

**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ**

**АКАДЕМІЯ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ**

**ІНСТИТУТ ФТИЗІАТРІЇ І ПУЛЬМОНОЛОГІЇ**

**ІМ. Ф.Г. ЯНОВСЬКОГО АМН УКРАЇНИ**

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИЙ МЕТОД ПРЯМОЇ ДНК-ГІБРИДИЗАЦІЇ  
З ВИКОРИСТАННЯМ ТАТ™ – ТЕХНОЛОГІЇ ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ  
КОМПЛЕКСУ M. TUBERCULOSIS/BOVIS В ОРГАНІЗМІ ЛЮДИНИ ДЛЯ  
ШВИДКОЇ ДІАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЬОЗНОЇ ІНФЕКЦІЇ У ХВОРИХ  
НА ТУБЕРКУЛЬОЗ ТА ПРОВЕДЕННЯ СКРИНІНГОВИХ  
ДОСЛІДЖЕНЬ В УКРАЇНІ**

*(методичні рекомендації)*

Київ 2006

**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ**  
**АКАДЕМІЯ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ**  
**ІНСТИТУТ ФТИЗІАТРІЇ І ПУЛЬМОНОЛОГІЇ**  
**ІМ. Ф.Г. ЯНОВСЬКОГО АМН УКРАЇНИ**

“УЗГОДЖЕНО”  
 Начальник лікувально-  
 організаційного управління  
 АМН України,

“УЗГОДЖЕНО”  
 Начальник відділу  
 соціально небезпечних хвороб  
 Департаменту державного санітарно-  
 епідеміологічного нагляду МОЗ  
 України

В.В. Лазоришинець

О.А. Федько

“ \_\_\_\_\_ ” \_\_\_\_\_ 2006 р.

“ \_\_\_\_\_ ” \_\_\_\_\_ 2006 р.

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИЙ МЕТОД ПРЯМОЇ ДНК-ГІБРИДИЗАЦІЇ**  
**З ВИКОРИСТАННЯМ ТАТ™ – ТЕХНОЛОГІЇ ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ**  
**КОМПЛЕКСУ M. TUBERCULOSIS/BOVIS В ОРГАНІЗМІ ЛЮДИНИ ДЛЯ**  
**ШВИДКОЇ ДІАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЬОЗНОЇ ІНФЕКЦІЇ У ХВОРИХ**  
**НА ТУБЕРКУЛЬОЗ ТА ПРОВЕДЕННЯ СКРИНІНГОВИХ**  
**ДОСЛІДЖЕНЬ В УКРАЇНІ**

*(методичні рекомендації)*

Київ 2006

**Заклад-розробник:**

Інститут фтизіатрії і пульмонології ім. Ф.Г. Яновського АМН України

**Укладачі:**

- Фещенко Ю.І.,** академік АМН України, д-р мед. наук, професор,  
тел. 275-04-02
- Журило О.А.,** д-р мед. наук, доцент, тел. 275-54-30
- Барбова А.І.,** канд. мед. наук, ст. наук. співроб., тел. 275-54-30
- Миронченко С.В.,** мол. наук. співроб., тел. 275-55-11
- Трофімова П.С.,** мол. наук. співроб., тел. 275-55-11
- Пустовалова А.О.,** мол. наук. співроб., тел. 275-55-11
- Іваненко Т.В.,** лікар-епідеміолог, координатор проекту РАТН –  
Україна, тел. 275-55-11
- Шукаєв М.В.** лікар-лаборант ОКДЛ, м. Тернопіль
- Клочков О.Є.** головний лікар МПТД м. Донецьк, канд. мед. наук

**Рецензенти:**

**Куріло С.М.,** *провід. наук. співроб. відділу фтизіопульмонології  
Інституту фтизіатрії і пульмонології  
ім. Ф.Г. Яновського АМН України, д-р мед. наук*

**Мельник В.П.,** *зав. каф. інфекційних захворювань,  
фтизіатрії і пульмонології Медичного  
інституту Української асоціації народної медицини,  
д-р мед. наук, професор*

*Голова профільної проблемної комісії МОЗ та АМН України –  
академік АМН України, д-р мед. наук, професор Фещенко Ю.І.*

*Голова експертної комісії – д-р мед. наук, професор Мельник В.М.*

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

год.	– годин
ДНК	– дезоксирибонуклеїнова кислота
РНК	– рибонуклеїнова кислота
мкл	– мікролітр
мМ	– мілімоль
об/хв.	– обертів в хвилину
ПЛР	– полімеразна ланцюгова реакція
сек.	– секунд
TAT™ – технологія	– Tessera array Technology
хв.	– хвилин
pH	– градієнт концентрації іонів водню в речовині
NALC – NaOH	– N-ацетил-L-цистеїн– NaOH
HCl	– соляна кислота
HNO <sub>3</sub>	– азотна кислота
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	– перекис водню

## ЗМІСТ

	ВСТУП.....	5
1	НОВИЙ НАПРЯМОК У МОЛЕКУЛЯРНОМУ ДІАГНОСТИЧНОМУ ТЕСТУВАННІ ТУБЕРКУЛЬОЗУ В УКРАЇНІ.....	6
2	ПРИНЦИП МЕТОДУ ДНК-ГІБРИДИЗАЦІЇ І ВИКОРИСТАННЯ ТЕСТ-НАБОРУ РЕАГЕНТІВ.....	9
2.1	Запобіжні заходи при роботі з дослідними зразками .....	11
2.2	Специфікація обладнання, контрольно-вимірювальних і регулюючих приладів (комплект на 1 лабораторію) та характеристика тест-набору "Туберкульоз ДНК-тест" .....	12
2.3	Хід дослідження.....	14
2.3.1	Первинна обробка дослідного матеріалу.....	14
2.3.2	Проведення аналізу.....	15
2.3.3	Облік результатів.....	15
2.3.4	Умови зберігання і використання набору.....	15
	ВИСНОВКИ.....	16
	ПЕРЕЛІК РЕКОМЕНДОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ .....	17

## ВСТУП

Для діагностики туберкульозу в мережі лабораторій країн Західної Європи використовуються методи діагностики з ДНК або РНК-зондами.

Виявлення в пробі пацієнта нуклеїнової кислоти, характерної для *M. tuberculosis / bovis complex*, дозволяє відразу їх ідентифікувати. Інформація про специфічні послідовності нуклеїнової кислоти в клітинах *M. tuberculosis / bovis complex* використовується для постановки діагнозу туберкульоз.

Відомо, що ДНК-зонди до специфічних ділянок нуклеїнової кислоти є основним компонентом більшості методів молекулярної діагностики. Зонди є міченими фрагментами ДНК, синтезованими в лабораторії. Метою їх застосування є гібридизація з мішенню – молекулою нуклеїнової кислоти – для її ідентифікації. Зонд є олігонуклеотидом – фрагментом з 30 – 40 нуклеотидів. Він несе мітку – молекулу-детектор. Після гібридизації зонда і мішені – нуклеїнової кислоти мікроорганізму, гібрид може бути виявлений за допомогою молекули-детектора.

Перевагами прямого методу ДНК-гібридизації є висока специфічність зондів до нуклеїнових кислот-мішеней і відсутність кросс-реакцій з іншими мішенями. Дослідження характеризуються високою чутливістю. Метод із ДНК-зондами дозволяє специфічно визначити *M. tuberculosis complex* безпосередньо в зразку від хворого. Ці тести по чутливості перевершують навіть культуральний метод дослідження, який є «золотим» стандартом у бактеріології туберкульозу, не згадуючи вже про мікроскопію. Зонди дають можливість виявити *M. tuberculosis* вже через кілька годин після початку досліджень, тоді як для одержання результатів посіву необхідно 6 – 8 тижнів (Наказ № 45 МОЗ України). Одночасне використання ДНК-зондування, культурального і бактеріоскопічного методів дослідження сприяє швидкій постановці діагнозу, ізоляції пацієнта і своєчасному початку лікування, дозволяє поліпшити клінічний результат і економічність терапії.

Метод прямої ДНК-гібридизації для діагностики туберкульозу пропонується для впровадження в Україні вперше. Він перспективний при обстеженні дітей, контактних і олігобацилярних хворих, може бути використаний при проведенні скринінгових досліджень. Впровадження його в діагностику туберкульозу істотно підвищить ранню виявляемість хворих, у тому числі з малими формами туберкульозу і позалегеновим туберкульозом та створить основи для організації і проведення моніторингу за розповсюдженням туберкульозу в Україні.

Слід зазначити, що лабораторії 3 – 4 рівня потребують найсучаснішого високотехнологічного обладнання, тому що, на сьогоднішній день, вони впроваджують у роботу лабораторій України нові методики та технології, проводять навчання спеціалістів та стажування на робочому місці, а також є організаційно-методичними центрами. Саме в цих лабораторіях здійснюється остаточне бактеріологічне підтвердження діагнозу на туберкульоз в особливо тяжких випадках, а також контролюється робота усіх бактеріологічних лабораторій країни щодо діагностики туберкульозу.

## 1 НОВИЙ НАПРЯМОК У МОЛЕКУЛЯРНОМУ ДІАГНОСТИЧНОМУ ТЕСТУВАННІ ТУБЕРКУЛЬОЗУ В УКРАЇНІ

Дослідження в молекулярній діагностиці туберкульозу засновані на визначенні молекул нуклеїнових кислот, що містяться в мікобактеріях.

Існує два типи нуклеїнових кислот, які визначаються: дезоксирибонуклеїнова кислота і рибонуклеїнова кислота. ДНК і РНК дуже подібні за хімічною структурою, однак в клітині виконують різні функції (таблиця 1.1). ДНК є молекулою, що зберігає інформацію про всі живі клітини, і є основним компонентом хромосом. Звичайно, кожна клітина містить одну або кілька копій ДНК. РНК служить проміжною молекулою, що конвертує генетичну інформацію, закодовану в ДНК, у протеїни, які створюють клітину.

Існує три основних типи РНК: матрична РНК (мРНК), транспортна РНК (тРНК) і рибосомальна РНК (рРНК).

Таблиця 1.1 – Хімічна структура ДНК і РНК

Хімічна структура	ДНК	РНК
Конфігурація	Подвійна нитка	Одинарна нитка
Цукор	Дезоксирибоза	Рибоза
Пуринові основи	Аденін	Аденін
	Гуанін	Гуанін
Піримідинові основи	Цитозин	Цитозин
	Тимін	Урацил

Відомо, що ДНК-зонди до специфічних ділянок нуклеїнової кислоти, є основним компонентом більшості методів молекулярної діагностики. Вони є міченими фрагментами ДНК, синтезованими в лабораторії.

Для діагностики туберкульозу використовуються три типи дослідження з ДНК або РНК-зондами: *ідентифікація з культури, прямий зонд і дослідження ампліфікації нуклеїнових кислот*.

**Метод ідентифікації з культури:** спочатку мікроорганізм вирощується в культурі, потім його нуклеїнові кислоти виявляються за допомогою ДНК-зондів. Таким типом тестів молекулярної ідентифікації з культури, що широко використовується в клінічних лабораторіях, є лінія тестів AccuProbe®. Ці тести визначають клінічно значимі бактерії, мікобактерії і гриби.

**Метод ампліфікації нуклеїнові кислоти (полімеразна ланцюгова реакція):** у ході виконання цього методу відбувається ензиматичне експонентне множення специфічної послідовності нуклеїнової кислоти, тобто виробництво білонів копій послідовностей за короткий період часу. Продукт ампліфікації легко виявляється або зондами, або іншими методами, що дозволяють ідентифікувати представлений у пробі мікроорганізм.



**Метод прямих зондів (пряма ДНК-гібридація):** у дослідженнях із прямим зондом, ДНК-зонд вводиться в оброблену пробу, отриману від пацієнта. Якщо підозрюваний мікроорганізм присутній, зонд виявить його нуклеїнову кислоту прямо в пробі. Прикладом такого типу дослідження є тести ТАТ™ – технології, які дозволяють дати швидку відповідь, що має великі переваги в діагностиці туберкульозу. Метод забезпечує постановку діагнозу “туберкульоз” у короткий час і ухвалення відповідного рішення про початок лікування пацієнта. ”Туберкульоз ДНК-тест” призначений для якісного визначення наявності ДНК *M. tuberculosis complex* у пробах мокротиння людини методом прямої ДНК-гібридації.

Референс-лабораторією з мікробіологічної діагностики туберкульозу ІФП АМН України проведені лабораторні дослідження молекулярно-генетичного методу прямої ДНК-гібридації з використанням ТАТ-технології для виявлення комплексу *M. tuberculosis / bovis* в організмі людини з метою практичного використання його для швидкої діагностики туберкульозної інфекції у хворих на туберкульоз. Applied Gene Technologies є новою молекулярно-біологічною технологією діагностики інфекційних захворювань, у тому числі туберкульозу. Метод ТАТ™ постановки прямої ДНК-гібридації дає швидку відповідь, що дозволяє протягом 1-го робочого дня поставити діагноз і почати лікування. ТАТ™ являє собою найбільш точний, не трудомісткий, недорогий скринінговий діагностичний тест. Витрати на проведення одного дослідження не перевищують витрати на проведення бактеріоскопічного дослідження.

Отримані нами дані показали, що чутливість аналізу складає  $(91,6 \pm 3,3)$  %, що практично в 2 рази перевищує чутливість методу бактеріоскопії  $(48,1 \pm 1,0)$  % й у 1,2 рази бактеріологічного методу  $(76,1 \pm 1,7)$  %, який дає остаточну бактеріологічну відповідь наприкінці 8-го тижня дослідження (Наказ № 45 МОЗ України, 2002).

Наявність у клінічних зразках специфічної ДНК *M. tuberculosis complex* визначається по інтенсивності люмінесценції. Високий рівень вірогідності отриманих результатів дослідження клінічних зразків визначається активністю світіння, що складає більш 100 000 RLU/sec, що перевищує cut off негативного контролю в 2 рази (дорівнює  $50\,000 \pm 15\,000$  RLU/sec).

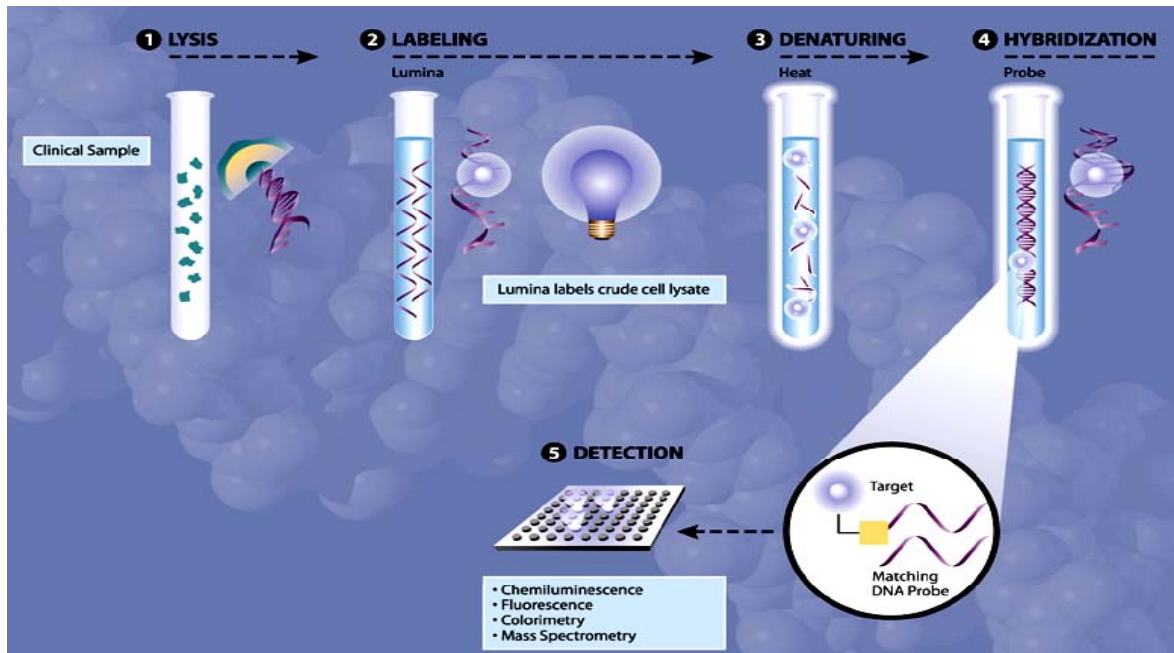
Одночасне використання методу Gene-Probe і автоматизованих систем для індикації, ідентифікації і визначення чутливості *M. tuberculosis* до хіміотерапевтичних препаратів, дозволяє більш раціонально й ощадливо використовувати видаткові матеріали для автоматизованих систем. Істотно подовжуються терміни використання стандартного набору видаткових матеріалів для автоматизованих систем (у 4 рази), амортизація яких коштує дуже дорого.

## 2 ПРИНЦИП МЕТОДУ ДНК-ГІБРИДИЗАЦІЇ І ВИКОРИСТАННЯ ТЕСТ-НАБОРУ РЕАГЕНТІВ

Принцип дії тест-набору «Туберкульоз ДНК-тест» заснований на використанні процесу прямої ДНК-гібридизації, що відбувається між ДНК клінічного зразка, попередньо тотально міченої люмінесцентним маркером, і специфічним ДНК-зондом, імобілізованим на магнітному носії. Дана реакція ДНК-гібридизації відбувається тільки у випадку присутності в клінічному зразку ДНК *M. tuberculosis complex*.

Виявлення ДНК *M. tuberculosis complex* у зразку проводиться за люмінесценцією зі специфічним ДНК-зондом на магнітному носії при використанні люмінометра (рисунок ).

Діючою речовиною тесту ДНК діагностики туберкульозу є розчин для люмінесцентного мічення ДНК-люміна і магнітний зонд – Маг-проуб, який містить специфічну ДНК-послідовність, імобілізовану на магнітному носії. Реагенти для дослідження використовуються *in vitro*.



Примітки:

- 1 – лізис клітин;
- 2 – тотальне мічення ДНК люмінесцентним маркером;
- 3 – денатурація ДНК;
- 4 – гібридизація зі специфічним ДНК-зондом, який іміобілізовано на магнітному носії;
- 5 – по люмінесценції гібрида ДНК зразка зі специфічним ДНК-зондом на магнітному носії за допомогою люменометра.

Рисунок. Технологія TAT<sup>™</sup> (Tessera array technology)

Час проведення аналізу після традиційної передпосівної обробки проб і підготовки необхідних розчинів складає не більш 1,5 год., включаючи лізис клітин. Комплектація набору залежить від потреб користувача і забезпечує проведення одночасного аналізу від 20 до 100 проб мокротиння.

Клінічні зразки, що аналізуються, попередньо обробляють стандартним методом з використанням NALC – NaOH з наступним центрифугуванням при 3800 об/хв. Осад ресуспендують у 67,0 мМ фосфатному буфері (рН 6,6 – 6,8).

Зберігання отриманого матеріалу до наступного аналізу здійснюють при температурі (2 – 8) °С не більш 3-х днів (“Інструкція з бактеріологічної діагностики туберкульозної інфекції” до Наказу № 45 МОЗ України від 06.02.2002 р.).

Безпосередньо перед аналізом клінічні зразки лізують за допомогою 4,0 N NaOH і нейтралізують матеріал, використовуючи 5,0 N і 0,5 HCl (до pH 6,0 – 6,5). Даний метод не вимагає ніякого додаткового очищення ДНК аналізованих проб, тому що активні компоненти набору мітять винятково молекули ДНК, але не мітять білки, вуглеводи або ліпіди.

## 2.1 Запобіжні заходи при роботі з дослідними зразками

“Туберкульоз ДНК-тест” призначений тільки для діагностики *in vitro*. Проведення досліджень здійснюється лише підготовленим персоналом. Біологічний матеріал, що досліджується, вважають потенційно інфікованим. Необхідно дотримання «Державних санітарних правил влаштування і безпеки в лабораторіях, що здійснюють мікробіологічну діагностику туберкульозу» (МОЗ України, 2006).

При роботі з клінічними зразками варто використовувати одноразові гумові рукавички, тому що біологічний матеріал є потенційно інфекційним. Працювати з клінічними зразками необхідно в ламінарній шафі. Хімічний посуд і обладнання, що використовуються при роботі з тест-набором, повинні бути відповідним чином промарковані і зберігатися окремо.

Реагент люміна високочутливий до світла. Розкриття контейнеру для використання реагенту необхідно проводити якнайшвидше. Після цього контейнер необхідно щільно закрити, щоб захистити від дії світла.

Реагенти набору “Туберкульоз ДНК-тест” слід розглядати як лабораторні реагенти, на які поширюються правила поведінки в лабораторії – використання

рукавичок, спеціальних окулярів та дотримання загальних правил техніки безпеки при проведенні лабораторних досліджень.

Реагенти не містять шкідливих, токсичних, патогенних та інших небезпечних речовин, що можуть завдати шкоду при їх зберіганні, застосуванні та утилізації і не створюють загрозу забруднення навколишнього середовища.

Утилізацію невикористаного набору проводять шляхом його автоклавування при температурі  $(120 \pm 1) ^\circ\text{C}$  протягом 1 год.

Особливих запобіжних заходів для утилізації невикористаний набір не потребує.

2.2 Специфікація обладнання, контрольовано-вимірювальних і регулюючих приладів (комплект на 1 лабораторію) та характеристика тест-набору "Туберкульоз ДНК-тест"

Специфікація обладнання, контрольовано-вимірювальних і регулюючих приладів наведена в таблиці 2.1.

До складу тест-набору входять наступні реагенти і видаткові матеріали:

**Люміна** – розчин для люмінесцентного мічення ДНК, готовий до застосування, фасовка по 50 або 100 мкл.

**Маг-зонд (Маг-проуб)** – суспензія, що містить специфічну ДНК-послідовність, іммобілізована на магнітному носії, готовий до застосування, фасовка 750 або 1500 мкл;

**Буфер № 1** – буферний розчин для гібридизації ДНК-зонда і ДНК клінічного зразка, рН 6,8 – 7,0, готовий до застосування, фасовка по 10,0 або 20,0 мкл.

**Буфер № 2** – буферний розчин для промивання продукту гібридизації, що включає SSC буфер з 1,0 % SDS, рН 7,5 – 7,8, готовий до застосування, фасовка 150 або 300 мкл.

**Позитивний контроль** – очищена ДНК із *M. tuberculosis complex*, готовий до застосування, фасовка 50,0 мкл.

Таблиця 2.1 – Специфікація обладнання

Найменування	Кількість (одиниці)
Електротермостат з магнітними блоками для пробірок 12 x 75 мм, що підтримує температуру від кімнатної до 120 °С	2
Ультрафіолетова або лампа транслюмінатор з довжиною хвилі 365 нм	1
Піпетки напівавтоматичні одноканальні зі змінними наконечниками з перемінним об'ємом на 1,0 – 10,0 мкл, 2,0 – 20,0 мкл, 20,0 – 200 мкл, 200 – 1000 мкл	По 1 штуці
Морозильник до – 6 °С (двокамерний холодильник)	1
Центрифуга з горизонтальним ротором до 6000 об/хв.	1
Зтрушувач пробірок Вортекс	1
Дистилятор	1
Ваги електронні	1
Ваги аналітичні	1
Люменометр із довжиною хвилі 370 – 630 нм з двома інжекторами	1
Іонометр	1
Секундомір	1

**Негативний контроль** – ДНК сперми оселедця (*Herring Sperm DNA*), готовий до застосування, фасовка 50,0 мкл.

**Твін 20** – для готування розчину для гібридизації, готовий до застосування, фасовка 1,0 мл.

**Пробірки поліпропіленові** на 5,0 мл, 12,0 x 75,0 мм.

**Пробірки поліпропіленові** для ПЛР на 0,2 мл.

**Наконечники** для напівавтоматичних піпеток від 10,0 до 1000 мкл.

## 2.3 Хід дослідження

### 2.3.1 Первинна обробка дослідного матеріалу

– Клінічні зразки мокротиння попередньо обробляють стандартним методом з використанням NALC-NaOH (N-ацетил-L-цистеїн, 4,0 N NaOH) (“Інструкція з бактеріологічної діагностики туберкульозної інфекції” до Наказу № 45 МОЗ України від 06.02.2002 р.).

– Після обробки зразків NALC-NaOH їх центрифугують при  $x$  3800 об/хв., а осад ресуспендують у 67,0 мМ фосфатному буфері (рН 6,6 – 6,8). Зберігання отриманого матеріалу до наступного аналізу здійснюють при температурі 2 – 8 °С не більш 3 діб.

– Безпосередньо перед аналізом клінічні зразки лізують за допомогою 4,0 N NaOH. Для цього до 900 мкл зразка додають 100 мкл 4,0 N NaOH, перемішують протягом 1,0 хв. на Вортексі, інкубують 5 хв. при кімнатній температурі, а потім прогрівають 20 хв. при  $(100 \pm 2)$  °С.

– Для нейтралізації суміші до неї повільно додають 60,0 мкл 5,0 N HCl і по краплях ще близько 20,0 мкл 0,5 N HCl до того моменту, коли суміш стане яскраво-рожевого або жовтувато-рожевого кольору (до рН 6,0 – 6,5).

– Зразок для аналізу повинен бути чистим, без видимої суспензії, тому, при необхідності, суміш центрифугують 3,0 хв. при 6000 об/хв., а супернатант переносять у чисту пробірку для аналізу.

### 2.3.2 Проведення аналізу

– Мічення ДНК: у 0,2 мл ПЛР пробірку вносять 1,0 мкл розчину Люміна и 50,0 мкл зразка, перемішують піпетуванням і поміщають безпосередньо на УФ лампу на 30 хв. у горизонтальному положенні.

– Підготовка розчину для гібридизації: для кожної проби потрібно 100 мкл буфера № 1 з 1,0 мкл ДНК сперми оселедця (10,0 мг/мл), 2,0 мкл Твіну 20 і 32,0 мкл бідистильованої стерильної води.

– Підготовка Маг-зонда: для кожної проби треба взяти 15,0 мкл суспензії Маг-зонда, помістити її в магнітний сепаратор, видалити супернатант і промити буфером № 1. Відокремити промивний буфер за допомогою магнітного сепаратора, видалити супернатант і додати в пробірку 15,0 мкл буфера № 1. Прогріти отриману суспензію при 83 °С протягом 5 хв. перед проведенням гібридизації.

– У тест-пробірку вносять 135 мкл розчину для гібридизації і додають 50,0 мкл міченого зразка, перемішують піпетуванням, ставлять у електротермостат і прогрівають суміш при 96 – 100 °С протягом 8 хв. для денатурації ДНК.

– Додають 15,0 мкл підготовленого прогрітого протягом 3 хв. при 83 °С Маг-зонда, після чого негайно переносять пробірку в електротермостат з температурою 83 °С і витримують при цій температурі 10 хв. для гібридизації ДНК зразка і Маг-зонда.

– Переносять пробірку в магнітний сепаратор при 49 °С на 3 хв. Обережно видаляють піпеткою супернатант, додають 500 мкл буфера № 2 (wash) і обережно перемішують протягом 10 сек. на Вортексі. Цю процедуру повторюють 3 рази. Потім у тест-пробірку до Маг-зонда з гібридизованою ДНК додають 100 мкл бідистильованої стерильної води і ретельно перемішують, потім переносять суспензію в нову тест-пробірку для визначення.

### 2.3.3 Облік результатів

Поміщають пробірку в люмінометр і знімають показання в RLU/сек (негативні одиниці люмінесценції в секунду). Режим роботи люменометра повинен бути наступним: час виміру – 2 сек., час затримки для інжектора А – 2



сек., обсяг розчину для інжектора А – 200 мкл, час затримки для інжектора Б – 2 сек., обсяг розчину для інжектора Б – 200 мкл, загальний час затримки – 4 сек. Попередньо необхідно перевірити наявність розчинів для інжекторів люменометра: розчин для інжектора А: 1,0 мМ  $\text{HNO}_3$  + 30,0 %  $\text{H}_2\text{O}_2$  (12,5 мкл 16,0 N  $\text{HNO}_3$  + 1,7 мл 30,0 %  $\text{H}_2\text{O}_2$ /500 мл  $\text{H}_2\text{O}$ ); розчин для інжектора Б – 1,0 М  $\text{NaOH}$  (20,0 г  $\text{NaOH}$ /500 мл  $\text{H}_2\text{O}$ ).

#### 2.3.4 Умови зберігання і використання набору

Всі реагенти, крім контролів і ДНК сперми оселедця, можна зберігати при кімнатній температурі протягом року. Позитивний і негативний контролі та ДНК сперми оселедця необхідно зберігати в морозильнику при  $(-4 - 5) ^\circ\text{C}$ . Термін придатності набору – 1 рік.

### ВИСНОВКИ

Методичні рекомендації розроблені за вимогами ВООЗ і Міжнародного Союзу по боротьбі з легеневиими захворюваннями для діагностики туберкульозу.

Рекомендується практичне використання в мережі лабораторій протитуберкульозних закладів України молекулярно-генетичного методу прямої ДНК-гібридизації з використанням ТАТ-технології для виявлення комплексу *M. tuberculosis / bovis* в організмі людини, який пройшов апробацію в Референс-лабораторії ІФП АМН України і зарекомендував себе з позитивного боку. Наведені методики постановки дослідження.

Перевагою методу прямої ДНК-гібридизації з використанням ТАТ-технології є те, що він стандартизований, легкий в постановці, не потребує тривалого часу (від постановки до отримання кінцевого результату). Applied

Gene Technologies є новою молекулярно-біологічною технологією діагностики інфекційних захворювань, у тому числі туберкульозу.

Метод прямої ДНК-гібридизації з використанням технології ТАТ™ перспективний при обстеженні дітей, контактних і олігобацилярних хворих, може бути використаний при проведенні скринінгових досліджень. Впровадження його в діагностику туберкульозу істотно підвищить ранню виявляємість хворих, у тому числі з малими формами і позалегеневим туберкульозом.

## ПЕРЕЛІК РЕКОМЕНДОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Туберкулез. Патогенез, защита, контроль: Пер. с англ. / Под. ред. Барри Р. Блума. – М.: Медицина, 2002. – 696 с.
2. Туберкулез с множественной лекарственной устойчивостью: Пер. с англ. / Под ред. И. Бастиана, Ф. Порталс. – М.: Медицина и жизнь, 2003. – 368 с.