения материала; при температуре от 2°C до 8°C – не более одних суток. Недопустимо замораживание образцов цельной крови! Для аутопсийного материала и членистоногих

предусмотрены следующие режимы хранения: ткани внутренних органов и комаров хранят 1 неделю при температуре не выше минус 16°C, далее – при температуре минус 70°C. Клещей хранят или живыми (до 1 мес), или в течение одной недели при температуре не выше минус 16°C, далее – при температуре минус 70°C.

Каждый образец для исключения взаимной контаминации хранят и транспортируют в отдельном полиэтиленовом пакете.

## **4.2 Приготовление образцов для исследования**

### **4.2.1 Предварительная подготовка проб полевого материала**

#### *Подготовка проб комаров*

Для приготовления суспензий комаров используют стерильную фарфоровую чашку и стерильный пестик либо автоматический гомогенизатор. Предварительно формируют пулы комаров (не более 50 особей одного вида, собранных на одной территории). Комаров гомогенизируют в стерильном физиологическом растворе или фосфатном буфере из расчета 1 комар – 30 мкл раствора. Центрифугируют пробы при 10 000 g в течение 1 мин. Затем отбирают 100 мкл надосадочной жидкости для экстракции РНК.

#### *Подготовка проб клещей*

Предварительно формируют пулы клещей: голодных объединяют по 5-7 особей, полунапивавшихся – по 2-3; полностью напивавшихся – по 1. Для приготовления суспензий клещей используют стерильную фарфоровую чашку и стерильный пестик или автоматический гомогенизатор. В случае гомогенизации напивавшихся клещей в ступке их предварительно прокалывают стерильной одноразовой иглой в нескольких местах для выхода крови. Клещей растирают в 700 мкл (если проба состоит из одного ненапивавшегося клеща) или в 1-1,5 мл (если

гомогенизируют пул клещей или напитавшегося клеща) 0,15 М раствора хлорида натрия, смешивая раствор с клещами небольшими объемами, затем полученную суспензию центрифугируют при 10 000 g в течение 1 мин и отбирают 100 мкл надосадочной жидкости для экстракции РНК.

#### *Подготовка суспензии органов животных*

Данный материал гомогенизируют с использованием стерильных фарфоровых ступок и пестиков либо с помощью гомогенизатора, затем готовят 10 % суспензию на стерильном физиологическом растворе или фосфатном буфере. Суспензию центрифугируют в течение 15 мин при 2500 об./мин. Экстракцию РНК проводят из осадка и надосадочной жидкости.

### **4.2.2 Предварительная подготовка проб клинического материала**

#### *Подготовка проб крови*

Закрытую пробирку с цельной периферической кровью несколько раз переворачивают. Плазму крови получают центрифугированием пробирок с цельной кровью при 800 – 1600 g (3000 об/мин) в течение 20 мин при комнатной температуре, либо помещают в холодильник на 1-2 часа для разделения. Затем отбирают плазму в объеме не менее 1 мл отдельными наконечниками с аэрозольным барьером в стерильные пробирки объемом 1,5 мл. Полученный материал используют для выделения РНК/ДНК.

#### *Подготовка проб мочи*

Если нет возможности исследовать материал в течение 1 суток после взятия, моча переносится в центрифужную пробирку на 30 мл или пробирку типа «Эппендорф», затем в нее вносят глицерин, 10 % от объема пробы, перемешивают для равномерного распределения глицерина и

замораживают при минус 20°C для хранения в течение 1 нед или при минус 70°C в течение более длительного времени. При наличии центрифуги с охлаждением до 4°C для пробирок объемом 30 мл и ускорением 8000 g используется следующий алгоритм пробоподготовки. Пробу центрифугируют при 8000-9000 g в течение 10 мин, затем надосадочную жидкость переносят в емкость с дезинфицирующим раствором, а осадок и 1 мл надосадочной жидкости над ним – в пробирку типа «Эппендорф». После чего снова концентрируют пробу при 8000 g в течение 10 мин. 900 мкл надосадочной жидкости переносят в емкость с дезинфицирующим раствором, а осадок и 100 мкл надосадочной жидкости используют для экстракции РНК. В случае наличия большого количества солей, для экстракции РНК в отдельную пробирку типа «Эппендорф» переносят 100 мкл надосадочной жидкости. При отсутствии центрифуги для пробирок объемом 30 мл и ускорением 8000 g, проводят концентрирование только 1 мл мочи как описано выше. Экстракцию РНК проводят из осадка и надосадочной жидкости.

#### *Подготовка проб секционного материала*

Образцы тканевого (аутопсийного/биопсийного, плаценты) материала требуют предварительной подготовки. Для экстракции РНК/ДНК берут 30-50 мг (мкл) материала и гомогенизируют его растиранием с использованием предварительно охлаждённых стерильных фарфоровых ступок и пестиков или с помощью гомогенизатора. Из растёртой ткани готовят 10% суспензию на охлаждённом стерильном физиологическом растворе или фосфатном буфере. Центрифугируют пробы при 10 000 g (например, 12 000 об/мин для микроцентрифуги типа «Эппендорф») в течение 1 мин. 50 мкл полученной осветленной суспензии используют для экстракции РНК/ДНК.

### *Подготовка образцов спермы*

В пробирки объемом 1,5 мл отобрать по 100 мкл спермы. Добавить в пробирки со спермой по 900 мкл реагента «МУКОЛИЗИН». Образцы тщательно перемешать на вортексе и инкубировать при комнатной температуре (от 18 до 25 оС) в течение 10 минут, тщательно перемешивая на вортексе каждые 2-3 минуты. Для экстракции нуклеиновых кислот используют 50 мкл пробоподготовленной спермы.

### *Подготовка проб амниотической жидкости*

Перед экстракцией нуклеиновых кислот необходимо провести разжижение амниотической жидкости, используя реагент «МУКОЛИЗИН» в соотношении 1:3 (1 часть амниотической жидкости к 3 частям «МУКОЛИЗИНА»), ориентируясь по градуировке емкости. В процессе разжижения (10 минут) емкость периодически встряхивают на вортексе. Для экстракции РНК используют 50 мкл разжиженной амниотической жидкости.

### *Подготовка проб слюны*

Перед экстракцией нуклеиновых кислот необходимо провести разжижение слюны, используя реагент «МУКОЛИЗИН». В емкость со слюной добавляют «МУКОЛИЗИН» в соотношении 1:3 (1 часть слюны к 3 частям «МУКОЛИЗИНА»), ориентируясь по градуировке емкости. В случае, если слюна очень густая, проводят ее разжижение реагентом «МУКОЛИЗИН» в соотношении 1:5. В процессе разжижения слюны (10 минут) емкость периодически встряхивают на вортексе. Для экстракции РНК используют 100 мкл разжиженной слюны.

### *Мазки из ротоглотки*

Мазки из ротоглотки не требуют предварительной подготовки.

#### **4.2.3 Экстракция РНК/ДНК**

Выделение РНК/ДНК возбудителей лихорадок Западного Нила, Денге, Зика, коксииеллёза, диофиляриоза и инфекции, вызываемой боррелией Миямото, проводят с использованием готовых коммерческих наборов согласно прилагаемой инструкции. Для этих целей может быть использован любой набор реагентов, зарегистрированный в установленном порядке на территории Республики Беларусь.

#### **4.2.4 Реакция обратной транскрипции**

Реакция обратной транскрипции проводят с использованием готовых коммерческих наборов согласно прилагаемой инструкции. Для этих целей может быть использован любой набор реагентов, зарегистрированный в установленном порядке на территории Республики Беларусь.

#### **4.2.5 Диагностическая амплификация в режиме реального времени**

##### **4.2.5.1 Диагностическая амплификация участков генов неструктурных белков вирусов Западного Нила, Денге, Зика**

Для выявления РНК возбудителей лихорадок Западного Нила, Денге, Зика предложено использовать диагностическую амплификацию в режиме реального времени участков генов неструктурных белков вирусов (таблица 5).

Таблица 5 – Олигонуклеотиды для амплификации диагностических генов-мишеней вирусов Западного Нила, Денге, Зика

Праймеры и зонды	Нуклеотидная последовательность (5'–3')	Размер фрагмента (п.н.)
WNRT_F	CGGAAGTYGRGTAKACGGTGCTG	90
WNRT_R	CGGTWYTGAGGGCTTACRTGG	
WNV_Probe	[FAM] WCCCCAGGWGGACTG–BHQ-1	
DENV_F	ACTAGAGGTTAGAGGAGACCCCC	108
DENV_R	TGGCGTTCTGTGCCTGGAAT	
DENV_Probe	[CY5] CCCAGCGTCAATATGCTGT [BHQ-3]	
ZIKA_F	ARTGTTGTCAGGCCTGCTAG	84
ZIKA_R	CTTGRTTTCAGCKTCTCCT	
ZIKA_Probe	[R6G] GGGGAAAGCTGTGCAGCCTGT [BHQ-2]	

Для проведения одновременно нескольких реакций и снижения вероятности погрешности пипеток, готовят ПЦР-смесь в отдельной пробирке из расчета количества образцов +1 образец. Реакция проводится в конечном объеме 25 мкл.

Таблица 6 – Состав реакционной смеси

Компонент	Объем, x1 образец	Конечная концентрация
Деионизованная вода	16,5 мкл	-
ПЦР-буфер	2,5 мкл	1 х
MgCl <sub>2</sub>	2,0 мкл	2 мМ
Праймер прямой	0,5 мкл	0,2 мкМ
Праймер обратный	0,5 мкл	0,2 мкМ
Зонд	0,5 мкл	0,2 мкМ
Смесь дНТФ	0,2 мкл	0,2 мМ
Тaq-полимераза	0,3 мкл	1,5 Ед
кДНК	2 мкл	-

Аккуратно перемешать ПЦР-смесь, кратко осадить.

Добавить по 23 мкл ПЦР-смеси в пробирки объемом 0,2 мл. для каждого исследуемого образца. Добавить 2 мкл исследуемой кДНК в каждую пробирку. Аккуратно перемешать смесь на вортексе, осадить

центрифугированием при 6000 об./мин. 10-15 секунд. Поместить пробирки в амплификатор.

Таблица 7 – Режим амплификации

№	Сегмент цикла	Температура	Время	Количество циклов
1	Преденатурация	95 <sup>0</sup> С	5 минут	1
2	Денатурация	95 <sup>0</sup> С	20 сек	40 (детекция флюоресцентного сигнала с пятого цикла)
3	Отжиг	59 <sup>0</sup> С	20 сек	
4	Элонгация	72 <sup>0</sup> С	30 сек	

Анализ результатов проводят с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». Кривые накопления флюоресцентного сигнала анализируют по каналам соответственно для каждого вида ПЦР-смеси: по каналу для флуорофора FAM регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента кДНК вируса Западного Нила, по каналу для флуорофора CY5 – кДНК вируса Денге, R6G – кДНК вируса Зика. Результат реакции оценивается как положительный, если значения порогового цикла (Ct) ниже или равно 40 - для приборов планшетного типа, 38 – для приборов роторного типа. Результат реакции оценивается как отрицательный, если значения порогового цикла (Ct) отсутствуют, или превышают 40 - для приборов планшетного типа, 38 – для приборов роторного типа.



#### 4.2.5.2 Амплификация диагностических генов-мишеней боррелий Миямото, дирофилярий и коксиилл

Для выявления ДНК исследуемых микроорганизмов предложена амплификация специфических участков: боррелии Миямото – 94 п.н. гена (*glpQ*), кодирующего глицерофосфодиэфирфосфодиэстеразу; дирофилярии рода *Dirofilaria* – 94 п.н. гена 12S митохондриальной рРНК; коксиилла Барнета – 82 п.н. гена поверхностного белка *ompA* (таблица 8).  
Таблица 8 – Олигонуклеотиды для амплификации диагностических генов-мишеней боррелий Миямото, дирофилярий и коксиилл

Праймеры и зонды	Нуклеотидная последовательность (5'–3')	Размер фрагмента (п.н.)
BoMy_F	TGCACAATTATTTCCCAATCGA	94
BoMy_R	TTCAGTGAAGTTCAGTT	
BoMy_Probe	FAM-ACGGACGATATTACGCCACTGACTTCACA-BHQ1	
COX_F	CAGAGCCGGGAGTCAAGCT	94
COX_R	CTGAGTAGGAGATTTGAATCGC	
COX_probe	CY5-CAGCCCTGCAGCGAGGAGCC-BYQ3	
FILA_F	TGGATTAGTACCCAGGTAATC	82
FILA_R	CCAAAGAAAAATCTAAAGTCAGTC	
FILA_probe	FAM-AACAAAACCTTACTCCCGA-BHQ1	

Для проведения одновременно нескольких реакций и снижения вероятности погрешности пипеток, готовят ПЦР-смесь в отдельной пробирке из расчета количества образцов +1 образец. Реакция проводится в конечном объеме 25 мкл.

Таблица 9 – Состав реакционной смеси

Компонент	Объем, x1 образец	Конечная концентрация
Деионизованная вода	16,5 мкл	-
ПЦР-буфер	2,5 мкл	1 x
MgCl <sub>2</sub>	2,0 мкл	2 mM
Праймер прямой	0,5 мкл	0,2 мкМ
Праймер обратный	0,5 мкл	0,2 мкМ
Зонд	0,5 мкл	0,2 мкМ
Смесь дНТФ	0,2 мкл	0,2 mM
Тaq-полимераза	0,3 мкл	1,5 Ед
ДНК	2 мкл	-

Аккуратно перемешать ПЦР-смесь, кратко осадить.

Добавить по 23 мкл ПЦР-смеси в пробирки объемом 0,2 мл. для каждого исследуемого образца. Добавить 2 мкл исследуемой ДНК в каждую пробирку. Аккуратно перемешать смесь на вортексе, осадить центрифугированием при 6000 об./мин. 10-15 секунд. Поместить пробирки в амплификатор.

Таблица 10 – Режим амплификации

№	Сегмент цикла	Температура	Время	Количество циклов
1	Преденатурация	95 <sup>0</sup> С	10 минут	1
2	Денатурация	95 <sup>0</sup> С	20 сек	40 (детекция флуоресцентного сигнала с пятого цикла)
3	Отжиг Элонгация	60 <sup>0</sup> С	60 сек	

Анализ результатов проводят с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». Кривые накопления флуоресцентного сигнала анализируют по каналам соответственно для каждого вида ПЦР-смеси: по каналу для флуорофора FAM регистрируется сигнал, свидетельствующий

о накоплении продукта амплификации фрагмента ДНК боррелии Миямото и дирофилярии рода *Dirofilaria*, по каналу для флуорофора SY5 – ДНК коксии Барнета. Результат реакции оценивается как положительный, если значения порогового цикла (Ct) ниже или равно 40 - для приборов планшетного типа, 38 – для приборов роторного типа. Результат реакции оценивается как отрицательный, если значения порогового цикла (Ct) отсутствуют, или превышают 40 - для приборов планшетного типа, 38 – для приборов роторного типа.

#### **4.3 Перечень возможных ошибок, ограничений и пути их устранения**

Проведение молекулярно-генетических исследований подразумевает соблюдение правил на всех этапах работы: взятие биоматериала, транспортировка, хранение и пробоподготовка; выделение нуклеиновых кислот, амплификация и детекция. Несоблюдение данных правил приводит к возникновению ошибок, которые становятся причиной ложноположительных и ложноотрицательных результатов, что в свою очередь, приводит к неверной интерпретации результатов.

Причины ложноположительных результатов: перекрестная контаминация от образца к образцу в процессе пробоподготовки и на стадии выделения нуклеиновых кислот; загрязненные в результате предыдущих исследований реагенты, необработанный инструментарий.

Причины появления ложноотрицательных результатов: деградация исследуемой ДНК, несоблюдение технологии выделения нуклеиновых кислот, несоблюдение технологии подготовки ПЦР смеси, наличие ингибиторов ПЦР, использование реагентов с истекшим сроком годности, не соответствующий режим амплификации (неисправность оборудования). Пути устранения: выделить ДНК повторно, строго следуя

инструкции, соблюдая холодовую цепь; на всех этапах исследования необходимо использование одноразовой стерильной пластиковой посуды и наконечников во избежание внесения ингибиторов реакции.