

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель Министра
Главный государственный
санитарный врач
Республики Беларусь

Н.П. Жукова
2019 г.
Регистрационный № 006-0619

МЕТОДЫ КАЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИЕРСИНИЙ В
ОБЪЕКТАХ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ ЧЕЛОВЕКА И
БИОЛОГИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ ЧЕЛОВЕКА И ТЕПЛОКРОВНЫХ
ЖИВОТНЫХ
инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: Государственное учреждение
«Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и
микробиологии», Государственное учреждение «Республиканский центр
гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья»

АВТОРЫ: канд. биол. наук Семижон П.А., канд. биол. наук,
Счеслёнок Е.П., Федорович Е.В., Лешкевич А.Л., Бусел С.А.,
Касницкая Т.Н., Бурдейко Е.Ю., д-р. мед. наук, проф. Владыко А.С.

Минск, 2019

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель министра —
Главный государственный
санитарный врач
Республики Беларусь

_____ Н. П. Жукова
20.06.2019
Регистрационный № 006-0619

**МЕТОДЫ КАЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИЕРСИНИЙ
В ОБЪЕКТАХ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ ЧЕЛОВЕКА
И БИОЛОГИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ ЧЕЛОВЕКА
И ТЕПЛОКРОВНЫХ ЖИВОТНЫХ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: ГУ «Республиканский научно-практический
центр эпидемиологии и микробиологии», ГУ «Республиканский центр гигиены,
эпидемиологии и общественного здоровья»

АВТОРЫ: канд. биол. наук П. А. Семижон, канд. биол. наук Е. П. Счесленок,
Е. В. Федорович, А. Л. Лешкевич, С. А. Бусел, Т. Н. Касницкая,
Е. Ю. Бурдейко, д-р мед. наук, проф. А. С. Владыко

Минск 2019

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложены методы качественного определения иерсиний в объектах окружающей среды человека и биологическом материале человека и теплокровных животных с применением полимеразной цепной реакции (ПЦР), мультипраймеровой ПЦР, которые могут быть использованы в комплексе медицинских услуг, направленных на диагностику и медицинскую профилактику заболеваний, вызываемых иерсиниями.

Настоящая инструкция предназначена для врачей лабораторной диагностики, оказывающих медицинскую помощь пациентам в стационарных и/или амбулаторных условиях, и/или условиях отделения дневного пребывания, а также организаций здравоохранения, осуществляющих государственный санитарный надзор.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

Таблица 1. — Изделия медицинской техники для молекулярно-генетического анализа

Пробоподготовка и выделение ДНК
ПЦР-бокс с УФ-рециркулятором воздуха
Микроцентрифуга высокоскоростная (с ротором для 1,5 мл пробирок типа «эппендорф», 10 000–18 000xg)
Твердотельный термостат (диапазон температур от -10 до 99 °С)
Микроцентрифуга-вортекс
Аспиратор с колбой-ловушкой
Дозаторы пипеточные механические переменного объема, комплект (2–20; 20–200; 100–1000 мкл)
Холодильник (диапазон рабочих температур от 2 до 4 °С)
Морозильная камера (диапазон рабочих температур от -16 до -18 °С)
Весы лабораторные электронные (диапазон от 0,01 до 210 г)
ПЦР-реакция
Амплификатор (термоциклер) с оптическим модулем
ПЦР-бокс с УФ-рециркулятором воздуха
Микроцентрифуга-вортекс
Твердотельный термостат (диапазон температур от -10 до 99 °С)
Дозаторы пипеточные механические переменного объема, комплект (2–20; 20–200; 100–1000 мкл)
Холодильник (диапазон рабочих температур от 2 до 4 °С)
Морозильная камера (диапазон рабочих температур от -16 до -18 °С)
Электрофоретическая детекция
Микроцентрифуга-вортекс
Дозаторы пипеточные механические переменного объема, комплект (2–20; 20–200; 100–1000 мкл)
Холодильник (диапазон рабочих температур от 2 до 4 °С)
Морозильная камера (диапазон рабочих температур от -16 до -18 °С)
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 для ПЦР и электрофоретической детекции

Пробоподготовка и выделение ДНК	
Хлорид натрия (NaCl)	
Трис(гидроксиметил)аминометан (Трис)	
Соляная кислота концентрированная (HCl)	
Гидроксид натрия (NaOH)	
Гидроксид калия (KOH)	
Наборы реагентов для выделения ДНК из клинического материала (фекалии, моча, плазма крови, смыв из зева), объектов окружающей среды, культуры бактерий	
ПЦР-реакция	
10x буфер для Taq-полимеразы	
Taq-полимераза 5 ед/мкл	
Хлорид магния 50 мМ	
Смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (дНТФ) 25 мМ	
Синтетические олигонуклеотиды (5–20 пМ)	
Вода для молекулярной биологии (свободная от RNКаз/ДНКаз)	
<i>Проведение электрофоретической детекции</i>	
Набор реагентов для горизонтального электрофореза в агарозном геле	
Маркер молекулярных масс (от 50 п.о., 100 п.о.)	

Таблица 3. — Изделия медицинского назначения

Вакутайнеры
Контейнеры пластиковые для забора клинического материала
Пробирки пластиковые типа «фальконе» (15; 50 мл)
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
Микроцентрифужные стерильные пробирки объемом 1,5 мл
Шприцевой фильтр с диаметром пор 0,22 мкм
Шприц медицинский на 50 мл
Халаты, резиновые перчатки, фильтровальная бумага, штативы для пробирок

Качество используемых реактивов должно соответствовать техническим требованиям, предъявляемым к реагентам для выполнения молекулярно-биологических исследований.

Таблица 4. — Приготовление растворов

Забуференный физиологический раствор (ЗФР). Натрия хлорид 0,9 %, рН 7,2–7,4 (0,9 г NaCl растворить в 100 мл воды, довести рН NaOH до 7,2–7,4, профильтровать через фильтр 0,22 мкм, хранить при 4 °С)
Гидроксид калия 0,72 % (0,72 г KOH растворить в 100 мл воды, профильтровать через фильтр 0,22 мкм, хранить при 4 °С)
Гидроксид натрия 25 мМ (0,1 г NaOH растворить в 100 мл воды, профильтровать через фильтр 0,22 мкм, хранить при 4 °С)
Трис HCl 80 мМ рН 7,5 (0,97 г Трис растворить в 80 мл воды, довести рН до 7,5 концентрированной HCl, добавить воду до 100 мл, профильтровать через фильтр 0,22 мкм, хранить при 4 °С)

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Энтерит, вызванный *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica* (МКБ-10: А04.6, А28.2), заболевания с поражением желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) (МКБ-10: А04.8, А09), эпидемиологический надзор за циркуляцией возбудителей иерсиниозов в природных и антропоургических очагах.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Метод качественного определения иерсиний в биологическом материале человека

Материалом для исследования являются пробы клинического материала (фекалии, моча, кровь, смыв из зева) от пациентов с проявлениями, не исключающими иерсиниозную этиологию заболевания.

Взятие материала от пациентов (таблица 5) осуществляется не позднее 7–10 сут от начала заболевания (острая инфекция) для исследования с использованием ПЦР. В случае генерализованной инфекции сроки забора образцов для постановки ПЦР не лимитированы.

Таблица 5. — Взятие материала для исследования от пациентов

Вид исследуемого материала	Количество	Правила взятия	Правила взятия, подготовка к исследованию в ПЦР
Фекалии	0,5–1,0 г	Из судна ложечкой, прилагаемой к контейнеру, или ректальным зондом	В одноразовый контейнер
Моча	20–30 мл средней порции утренней мочи	–	В одноразовый контейнер
Смыв из зева	–	Натощак с задней стенки глотки и корня языка тампоном, смоченным в физиологическом растворе	В одноразовую пробирку тампон поместить в 5,0 мл ЗФР
Кровь	5–10 мл	Стерильно из локтевой вены	В одноразовую пробирку — вакутайнер с наполнителем антикоагулянт (ЭДТА)

Иерсинии в отличие от других бактерий семейства *Enterobacteriaceae* являются психрофильными бактериями, способными к росту и размножению при более низкой температуре (4–10 °С). Метод холодного обогащения (ХО) используют для повышения концентрации иерсиний в исследуемом материале. Исследуют пробы в 1-е сут их получения и в случае отрицательного результата на 2–3 сут после ХО в ЗФР, рН 7,2–7,4 либо в фосфатно-буферном растворе (ФБР) рН 7,6–7,8.

Приготовление образцов для исследования

Подготовка пробы фекалий

Фекалии разводят в 5–10 мл ЗФР в соотношении 1:10. 0,5 мл суспензии смешивают с 0,5 мл 0,72 % раствора КОН (1:1) в 1,5 мл пробирке типа «эппендорф» и выдерживают 30 с. Добавляют 0,5 мл (2:1) буферного раствора (в этом качестве может использоваться ФБР, бульон Хоттингера, забуференная пептонная вода, пептонно-калиевая среда; приложение 2 к инструкции по применению «Лабораторная диагностика псевдотуберкулеза и кишечного иерсиниоза» от 19.03.2010 № 076-0210). Смесь центрифугируют при 10 000 об/мин в течение 5 мин, надосадочную жидкость удаляют. Осадок дважды промывают дистиллированной водой: добавляют 0,8 мл воды, ресуспендируют содержимое на вортексе и центрифугируют при 10 000 об/мин в течение 5 мин, надосадочную жидкость удаляют. Растворяют осадок в 20 мкл деионизированной воды, ресуспендируют содержимое на вортексе, осаждают капли с поверхности крышки кратковременным центрифугированием на вортексе. Содержимое пробирки прогревают при 100 °С в течение 10 мин, образовавшийся конденсат осаждают центрифугированием при 10 000 об/мин в течение 2 мин, надосадочную жидкость в количестве 5 мкл используют для исследования в ПЦР.

Для ХО 1 мл подготовленной 10 % суспензии фекалий, предварительно осадив грубые частицы кратковременным центрифугированием на вортексе, вносят в пробирку с 5 мл ФБР, встряхивают и помещают в холодильник (температура 4 °С). После инкубации (2–3 сут) из пробирки отбирают 0,5 мл материала и готовят проб, как описано выше.

Подготовка пробы мочи

Пробу мочи переносят в пластиковую центрифужную пробирку (50 мл) и центрифугируют при 4000 об/мин в течение 10 мин. Надосадок удаляют и осадок ресуспендируют в 200–300 мкл ФБР. Полученный материал используют для выделения ДНК.

Для ХО 100 мкл суспендированного осадка вносят в пробирку с 5 мл ФБР, встряхивают и помещают в холодильник (температура 4 °С). После инкубации из верхней трети пробирки отбирают материал в количестве, необходимом для выделения ДНК согласно инструкции, прилагаемой к коммерческому набору.

Подготовка пробы смыва из зева

Материал переносят в центрифужную пробирку, предварительно тщательно отжав и удалив тампон, центрифугируют при 4000 об/мин в течение 10 мин. Надосадок удаляют и осадок ресуспендируют в 200–300 мкл ФБР. Полученный материал используют для выделения ДНК.

Для ХО отбирают 100 мкл ресуспендированного осадка, дальнейшие манипуляции проводят, как описано выше.

Подготовка пробы крови

Для получения плазмы забор крови производят в вакутайнер с наполнителем (ЭДТА) и аккуратно переворачивают несколько раз (для перемешивания с антикоагулянтom). Плазму крови получают

центрифугированием пробирок с цельной кровью при 800–1600g (3000 об/мин) в течение 20 мин при комнатной температуре либо помещают в холодильник на 1–2 ч 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 ДНК.

Экстракция ДНК

ДНК бактерий выделяют с использованием готовых коммерческих наборов. Для этих целей может быть использован любой набор реагентов, зарегистрированный в установленном порядке на территории Республики Беларусь.

ПЦР в режиме реального времени

Анализ проб ДНК, полученных из клинического материала пациентов, производят с использованием дифференцирующих ПЦР-наборов, позволяющих выявлять ДНК возбудителей кишечного иерсиниоза и псевдотуберкулеза: ДНК *Y. enterocolitica* и *Y. pseudotuberculosis* в режиме реального времени. Для этих целей могут быть использованы любые диагностические наборы, зарегистрированные в установленном порядке на территории Республики Беларусь. Постановка реакции, учет и оценка полученных результатов производятся согласно инструкции по применению, прилагаемой к набору.

Метод качественного определения иерсиний в объектах окружающей среды человека и теплокровных животных

Взятие материала из объектов окружающей среды: смывы с овощей, фруктов, оборудования, инвентаря, тары для хранения и органов (кишечник) грызунов осуществляются в соответствии с таблицей 6.

Таблица 6. — Взятие материала для исследования из объектов окружающей среды

Вид исследуемого материала	Количество	Правила взятия	Правила взятия, подготовка к исследованию в ПЦР
Овощи, фрукты	10 шт. каждого вида	Смыв одним влажным стерильным тампоном с поверхностей на границе здоровой и загнивающей части	Тампон помещают в одноразовую пробирку с 5–7 мл ЗФР либо ФБР
Смывы с оборудования, инвентаря, тары	10 одноименных поверхностей	Одним влажным стерильным тампоном с поверхностей площадью 100 см ² каждая	Тампон помещают в одноразовую пробирку с 5–7 мл ЗФР либо ФБР
Тонкий кишечник	1,0–2,0 г	Сразу после вскрытия грызунов забирают стерильно участок в месте перехода тонкой кишки в толстую с содержимым	В одноразовую пробирку с 5–7 мл ЗФР либо ФБР

Приготовление образцов для исследования

Подготовка проб смывов

Из пробы, предварительно тщательно отжав, удаляют тампон и из общего объема (5–7 мл) отбирают 1 мл материала в пластиковую 1,5 мл пробирку и центрифугируют при 4000 об/мин в течение 10 мин. Надосадок удаляют и осадок ресуспендируют в 200–300 мкл ФБР. Полученный материал используют для выделения ДНК.

Для повышения концентрации иерсиний в исследуемом материале пробы инкубируют при температуре 4 °С в течение 10–14 сут (ХО): материал отбирается на 5–7-е и 10–14-е сут ХО из верхней трети пробирки.

Подготовка проб органов (кишечник) грызунов

Пробы (пробирки с помещенным в них участком кишечника) инкубируют при температуре 4 °С в течение 10–14 сут для повышения концентрации иерсиний в исследуемом материале (ХО); взятие материала для исследований осуществляется на 5–7-е и 10–14-е сут ХО из верхней трети пробирки.

Экстракция ДНК

ДНК бактерий выделяют с использованием готовых коммерческих наборов. Для этих целей может быть использован любой набор реагентов, зарегистрированный в установленном порядке на территории Республики Беларусь.

Проведение ПЦР в режиме реального времени

Анализ проб ДНК, выделенных из объектов окружающей среды и органов теплокровных животных (мелкие грызуны) производят в 2 этапа.

Этап 1 — скрининг образцов на наличие возбудителей иерсиниоза методом ПЦР в режиме реального времени с целью выявления ДНК бактерий рода *Yersinia*. Материал, прошедший ХО, анализируют на 5–7-е и 10–14-е сут (в пробах с отрицательным результатом). Для этих целей могут быть использованы любые диагностические наборы, зарегистрированные в установленном порядке на территории Республики Беларусь. Постановка реакции, учет и оценка полученных результатов производятся согласно инструкции по применению, прилагаемой к набору.

Параллельно производят посев материала (используют только те пробы, в которых была выявлена ДНК иерсиний) на плотные дифференциально-диагностические среды для выделения изолятов иерсиний с использованием бактериологических методов.

Этап 2 — анализ проб, в которых была выявлена ДНК бактерий рода *Yersinia*, с использованием ПЦР-наборов, позволяющих выделять ДНК возбудителей кишечного иерсиниоза и псевдотуберкулеа: ДНК *Y. enterocolitica* и *Y. pseudotuberculosis*. Для этих целей могут быть использованы любые диагностические наборы, зарегистрированные в установленном порядке на территории Республики Беларусь. Постановка реакции, учет и оценка полученных результатов производятся согласно инструкции по применению, прилагаемой к набору.

Метод идентификации и характеристики изолятов иерсиний

Подготовка проб бактериальной культуры

Бактериальная культура в жидкой питательной среде

Культуру бактерий, выращенную на плотной дифференциально-диагностической среде (СБТС, Эндо, ЦДС; (приложение 2 к инструкции по применению «Лабораторная диагностика псевдотуберкулеза и кишечного иерсиниоза», утвержденной Министерством здравоохранения Республики Беларусь от 19.03.2010 № 076-0210) или других коммерческих дифференциальных средах, разрешенных к применению на территории Республики Беларусь, на агаризованных сколах либо чашках Петри в виде отдельных колоний высевают в жидкую питательную среду (5–10 мл) и инкубируют в термостате при 26 °С в течение 24 ч. Объем отбираемой пробы лимитируется выбранным набором реагентов для выделения ДНК согласно прилагаемой инструкции.

Бактериальная культура в виде изолированных колоний

Изолированные колонии бактерий, выращенные на плотной дифференциально-диагностической среде, забирают бактериальной петлей и вносят в 1,5 мл пробирку с 50 мкл 25 мМ NaOH, ресуспендируют до гомогенной субстанции и прогревают при 100 °С в течение 10 мин. После кипячения капли с поверхности крышки осаждают кратковременным центрифугированием на вортексе, добавляют 50 мкл (1:1) 80 мМ Трис HCl pH 7,5 (реакция нейтрализации) и центрифугируют при 13 000 об/мин в течение 5 мин. Супернатант переносят в чистую 1,5 мл пробирку и в количестве 2–5 мкл используют для исследования в ПЦР. Оставшийся материал подлежит хранению в морозильнике при температуре от -18 до -20 °С в течение 1 года.

Экстракция ДНК

ДНК бактерий выделяют с использованием готовых коммерческих наборов. Для этих целей может быть использован любой набор реагентов, зарегистрированный в установленном порядке на территории Республики Беларусь.

ПЦР в режиме реального времени

Метод ПЦР, позволяющий выявлять в образцах ДНК *Yersinia*, используется для подтверждения принадлежности выделенных изолятов бактерий к роду *Yersinia*. Возбудитель в пробах, содержащих ДНК иерсиний, идентифицируют с помощью дифференцирующей ПЦР, в результате которой выявляются ДНК *Y. enterocolitica* и *Y. pseudotuberculosis*. Для анализа проб ДНК изолятов бактерий используют ПЦР-наборы, позволяющие выявлять ДНК бактерий рода *Yersinia*, и дифференцирующие ПЦР-наборы, позволяющие выявлять ДНК возбудителей кишечного иерсиниоза и псевдотуберкулеза: ДНК *Y. enterocolitica* и *Y. pseudotuberculosis*. Для этих целей могут быть использованы любые диагностические наборы, зарегистрированные в установленном порядке на территории Республики Беларусь. Простановка реакции, учет и оценка полученных результатов производятся согласно инструкции по применению, прилагаемой к набору.

ПЦР и электрофоретическая детекция продуктов амплификации

Метод ПЦР с электрофоретической детекцией используется для молекулярно-генетического анализа выделенной культуры иерсиний. Данные исследования выполняются специалистами Республиканского референс-центра по диагностике особо опасных, природно-очаговых и вновь возникающих инфекций РНПЦ эпидемиологии и микробиологии. Метод мультипраймеровой ПЦР, разработанной на основе генетической организации O-ag геномных кластеров (O-генотипирование) основных серотипов *Yersinia enterocolitica*, патогенных для человека (0:8, 0:3, 0:9, 0:5,27) и *Yersinia pseudotuberculosis* (0:1a, 0:1b, 0:1c) используется для серо-генотипирования иерсиний.

O-генотипирование *Yersinia enterocolitica*

Мультипраймеровую ПЦР для O-генотипирования *Y. enterocolitica* выполняют с использованием праймеров для амплификации фрагментов ДНК генов *Y. enterocolitica* с различным количеством нуклеотидных пар (н.п.) оснований в соответствии с определенным серотипом патогена. Структура праймеров и программа ПЦР приведены в таблицах 7 и 8.

Таблица 7. — Структура праймеров для ПЦР с целью определения серогенотипа *Yersinia enterocolitica*

Название праймера	Нуклеотидная последовательность 5' → 3'	Размер ДНК-фрагмента	Серо-генотип
perFW – прямой	TCCTTCTCCAAATATATAGGTGCCA	837 н.п.	0:9
perRV – обратный	ATGCGGCATTAGATGAGATGGA		
wztFW – прямой	GTTAGTTCCTGCATCTGATCGCC	662 н.п.	0:5,27
wztRV – обратный	ATCCAGCATCCATGGCTCC		
wbbUFW – прямой	ACCTCGTATTTTTGAAGATGATCGC	463 н.п.	0:3
wbbURV – обратный	GТАCTCAАТААСТTGCTGTTCCGG		
wbcAFW – прямой	TGATGAACGAGGCGAGTTTGT	269 н.п.	0:8
wbcARV – обратный	TACTCCGTCTGTTATGCGGATTTA		

Таблица 8. — Программа для ПЦР

Этап	Температура, °C	Продолжительность	Количество циклов
Денатурация	95	5 мин	1
Денатурация	95	40 с	35
Отжиг	58	40 с	
Элонгация	72	60 с	
Элонгация	72	8 мин	1
Охлаждение	4	3 мин	1

Для постановки реакции готовят реакционную смесь (из расчета на 1 реакцию в объеме 50 мкл): по 1 мкл праймеров perFW, perRV, wztFW, wztRV, wbbUFW, wbbUR, wbcAFW и wbcARV (20 пкмоль/мкл каждый), 1 мкл дНТФ, 5 мкл буфера для ПЦР 10xTaq-буфер, 4 мкл MgCl₂, 26,5 мкл воды

деионизованной, 0,5 мкл Taq-ДНК полимеразы. Смесь перемешивают на вортексе и вносят 5 мкл ДНК анализируемой пробы.

В результате ПЦР амплифицируются специфические фрагменты ДНК размером, соответствующим определенному серотипу анализируемой пробы *Y. enterocolitica*. Электрофоретическая детекция в качестве примера представлена на рисунке 1. Для анализа были использованы референс-штаммы *Y. enterocolitica*, зарегистрированные в Специализированной коллекции вирусов и бактерий, патогенных для человека №№ 343, 344 — *Y. enterocolitica*, серотип 0:5,27, № 346 — *Y. enterocolitica*, серотип 0:8 (паспорта №№ СКВБ-В-1-2017-445, СКВБ-В-1-2017-444, СКВБ-В-1-2017-443 соответственно от 01.06.2017), выделенные из объектов окружающей среды, и изолят № 1556 — *Y. enterocolitica*, серотип 0:3, выделенный из цельного молока.

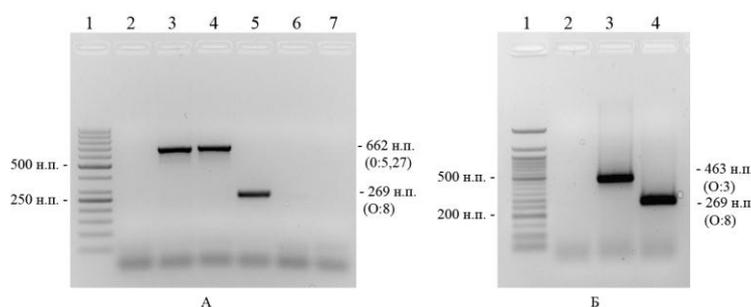


Рисунок 1. — Электрофоретическая детекция продуктов ПЦР с праймерами для O-генотипирования *Yersinia enterocolitica*

O-генотипирование *Yersinia pseudotuberculosis*

Мультипраймерную ПЦР для O-генотипирования *Y. pseudotuberculosis* проводят с использованием праймеров для амплификации специфических фрагментов ДНК. Структура праймеров и программа проведения ПЦР приведены в таблицах 9 и 10.

Таблица 9. — Структура праймеров для ПЦР с целью определения серогенотипа *Yersinia pseudotuberculosis*

Название праймера	Нуклеотидная последовательность 5' → 3'	Размер ДНК фрагмента	Ген
Ypf-14159 – прямой	TCAAGATCGCCATGAGAC	1370 н.п.	<i>gmd-fcl</i>
Ypr-15549 – обратный	AGGTTCATTCGTTGGTTC		
Ypf-5270 – прямой	CGCATAGAAGAGTTTGTTG	1072 н.п.	<i>ddhC-prt</i>
Ypr-6342 – обратный	CTTTCGCCTGAAATTAGAC		
Ypf-17770 – прямой	TTGGAGAAACAAACSTATCTGG	644 н.п.	<i>wbyL</i>
Ypr-18414 – обратный	TTTGCATAAAAACGACATAGGC		
Ypf-7170 – прямой	CGTTATCCCAAAAAGAGG	528 н.п.	<i>wbyH</i>
Ypr-7698 – обратный	ATGGGAGACGCTTGTGATG		

Таблица 10. — Программа для ПЦР

Этап	Температура, °С	Продолжительность	Количество циклов
Денатурация	94	2 мин	1
Денатурация	9	15 с	35
Отжиг	53	30 с	
Элонгация	72	90 с	
Элонгация	72	5 мин	1

Для постановки реакции готовят реакционную смесь (из расчета на 1 реакцию в объеме 50 мкл): по 1 мкл праймеров Ypf-14159, Ypr-15549 (10 пкмоль/мкл), Ypf-5270, Ypr-6342 (12,5 пкмоль/мкл), Ypf-17770, Ypr-18414 (7,5 пкмоль/мкл), Ypf-7170, Ypr-7698 (5 пкмоль/мкл), 1 мкл дНТФ, 5 мкл буфера для ПЦР 10xTaq-буфер, 4 мкл MgCl₂, 26,5 мкл воды деионизованной, 0,5 мкл Taq-ДНК полимеразы. Смесь перемешивают на вортексе и вносят 5 мкл ДНК анализируемой пробы.

В таблице 11 приведена интерпретация результатов определения серогенотипа *Yersinia pseudotuberculosis* по совокупности идентифицированных фрагментов ДНК.

Таблица 11. — Интерпретация результатов О-генотипирования *Yersinia pseudotuberculosis*

Серотип	Размер фрагмента, н.п.	Ген	Количество фрагментов
0:1a	1. 1072 2. 528	1. <i>ddhC-prt</i> 2. <i>wbyH</i>	2
0:1b	1. 1370 2. 1072 3. 664 4. 528	1. <i>gmd-fcl</i> 2. <i>ddhC-prt</i> 3. <i>wbyL</i> 4. <i>wbyH</i>	4
0:1c	1. 1370 2. 528	1. <i>gmd-fcl</i> 2. <i>wbyH</i>	2

Электрофоретическая детекция в качестве примера представлена на рисунке 2. Для анализа были использованы референс-штамм *Y. pseudotuberculosis* «Могилев», серотип 0:1b, зарегистрированный в Специализированной коллекции вирусов и бактерий, патогенных для человека (депонент от 04.06.2015 № В-2/15), и изолят № 1201, выделенные из органов (кишечник) грызунов.

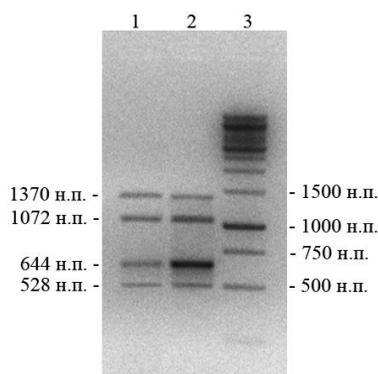


Рисунок 2. — Электрофоретическая детекция продуктов ПЦР с праймерами для О-генотипирования *Yersinia pseudotuberculosis*

Выявление гена патогенности *Yersinia enterocolitica*

Наличие гена *ail*, кодирующего белок адгезии/инвазии, является показателем вирулентности штаммов *Y. enterocolitica*. Установлено, что белок *ail* принимает участие в адгезии и инвазии микроорганизмов, а также придает им устойчивость к воздействию иммунной системы человека. Для выявления гена патогенности *Y. enterocolitica* используют праймеры, позволяющие выявлять методом ПЦР специфический ДНК-фрагмент гена *ail* размером 431 н.п. Структура праймеров приведена в таблице 12.

Таблица 12. — Структура праймеров для ПЦР с целью выявления гена патогенности *Y. enterocolitica*

Название праймера	Нуклеотидная последовательность 5' → 3'	Размер ДНК-фрагмента
ailYenFW – прямой	TGTTAATGTGTACGCTGCGAGT	431 н.п.
ailYenRW – обратный	GTTTGGAGTATTCATATGAAGCGTC	

Для постановки реакции готовят реакцию смесь (из расчета на 1 реакцию в объеме 50 мкл): по 1 мкл праймеров ailYenFW и ailYenRW (20 пкмоль/мкл каждый), 1 мкл смеси дНТФ, 5 мкл буфера для ПЦР 10xTaq-буфер, 4 мкл MgCl₂, 32,5 мкл воды деионизованной, 0,5 мкл Taq-ДНК полимеразы. Смесь перемешивают на вортексе и вносят 5 мкл ДНК анализируемой пробы. Программа для ПЦР аналогична представленной в таблице 8. Электрофоретическая детекция в качестве примера представлена на рисунке 3. Для анализа был использован референс-штамм № 346 — *Y. enterocolitica*, серотип 0:8 (смыв с моркови), зарегистрированный в Специализированной коллекции вирусов и бактерий, патогенных для человека (СКВБ-В-И-2017-443 от 01.06.2017).

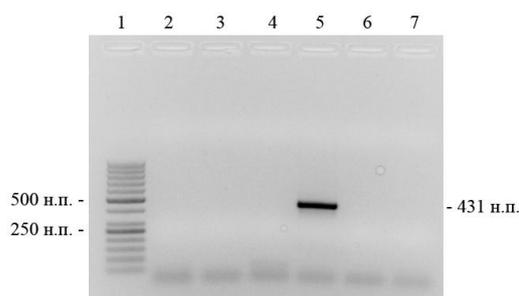


Рисунок 3. — Электрофоретическая детекция продуктов ПЦР с целью выявления гена *ail*

Заключение

Использование в лабораторной диагностике экспресс-метода ПЦР повышает эффективность исследований, направленных на выявление возбудителей иерсиниоза, и позволяет в короткие сроки диагностировать заболевание у человека. Экспресс-метод ПЦР при первичном скрининге на наличие возбудителей иерсиниоза в пробах, полученных из объектов окружающей среды, и образцах органов мелких грызунов выполняются с использованием 2-этапного подхода: первоначальное выявление генетического материала бактерий, относящихся к роду *Yersinia*, и последующая дифференциация с целью выделения ДНК возбудителей кишечного иерсиниоза и псевдотуберкулеза: ДНК *Y. enterocolitica* и *Y. pseudotuberculosis*, что позволяет в короткие сроки оценить загрязненность объектов окружающей среды и инфицированность грызунов иерсиниями.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Молекулярно-генетические исследования подразумевают соблюдение правил на всех этапах работы: взятие биоматериала, транспортировка, хранение и пробоподготовка; выделение нуклеиновых кислот, амплификация и детекция. При несоблюдении данных правил возникают ошибки, 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 ДНК; загрязненные в результате предыдущих исследований реагенты, необработанный инструментарий.

Причины ложноотрицательных результатов: деградация исследуемой ДНК, несоблюдение технологии выделения нуклеиновых кислот, нарушение правил 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.