

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель Министра – Главный
государственный санитарный
врач Республики Беларусь

С.В. Нечай

2025 г.

Регистрационный № 002-0625



**МЕТОД МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО ТИПИРОВАНИЯ
ПАТОГЕННЫХ ЛЕПТОСПИР (*LEPTOSPIRA SPP.*)**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: государственное учреждение
«Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного
здоровья»

АВТОРЫ: Я.В. Лютина, канд. мед. наук, доц. А.М. Дронина,
Е.В. Федорович, канд. мед. наук, доц. А.Г. Красько, канд. мед. наук, доц.
Е.И. Гудкова, О.В. Климович, С.Ф. Семенов

Минск, 2025

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен метод молекулярно-генетического типирования штаммов патогенных лептоспир, который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на медицинскую профилактику заболеваний и патологических состояний, вызванных патогенными лептоспирами.

Инструкция предназначена для врачей эпидемиологов, врачей-лаборантов и иных специалистов организаций здравоохранения, принимающих участие в организации и проведении эпидемиологического слежения за лептоспирозной инфекцией.

Показания к применению

Мероприятия по организации и проведению эпидемиологического слежения за лептоспирозной инфекцией на территории Республики Беларусь.

Противопоказания к применению: отсутствуют.

Перечень необходимых медицинских изделий, расходных материалов и др.

1. Бокс ламинарный с бактерицидной лампой.
2. Высокоскоростная центрифуга для пробирок типа «Эппендорф» со скоростью вращения ротора 8–12 тыс. об./мин.
3. Микроцентрифуга-встряхиватель со скоростью вращения ротора 1,5–3 тыс. об./мин.
4. Твердотельный термостат для пробирок типа «Эппендорф» 1,5 мл, поддерживающий температуру до 65°C.
5. Программируемый термоциклер с оптическим блоком (амплификатор) для роторного и планшетного типа.
6. Центрифуги с охлаждением на 14000 об./мин.

7. Аппарат для горизонтального электрофореза в агарозном геле с источником питания.
8. Гельдокументирующая система с фото документированием (трансиллюминатор ультрафиолетовый для просмотра геля); учёт результатов проводить с использованием проходящего УФ-света, длина волны 302 нм.
9. Генетический анализатор.
10. Морозильник, диапазон рабочих температур от минус 16⁰С до минус 20⁰С.
11. Холодильник, диапазон рабочих температур от плюс 2⁰С до плюс 8⁰С.
12. Пипетки-дозаторы переменного объема (0,5–10; 2–20; 20–200; 100–1000 мкл).
13. Одноразовая пластиковая стерильная посуда свободная от нуклеаз: наконечники с аэрозольным фильтром для автоматических дозаторов (1-10 мкл, 10-100 мкл, 100-1000 мкл); пробирки типа «Эппендорф» 1,5 мл; микропробирки для проведения ПЦР (0,2 мл).
14. Штативы для пробирок типа «Эппендорф» 1,5 мл.
15. Скальпель либо лезвие, стерильное.
16. Набор для экстракции дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК).
17. Реагенты для приготовления смеси для полимеразной цепной реакции (ПЦР), включающие в себя: Таq-полимеразу с 10х буфером, MgCl₂, дезоксирибонуклеозидтрифосфаты (дАТФ, дГТФ, дТТФ, дЦТФ), прямой праймер, обратный праймер, стерильную бидистиллированную воду, свободную от нуклеаз.
18. Комплект реагентов для электрофоретической детекции продуктов амплификации в агарозном геле (агароза для электрофореза, маркер молекулярного веса 50-1500 п.о., загрузочный буфер, Трис-

боратный буфер (ТВЕ) либо Трис-ацетатный буфер (ТАЕ), бромистый этидий).

19. Набор реагентов для проведения очистки продуктов амплификации после электрофоретической детекции.

20. Реагенты для проведения секвенирующей ПЦР (праймеры, BigDye Terminator v.3.1, 5x буфер, деионизованная вода) и очистки продуктов после секвенирующей ПЦР (50 мМ Na₂ЭДТА, 3М ацетат натрия, 96% этанол, 70% этанол, жидкий азот, формамид).

21. Программное обеспечение для анализа нуклеотидных последовательностей: Sequencing Analysis Software V.6, BioEdit V.7.2, SeqScape v.3, MEGA 11 и др.

Качество используемых реагентов должно соответствовать техническим требованиям, предъявляемым к реагентам для проведения молекулярно-генетических исследований.

Технология осуществления метода

Этап 1 Выделение ДНК патогенных лептоспир

Материалом для исследования является ДНК патогенных лептоспир, выделенная из чистых бактериальных культур и биологического материала. ДНК выделяют общепризнанным методом с использованием коммерческих наборов в соответствии с инструкцией по применению производителя набора. Выделенная ДНК, находящаяся в буферном растворе (далее – образец) хранится при минус 20⁰С не более 6 месяцев. Не допускается многократное замораживание-оттаивание образца.

Этап 2 Амплификация по участку гена SecY возбудителя лептоспироза с последующей электрофоретической детекцией продуктов амплификации

2.1 Амплификация (ПЦР) по участку гена SecY возбудителя лептоспироза осуществляется с использованием следующих компонентов:

- образец,
 - пара праймеров для амплификации фрагмента гена SecY возбудителя лептоспироза: Lepto2_secY F (5'-AGTCAAGAATGGGCTGGATGG-3'); Lepto2_secY R (5'-GGTGСТААТGССАААССТGC-3'),

- 10x ПЦР-буфер,
- 50мМ MgCl₂,
- 25мМ смесь дезоксирибонуклеозидтрифосфатов,
- фермент Taq-полимераза 5 Ед/мкл,
- деионизованная вода.

Размер амплифицируемого фрагмента – 293 пары оснований.

ПЦР-смесь (реакционную смесь) готовить в отдельной пробирке из расчета количества образцов +1 образец. Состав реакционной смеси представлен в таблице 1.

Таблица 1 – Состав реакционной смеси

Компонент	Объем,х1 образец	Конечная концентрация
Деионизованная вода	35 мкл	-
ПЦР-Буфер	5 мкл	1 х
MgCl ₂	2 мкл	2 мМ
Праймер Lepto2_secY F	1 мкл	0,2 мкМ
Праймер Lepto2_secY R	1 мкл	0,2 мкМ
Смесь дНТФ	0,5 мкл	0,25 мМ
Taq-полимераза	0,5 мкл	2,5 Ед
Общий объем: 45 мкл		

ПЦР-смесь перемешать и осадить.

Добавить по 45 мкл ПЦР-смеси в пробирки объемом 0,2 мл для каждого исследуемого образца и внести по 5 мкл исследуемой ДНК в каждую пробирку. Смесь аккуратно перемешать на вортексе, центрифугировать при 6000 об./мин. 10-15 секунд.

Пробирки поместить в амплификатор. Программа проведения ПЦР представлена в таблице 2.

Таблица 2 – Программа проведения ПЦР

№	Этап	Температура, °С	Продолжительность	Ко-во циклов
1.	Денатурация	95	2 мин	1
2.	Денатурация	95	10 сек	35
	Отжиг	58	10 сек	
	Элонгация	72	30 сек	
3.	Элонгация	72	5 мин	1

В качестве негативного контроля использовать стерильную дистиллированную воду (либо буфер TE), не содержащую фрагментов ДНК.

Положительный контроль - ДНК, выделенная от эталонного штамма *Leptospira interrogans* (процедура осуществляется в соответствии с этапом 1).

2.2 Электрофорез продуктов амплификации проводить в агарозном геле с использованием этидиум бромид в качестве интеркалирующего красителя ДНК. Концентрация геля – 1,5%, буферы –ТВЕ или ТАЕ. Учёт результатов проводить с использованием гелъдокументирующей системы.

2.3 Вырезать с помощью скальпеля или лезвия фрагмент агарозного геля, соответствующий интересующему фрагменту ДНК, не затрагивая другие фрагменты.

2.4 Выполнить очистку продуктов амплификации согласно инструкции по применению производителя набора реагентов для проведения очистки продуктов амплификации после электрофаретической детекции.

Этап 4 Постановка секвенирующей ПЦР

4.1 Постановка секвенирующей ПЦР для определения нуклеотидных последовательностей

Секвенирующая ПЦР выполняется с подготовленными образцами. Состав реакционной смеси представлен в таблице 3.

Таблица 3 – Состав реакционной смеси

№	Наименование компонента	Объем (мкл)
1	BigDye terminator V.3.1	1,0
2	5X буфер	4,0
3	Праймер (F либо R) 5 пмоль/мкл	1,0
4	Деионизованная вода	13,0
5	Очищенный из геля фрагмент	1,0
Общий объем		20,0

Программа проведения ПЦР представлена в таблице 4.

Таблица 4 – Программа проведения ПЦР

№	Этап	Температура, °С	Продолжительность	Ко-во циклов
1.	Денатурация	96	1 мин	1
2.	Денатурация	96	15 сек	25
	Отжиг	50	15 сек	
3.	Элонгация	60	2 мин	

4.2 Очистка продуктов после секвенирующей ПЦР

Очистить продукты секвенирующей ПЦР от не включенных нуклеотидов с помощью метода спиртовой преципитации:

- перенести весь объем реакционной смеси в стерильную пробирку типа «Эппендорф» 1,5 мл (далее - пробирка);

- внести в каждую пробирку с образцом 2 мкл 50 мМ Na₂ЭДТА, 2 мкл 3М ацетата натрия, 50 мкл 96% этанола, содержимое пробирок перемешать, осадить капли кратковременным центрифугированием, далее пробирки заморозить в жидком азоте на 3 мин.;

- пробирки извлечь из жидкого азота, выдержать до полного оттаивания содержимого пробирки при комнатной температуре и далее центрифугировать при плюс 4°C 13 000 об./мин. в течение 15 мин.;

- супернатант медленно, избегая захватывания осадка, удалить, к осадку (как такового осадка не видно) во все пробирки (аккуратно по стенке пробирки) добавить 100 мкл 70% этанола;

- пробирки центрифугировать при плюс 4°C 13 000 об./мин. в течение 15 мин до образования супернатанта;

- супернатант медленно, избегая захватывания осадка, удалить, содержимое пробирок (как такового осадка не видно) подсушить в твердотельном термостате 5 мин при плюс 37°C;

- в каждую пробирку внести по 20 мкл формамида, перемешать с последующим осаждением капель кратковременным центрифугированием;

- пробирки с полученным содержимым прогреть при плюс 95°C в твердотельном термостате 2 мин;

4.3 Внести по 10 мкл содержимого полученных образцов в планшет автоматического генетического анализатора и провести процедуру активации и запуска программы автоматического секвенирования, в результате чего определится нуклеотидная последовательность выделенного фрагмента ДНК патогенных лептоспир.

4.4 Учет результатов секвенирующей ПЦР

4.4.1 Выполнить биоинформационный анализ результатов капиллярного электрофореза с использованием таких программных продуктов, как Sequencing Analysis Software V.6, BioEdit v7.2, SeqScape v.3, что в итоге позволит получить консенсусные последовательности *Leptospira spp.*

4.4.2 Обработать результаты секвенирования фрагментов генома патогенных лептоспир и сопоставить их с нуклеотидными

последовательностями, депонированными в международной базе данных GenBank, с использованием on-line программы BLAST: Basic Local Alignment Search Tool (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

Осуществить филогенетический анализ консенсусных последовательностей специфического фрагмента генома возбудителя лептоспироза - ген SecY - с использованием программного обеспечения MEGA 11 и др.

Перечень ошибок при выполнении и пути их устранения

При соблюдении этапов технологии осуществления метода ошибки исключены.

Использование метода молекулярно-генетического типирования патогенных лептоспир подразумевает строгое следование всем правилам организации и проведения исследований в ПЦР-лаборатории.

Возможны следующие ошибки:

- 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);
- контаминация рабочих поверхностей амплификонами.

Пути устранения ошибок:

- провести исследование повторно начиная с этапа выделения ДНК;
- соблюдать последовательность операций при выполнении исследований, соблюдать объемы реактивов;
- точно следовать инструкциям по эксплуатации приборов;
- внутренний контроль смывов на наличие амплификонов с целью избегания контаминации - 1 раз в неделю.