

# Пробопідготовка зразків для подальшого дослідження методом ПЛР (частина 1)



Лора Чернишова,  
Лабораторний експерт  
Бюро ВОЗ в Україні,  
[chernyshoval@who.int](mailto:chernyshoval@who.int)

# Питання:

---

*Який саме вид біоматеріалу відбирати? для дослідження на ОНІ, вірусні гепатити тощо*

---

*В який термін відбирати матеріал на ПЛР : аденовірус, ротавірус, кір, краснуха, туляремія, бруцельоз, гепатит А тощо.*

---

*Як готувати зразки до дослідження методом ПЛР: біологічний матеріал від людини (фекалії, секційний матеріал тощо), об'єкти зовнішнього середовища (вода, ґрунт), суспензії комах (кліщів) тощо*

---

*Антибіотикотерапія, протипаразитарна терапія, дієта, медичні процедури тощо – як це впливає на результати ПЛР-дослідження?*

---

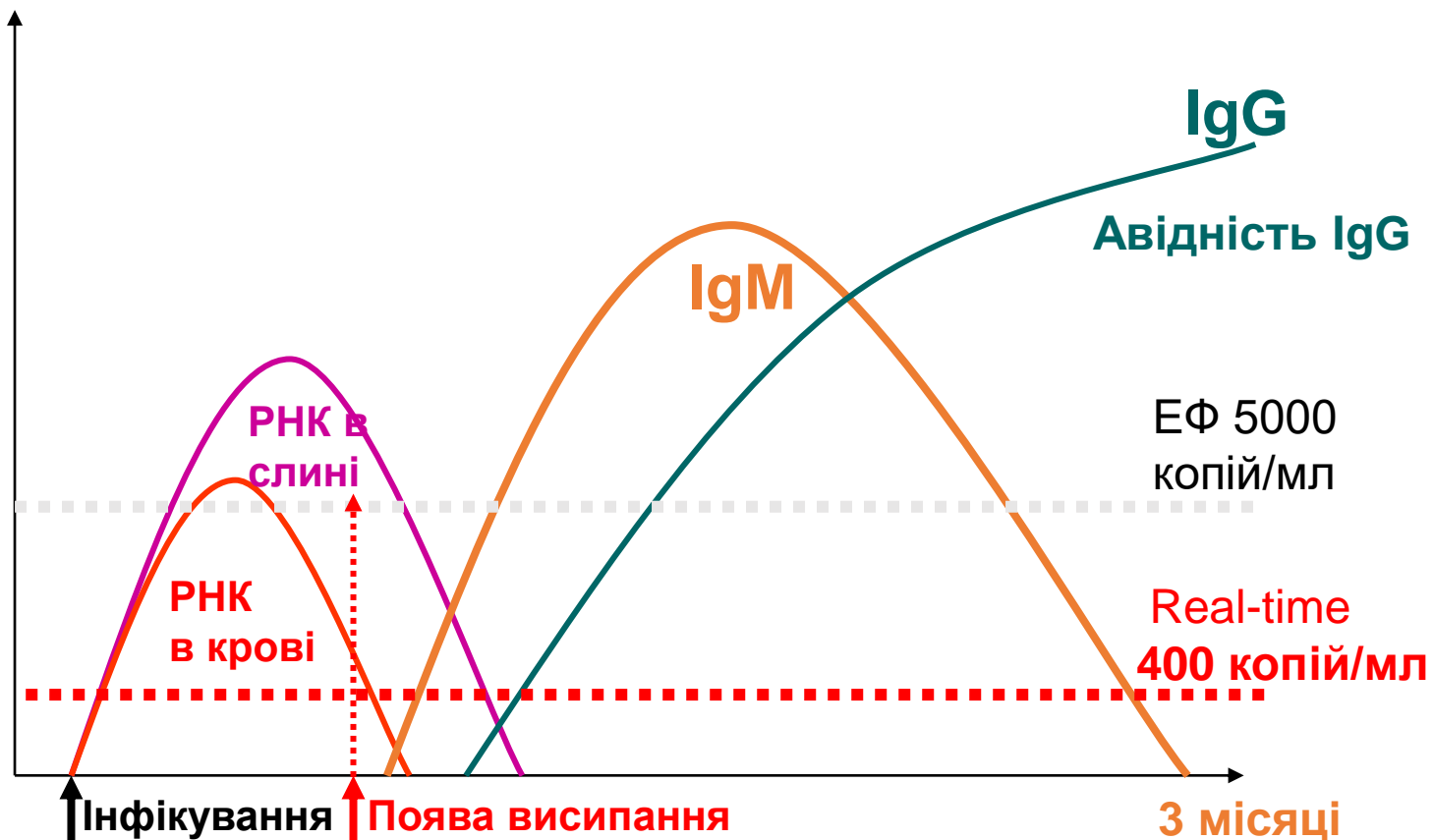
*Ризики пробопідготовки: повністю ручна, контамінація, помилка в нумерації та маркуванні, переплутування зразків. Що робити (автоматизація, автоматизація окремих кроків, ЛІС, маркування)*

---

*Документи, що регламентують преаналітичний етап ПЛР-дослідження*

# Терміни відбору матеріалу – чому це важливо?

## Динаміка появи маркерів Rubella virus



### Кір:

- Біоматеріал: мазки з зіву, носоглотки, сеча, лейкоцити крові
- Термін відбору: якомога швидше після появи висипки (1-3 день)

### Краснуха:

- Біоматеріал: мазки з зіву та носоглотки, слина). НЕ кров!
- Термін відбору: кілька днів до появи висипки і кілька днів після.

**Зауваження:** матеріал з ротової порожнини, відібраний в пробірку з консервантом для стабілізації IgM НЕ МОЖНА використовувати для ПЛР

# Локалізація збудників – діагностичне значення для ПЛР.

Цитомегаловірус -  
(кров, лейкоцити  
крові, біоптати, ліквор,  
зішкряби, слина,  
грудне молоко)

*Helicobacter pylori*  
(біоптати ШКТ, зубний  
наліт, фекалії)

Папіломавіруси  
(епітелій слизової  
оболонки, біоптати  
слизової оболонки)

*T.vaginalis,*  
*N.gonorrhoeae,*  
*C.trachomatis,*  
*G.vaginalis, Candidae*  
(зішкряб УГТ, осад сечі)

*T.gondii* (ліквор, кров,  
амніотична рідина)

*Shigellae, Salmonellae*  
(фекалії)

Ентеровіруси (ліквор,  
фекалії, стічні води)

# Документи МОЗ України

- Наказ №662 від 2013 р. «Про затвердження Методичних рекомендацій *«Порядок забору, транспортування та зберігання матеріалу для дослідження методом полімеразної ланцюгової реакції»*». [Посилання](#).



---

Єдиний документ



---

Містить протоколи пробопідготовки основних видів матеріалу для дослідження методом ПЛР



---

Протоколи валідовані якнайменш на ПЛР-наборах одного виробника



---

Є перекладом російської методички, розробленої для наборів «Амплісенс»



# Документи ВОЗ

- **WHO - Guidelines for the collection of clinical specimens during field investigation of outbreaks: [link](#)**

Містить інформацію щодо пакування, маркування та транспортування зразків, дезинфекції, а також алгоритми дифдіагностики та методики відбору (але не пробопідготовки!) для деяких видів біоматеріалу. Для дослідження різними методами (переважно бактеріологічними, паразитологічними, вірусологічними), тому потрібно враховувати специфічність для молекулярних методів (напр., тип антикоагулянту в пробірці – в гайдлайні це не підкреслене окремо). Не містить протоколів для об'єктів зовнішнього середовища.

- **WHO - Guidance on regulations for the transport of infectious substances 2021-2022: applicable as from 1 January 2021: [link](#)**

Містить інформацію щодо пакування, маркування та транспортування зразків.

- **WHO - How to safely ship human blood samples from suspected Ebola or Marburg cases within a country by road, rail and sea- interim guidance: [link](#)**

Коротка пам'ятка з картинками

- **Manual for the laboratory diagnosis of measles and rubella virus infection, 2nd ed: [link](#)**

Містить необхідну інформацію щодо видів біоматеріалу, попередньої обробки та термінів відбору, в т.ч. для подальшого дослідження методом ПЛР. Але: 2007 року!

- **Enterovirus surveillance guidelines Guidelines for enterovirus surveillance in support of the Polio Eradication Initiative, 2015: [link](#)**

# Інші документи / ресурси

- «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР диагностики», справочно-информационное издание. [Посилання](#).
- «Сбор, учет и подготовка к лабораторному исследованию кровососущих членистоногих в природных очагах опасных инфекционных болезней Методические указания МУ 3.1.3012-12» [Посилання](#)
- [Resources for Parasitic Diseases](#), DPDx - Laboratory Identification of Parasites of Public Health Concern (*сайт CDC*)
- [Wastewater Surveillance Testing Methods](#) (*сайт CDC*)
- [MANUAL FOR DETECTION OF SARS-CoV-2 RNA IN WASTEWATER](#), COVID-19 Taskforce, Japan Society on Water Environment, Japan Institute of Wastewater Engineering and Technology, February 2022

# Пробопідготовка зразків фекалій



# Термін відбору зразків фекалій

- Матеріал слід відбирати найближчим часом після початку діареї (для вірусів < 48 годин, для бактерій < 4 днів)
- Бажано перед початком антибіотикотерапії
- Зразки фекалій є кращими для дослідження на наявність бактеріальних, вірусних та паразитарних збудників діареї, ніж ректальні мазки.
- Ректальні мазки можна відбирати у немовлят
- Ректальні мазки не рекомендовані для виявлення вірусних збудників

# Пробопідготовка зразків фекалій

Невелику кількість фекалій 1,0 - 3,0 г (мл) забирають з 4 - 6 різних місць ложечкою, вмонтованою в кришку контейнеру, і поміщають у контейнер.

## Приготування фекальної суспензії

Підготувати мікроцентрифужні пробірки об'ємом 1,5 - 2,0 мл, внести 0,8 мл фосфатного буфера або стерильного ізотонічного розчину натрію хлориду.

У кожен пробірник окремих наконечником з фільтром або одноразовими лопатками внести 0,2 мл (г) фекалій і перемішати на вортексі до утворення гомогенної суспензії.

При неможливості дослідження матеріалу впродовж доби та/або необхідності тривалого зберігання до суспензії фекалій у фосфатному буфері (або стерильному ізотонічному розчині натрію хлориду) додають гліцерин в кінцевій концентрації 10 - 15%. Підготовлені таким чином проби заморожують після ретельної гомогенізації та експозиції з гліцерином впродовж 30 - 40хв.

Для приготування бактеріальної фракції або освітленого екстракту можна використовувати фекалії водянистої консистенції, щойно приготовлену суспензію фекалій або суспензію, що піддавалася заморожуванню з гліцерином.

\* Деякі лабораторії покладають приготування фекальної суспензії на пацієнта.



# Пробопідготовка зразків фекалій

## Приготування бактеріальної фракції фекалій для виявлення бактеріальних агентів

Пробірки із суспензією фекалій центрифугують при 7000 - 12000 g впродовж 5 хв. Відбирають 0,05 мл бактеріальної фракції (верхня біло-жовта частина осаду, що містить високу концентрацію бактерій).

При відсутності осаду або біло-жовтого граничного шару між осадом і супернатантом відбирають 0,1 мл з дна пробірки або з межі осаду і супернатанту.

Відібрану аліквоту переносять у нову пробірку, що містить 0,8 мл фосфатного буфера або стерильного ізотонічного розчину натрію хлориду. Ретельно перемішують на вортексі і центрифугують при 7000 - 12000 g впродовж 5 хв.

Супернатант видаляють і осад ресуспендують на вортексі в 0,3 мл фосфатного буфера (або стерильного ізотонічного розчину натрію хлориду).

## Приготування освітленого екстракту фекалій для виявлення вірусних агентів

Завись фекалій інтенсивно гомогенізують на вортексі.

Освітлюють отриману суспензію шляхом центрифугування при 10000 впродовж 5 х.в.

Супернатант змішують з ОКО (*негативний контроль в складі наборів «АмпліСенс», ТЕ-буфер*) у співвідношенні 1:1 і використовують безпосередньо для виділення РНК. При необхідності зберігання супернатант відбирають в окрему одноразову пробірку.

## Пробопідготовка зразків фекалій

Зразок повинен бути відібраний в пробірку з консервантом, сумісним з ПЛР-реагентами. [Ось тут](#) порівняльна таблиця фіксаторів для дослідження калу різними методами.

Фіксатори \ консерванти, сумісні з ПЛР: [TotalFix](#), Unifix, модифікований полівініловий спирт (ПВА на основі цинку або міді) та [Ecofix](#). Зразки можна зберігати і транспортувати при кімнатній температурі.

Альтернатива: відібрати зразок в чисту пробірку без консервантів. Зберігання в замороженому або охолодженому (4°C) виді, транспортування з сухим льодом (для дослідження на ентеровіруси відбирають саме нативні фекалії (не в транспортне середовище!) в стерильні пластикові (не скляні) стакани)

Фіксатори, які НЕ рекомендуються для ПЛР-дослідження: формалін, [SAF](#), [LV-PVA](#) та [Protofix](#).

Якщо комерційні фіксатори недоступні: змішати зразок фекалій з 2,5% дихроматом калію (розведення 1:1) або абсолютним етанолом (розведення 1:1) і відправити в охолодженому вигляді.

# Зауваження щодо прийому ліків або проведення медичних процедур

- Заборонено використовувати антациди, барій, вісмут, антибіотики, протималарійні засоби, протидіарейні препарати або олієподібні послаблюючі засоби перед взяттям зразка фекалій.
- Після прийому будь-якого з цих засобів необхідно почекати 5-10 діб, та 14 діб – після використання барію.
- Зразки фекалій не повинні бути забруднені сечею або водою

# Зауваження: наявність в зразку домішок їжі

---

Використовуйте спеціальні набори для екстракції, призначені для виділення ДНК (РНК) зі зразків фекалій (напр. [FastDNA® Kit\\*](#))

---

\* Протокол екстракції до набору передбачає відбір зразка фекалій в суху пробірку без консерванту, та три послідовних відмивання у PBS-EDTA під час екстракції. Інші виробники ([ZR](#)) пропонують транспортне середовище \ консервант в складі набору.

---

Для подрібнення рослинних домішок необхідне додаткове обладнання - подрібнювач, гомогенізатор (напр., FastPrep FP120 Disrupter або аналог). Відмитий у PBS-EDTA зразок змішується з лізуючим буфером і вміщується в подрібнювач.

---

Може знадобитись додатковий етап очищення ДНК після екстракції і елюції (якщо інгібітори не повністю видалені під час екстракції)

---

Рекомендується очистити ДНК за допомогою спін-колонки [QIAquick](#) згідно інструкції до набору. Для елюції ДНК зі спін-колонки використовуйте високоякісну деіонізовану воду.

---

## Умови зберігання і транспортування матеріалу

---

*Зразки нативних фекалій:*

---

при кімнатній температурі - впродовж 6 год.;

---

при температурі 2 - 8 °C - впродовж 3 діб;

---

При температурі -80 °C – тривало (рекомендовано розділити фекалії на аліквоти)

---

*Фекальна суспензія з гліцерином, бактеріальна фракція і освітлений фекальний екстракт:*

---

при температурі -20 °C - впродовж 1 тижня;

---

при температурі -70 °C - тривало.

---

*Зразок фекалій в консерванті (напр., біхромат калію або абсолютний етанол в розведенні 1:1)*

---

Згідно інструкції виробника або при температурі 4°C – впродовж 2 діб

Guidelines for the collection of clinical specimens during field investigation of outbreaks; Наказ №662 від 2013 р.

# Пробопідготовка стічних вод



# Зауваження щодо відбору проб

- При відборі очищених стічних вод залишковий хлор необхідно видалити, щоб запобігти деградації нуклеотидів у зразку.
- Для цього необхідно заздалегідь додати у контейнер для відбору концентрований розчин тіосульфату натрію ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) до кінцевої концентрації 50 мг/л

# 1. Метод дробного центрифугування

---

Підходить для виявлення бактерій, грибів, найпростіших (не вірусів)

---

Відібрати по 125 мл води в 4 центрифужні пробірки (або: по 80 мл в 6 пробірок, або по 50 мл в 10 пробірок).  
Центрифугувати при 10 тис. g 15 хв.

---

Осад ресуспендувати в 200 мкл фізрозчину. Перенести в пробірки типу епендорф. Центрифугувати при 10 тис g 1 хв.

---

Перенести супернатант в пробірки типу епендорф.

---

*Варіант методики:* центрифугування всього об'єму води в одному стакані. Пробу (50-125 мл) центрифугують, супернатант видаляють, в стакан додають новий об'єм. Аналогічним чином центрифугують весь об'єм проби.

## 2. Вакуумна фільтрація

Підходить для виявлення бактеріальних, грибкових, протозойних та вірусних агентів.

Якщо вода забруднена маслянистими або механічними домішками – попередньо профільтрувати через ватно-марлевий фільтр

Додати 1 мл розчину  $MgCl_2$  (2,5 моль/л) на 100 мл зразка води, перемішати та інкубувати при кімнатній температурі протягом кількох хвилин.

Пропустити пробу води через мембранний фільтр з діаметром пор 0.2 (для вірусів), 0.45, 0.65, 0.8 або 1,2 мкм

Через мембрану діаметром 90 мм можна пропустити до 200 мл неочищеної стічної води або 5-10 л очищеної стічної води. Через мембрану діаметром 47 мм: відповідно, 50 мл і 1-2 л.

Перенести мембранний фільтр в чашку Петрі, флакон чи пакет з 10 мл фізрозчину.

Подрібнення фільтру. Флакон: струсити 5-10 хв на шейкері. Фільтр в чашці Петрі порізати ножицями і 10 гойдати на шейкері. Фільтр в пакеті розтерти вручну.

Перенести елюат разом з розтертою мембраною в чистий флакон, додати 5 мл буферу для елюції. Центрифугувати при 2000 g, 10 хв, 4°C.

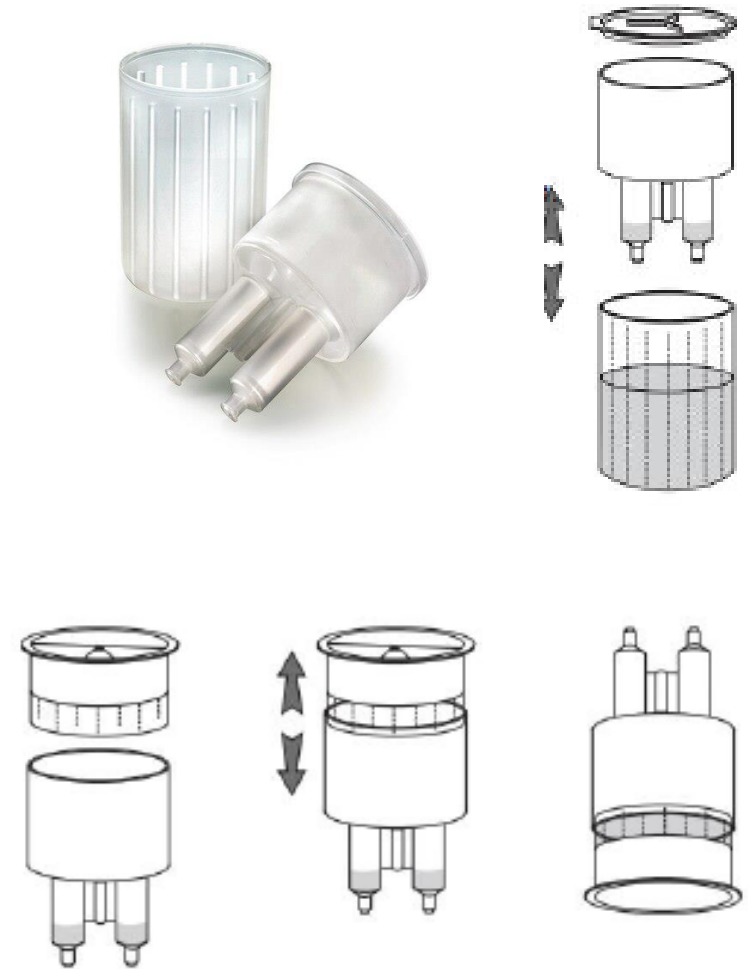
Або: перенести 1 мл елюату (без мембрани) в пробірку типу епандорф, центрифугувати 10 хв при 10 тис. g.

Для виділення бактерій: видалити 900 мкл надосадової рідини. В залишку (100 мкл) супернатанту ресуспендувати осад.

Для виділення вірусів – використовуємо 100-200 мкл супернатанту

# 3. Ультрафільтраційний мембранний метод

- Концентрує віруси на мембрані за допомогою «ефекту просіву» часток з молекулярною масою 10-100 кДа
- **Переваги:** простота методу. Використовуються комерційні ультрафільтраційні мембранні блоки, напр., [Centricon Plus-70](#) від Merck Millipore, здатні концентрувати 70 мл води до 350 мкл за 15-40 хв.
- Блок складається з чашки з фільтром, який вставляється в чашку для збору фільтрату. Для того, щоб зібрати вірусні частки на фільтрі, блок центрифугується в звичайному положенні. Для того, щоб сконцентрувати зразок, стакан перегортається і фільтрується догори ногами.
- **Недоліки:** відносно висока вартість. Фільтри сумісні лише з центрифугами з бакетними центрифугами. Можливе інгібування на етапі ПЛР, оскільки разом з вірусними частками концентруються і інгібітори.
- Необхідне обладнання \ витратні матеріали: тримач фільтра, центрифуга з поворотним ротором, Centricon Plus-70 100 кДа (Merck Millipore, номер за каталогом: UFC710008), гідрофільна PTFE мембрана (розмір пор: 0,2 мкм)
- **Процедура:**
- Відфільтруйте зразок стічної води через гідрофільну PTFE мембрану (розмір пор: 0,2 мкм)
- За допомогою ультрафільтраційної мембрани (Centricon Plus-70) центрифугуйте 120 мл зразка через PTFE мембрану при 1900 x g протягом 8 хвилин двічі, а потім центрифугуйте її догори дном при 800 x g протягом 2 хвилини для збору концентрату. Цей метод дозволяє концентрувати 120 мл зразка стічної води приблизно до 400-700 мкл.



# 4. Методи концентрації вірусів

**Ультрацентрифугування (необхідна високошвидкісна центрифуга з охолодженням).**

В пробірку налити вірусвмісний елюат

Шприцем на дно пробірки додати 10-20% розчин сахарози в об'ємі 5-10% від об'єму пробірки

Центрифугувати при 40-50 тис.г протягом 2 год.

Видалити супернатант. Осад ресуспендувати в 500 мкл води для ПЛР.

**Обробка елюату і осадження поліетиленгліколем 6000 або 8000 (ПЕГ 6000 / 8000).**

До елюату додати ПЕГ 6000 і хлорид натрію до кінцевої концентрації 10% і 0,5 М відповідно (напр., для проби об'ємом 40 мл додати в пробірку 4 г ПЕГ 8000 і 2,35 г NaCl). Ретельно перемішати до розчинення ПЕГ.

Витримати 10-12 год при 4 °С у шейкері (залишити на ніч).

Центрифугувати при 10 тис г 30 хв - 1 год. Або при 6 тис г 2 год.

Видалити супернатант, осад ресуспендувати в 500 мкл води для ПЛР або фосфатного буферу або в реагенті TRIzol (Invitrogen). **Увага:** осад приліпає до стінок пробірки! Піпетуйте ретельно! Перенести суспензію до пробірки типу епандорф.

## Умови зберігання і транспортування:

---

при температурі +2 - +8 °С - впродовж 1 доби;

---

при температурі -20 °С - впродовж 1 місяця (неприпустимо для РНК-вмісних вірусів);

---

Концентрат у ПЕГ 6000 \ 8000 – при температурі -20 °С

---

Зразки, які досліджуються на РНК-вмісні віруси (ентеровіруси, SARS-CoV-2) потрібно проаналізувати протягом 24 годин після відбору. Якщо це неможливо, зразки слід зберігати при -80 °С.

---

при температурі -70 °С - тривало.