

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель Министра здравоохранения –
Главный государственный
санитарный врач Республики Беларусь

И.В. Гаевский



« 18 »

2014 г.

Регистрационный №

13-1114

**МЕТОД МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНДИКАЦИИ
БАКТЕРИЙ РОДА LISTERIA И ИДЕНТИФИКАЦИИ ВИДА
LISTERIA MONOCYTOGENES**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

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

АВТОРЫ:

Бакаева Т.Н., Титов Л.П., Газиумарова Л.Д.

Минск, 2014

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель министра –
Главный государственный
санитарный врач
Республики Беларусь

_____ И.В. Гаевский
18.12.2014
Регистрационный № 013-1114

**МЕТОД МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНДИКАЦИИ БАКТЕРИЙ
РОДА *LISTERIA* И ИДЕНТИФИКАЦИИ ВИДА *LISTERIA*
*MONOCYTOGENES***

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: ГУ «Республиканский научно-практический
центр эпидемиологии и микробиологии»

АВТОРЫ: Т.Н. Бакаева, д-р мед. наук, проф., чл.-корр. НАНБ, засл. деятель
науки РБ, иностр. чл. РАМН Л.П. Титов, канд. биол. наук Л.Д. Газиумарова

Минск 2014

Настоящая инструкция по применению (далее — инструкция) предназначена для молекулярно-генетической индикации бактерий рода *Listeria* и идентификации вида *Listeria monocytogenes*, совершенствования эпидемиологического мониторинга за возбудителем листериозной инфекции.

Инструкция предназначена для врачей-бактериологов, врачей-эпидемиологов, врачей-лаборантов, врачей-инфекционистов, иных врачей-специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

1. Весы.
2. Вортекс-шейкер.
3. Источник постоянного тока для электрофореза.
4. Камера для горизонтального электрофореза.
5. Ламинарный бокс с бактерицидной лампой.
6. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 13 тыс. об./мин.
7. Набор для выделения ДНК из образцов.
8. Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема (с аэрозольным барьером).
9. Одноразовые пластиковые микропробирки для ПЦР на 0,5; 1,5 мл.
10. Отдельные наборы автоматических пипеток переменного объема.
11. Реактивы для проведения ПЦР — олигонуклеотиды; фермент *Taq* ДНК-полимераза (5 ед./мкл); 10×премикс дНТФ; 10×буфер для *Taq* полимеразы без $MgCl_2$; 25 мМ раствор $MgCl_2$; минеральное масло.
12. Реактивы для проведения электрофореза — 6×буфер для загрузки образцов в гели (10 мМ Трис-НСl, 0,04%-й бромфеноловый синий); O'Gene Ruler1kb DNA Ladder; агароза LE; бромистый этидий; 50×ТАЕ буфер для электрофореза.
13. Твердотельный термостат для микропробирок на 1,5 и 0,5 мл.
14. Термоциклер для проведения ПЦР.
14. Источник постоянного тока для электрофореза.
15. Холодильник на 2–8°C с морозильной камерой.
16. Ультрафиолетовый трансиллюминатор для просмотра гелей.
17. Штативы для микропробирок, автоматических пипеток и наконечников к автоматическим пипеткам.
18. Электроплитка или микроволновая печь для плавления агарозы.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Необходимость выявления и определения рода и вида листерий у пациентов с подозрением на листериоз:

- беременные, имеющие отягощенный акушерско-гинекологический анамнез (патология беременности и предшествующих родов, гриппоподобные заболевания, токсикозы, ангины);

- женщины вне беременности: наличие в анамнезе повторных ангин, воспаление яичников, шейки матки, отягощенный акушерский анамнез;
- пожилые лица и лица с иммунодефицитом с признаками менингита и менингоэнцефалита без установленной ранее причины состояния;
- лица с наличием любой инфекционной симптоматики, употреблявшие заведомо инфицированную листериями продукцию;
- новорожденные при подозрении на листериозную инфекцию (с клиникой септицемии, пневмонии либо гнойного плеврита);
- для осуществления контроля качества продовольственного сырья и пищевых продуктов на наличие *Listeria monocytogenes* в порядке осуществления санитарно-эпидемиологического надзора, а также эпидрасследования заболеваний листериозом.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

1. Подготовка образцов

1.1. Материал для исследований

- мазки из зева, отделяемое глаз, кровь (при септической форме), спинномозговая жидкость, околоплодная жидкость, плацента, отделяемое урогенитального тракта; от новорожденных (кровь, меконий, моча);
- культура микроорганизмов;
- продовольственное сырье и продукты животного происхождения.

При отборе образцов, а также подготовке проб для исследования необходимо соблюдать меры, предупреждающие обсеменение объектов внешней среды, руководствуясь при этом действующими правилами и инструкциями по данному вопросу: «Правила проведения работ в диагностических лабораториях, использующих метод полимеразной цепной реакции».

Мазки-соскобы берут общепринятыми методами.

Кровь в объеме 2–3 мл забирают в пробирку с антикоагулянтом ЭДТА.

Спинномозговую жидкость в количестве не менее 1 мл собирают, используя одноразовые иглы, в одноразовые пластиковые пробирки объемом 1,5 или 2,0 мл. Предварительной обработки проб не требуется.

Образцы плаценты размером 3×3×3 мм³ помещают в пробирки типа «эппендорф», тщательно растирают отдельными стеклянными палочками, добавляют по 1 см³ физиологического раствора и тщательно перемешивают. Смесь отстаивают при температуре 20–25°C в течение 20 мин, после чего 100 мкл верхней фазы используют для выделения ДНК.

Мочу в количестве 15–20 мл забирается в специальный сухой стерильный флакон или контейнер на 50–60 мл.

Культуры микроорганизмов: колонию микроорганизмов ресуспендируют в 1 мл 0,9%-го раствора натрия хлорида. Полученную суспензию используют для выделения ДНК.

Используют нативные пищевые продукты либо после предварительной инкубации в среде для накопления листерий.

Твердые пищевые продукты в количестве 1-10 г помещают в стерильную ступку, добавляют 0,9%-й раствор натрия хлорида в соотношении 1:10 и растирают до гомогенного состояния. Отстаивают и через ватный тампон отбирают надосадочную жидкость, из которой проводят выделение ДНК. Жидкие пищевые продукты в объеме 0,2 мл переносят в микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 или 2,0 мл для выделения ДНК.

1.2. Выделение ДНК

ДНК бактерий выделяют стандартным методом с использованием коммерческого набора для выделения ДНК в соответствии с прилагаемой инструкцией. Выделенные образцы ДНК хранят при -20°C.

2. Полимеразная цепная реакция

Все олигонуклеотиды синтезируют под заказ. Для удобства использования готовят раствор с концентрацией 10 пмоль/мкл. Разведение праймеров готовят по формуле:

$$V = C_k \times V_k / C_u,$$

где V — необходимый объем праймера;

C_k — конечная концентрация праймера (10 пмоль/мкл);

V_k — конечный объем смеси (25 мкл);

C_u — исходная концентрация праймера.

2.1. ПЦР для идентификации рода *Listeria*

В целях родовой идентификации методом ПЦР в качестве мишени используют праймеры для амплификации гена *Prs*, кодирующего родоспецифический белок — фосфорибозилфосфатсинтазу, участвующую в общем метаболизме бактериальной клетки.

Таблица 1. — Последовательность праймеров для гена *Prs*

Ген	Последовательность, 5'-3'	Размер фрагмента
Прямой	5'-GCATTGCGTGAAGCTGGCCA-3'	211 п.о.
Обратный	5'-CAGAAGCATTTTCATGAAC-3'	

Состав реакционной смеси представлен в таблице 2. Общий объем реакционной смеси составляет 25 мкл.

Таблица 2. — Состав реакционной смеси для обеих ПЦР

Реагент	Количество на 1 пробу
10X ПЦР-буфер	2,5 мкл
Прямой праймер 10 пмоль	1 мкл
Обратный праймер 10 пмоль	1 мкл
MgCl ₂ 25 ммоль	2 мкл
ДНК-полимераза 5 Ед/мкл	0,25
ДНК	2,5 мкл
дНТФ	0,5 мкл
Деионизованная вода	До объема 25 мкл

В каждую пробирку добавляют одну каплю минерального масла для предотвращения испарения реакционной смеси в процессе амплификации.

Пробирки с реакционной смесью помещают в программируемый термоциклер, где проводится амплификация по заданной программе (таблица 3). Алгоритм регулирования — «точный».

Параллельно с опытными пробами ставятся контрольные: положительный и отрицательный контроль. Положительный контроль — контрольный препарат ДНК исследуемого возбудителя; отрицательный контроль — деионизованная вода.

При достижении в ячейке амплификатора температуры 80–94°C ставят программу на паузу, пробирки помещают в ячейки амплификатора, закрывают крышку и снимают программу с паузы.

Таблица 3. — Программа амплификации гена Prs

Цикл	Процесс	Температура	Время	Количество циклов
1	Денатурация	94°C	2 мин	1
2	Денатурация	94°C	5 с	5
	Отжиг	50°C	5 с	
	Элонгация	72°C	5 с	
3	Денатурация	94°C	2 с	25
	Отжиг	50°C	2 с	
	Элонгация	72°C	2 с	
4	Хранение	10°C	20 мин	1

2.2. ПЦР для идентификации *Listeria monocytogenes*

Для видовой дифференциации листерий и идентификации *Listeria monocytogenes* используют два типа праймеров: а) к гену *inlA*, кодирующему белок интерналин А, участвующий в инвазии эпителиальных клеток; б) к гену *Act*, амплифицирующие участок гена, ответственного за синтез поверхностного белка ActA, индуцирующего внутриклеточную полимеризацию актина и обеспечивающего способность возбудителя к передвижению в цитоплазме инфицированных клеток.

Таблица 4. — Последовательность праймеров для видовой идентификации *Listeria monocytogenes*

Ген	Последовательность, 5'-3'	Размер фрагмента
Act A	5'-AGG AAG GCG ACT GGG GCG GAG-3' 5'-TGG AAA TTC GAA TGA GCT CGG-3'	1453 п.о.
InlA	5'-AGC CAC TTA AGG CAA T-3' 5'-AGT TGA TGT TGT GTT AGA-3'	760 п.о.

Состав реакционной смеси такой же, как для постановки ПЦР для родовой идентификации. Пробирки с реакционной смесью помещают в программируемый термоциклер, где проводится амплификация по заданной программе (таблицы 5, 6). Алгоритм регулирования — «точный». При достижении в ячейке амплификатора температуры 80–94°C ставят программу на паузу, пробирки помещают в ячейки амплификатора, закрывают крышку и снимают программу с паузы.

Таблица 5. — Программа амплификации видового гена *InlA* для идентификации *Listeria monocytogenes*

Цикл	Процесс	Температура	Время	Количество циклов
1	Денатурация	94°C	2 мин	1
2	Денатурация	94°C	20 с	5
	Отжиг	43°C	20 с	
	Элонгация	72°C	20 с	
3	Денатурация	94°C	5 с	25
	Отжиг	43°C	5 с	
	Элонгация	72°C	5 с	
4	Хранение	10°C	20 мин	1

Таблица 6. — Программа амплификации видового гена *AstA* для идентификации *Listeria monocytogenes*

Цикл	Процесс	Температура	Время	Количество циклов
1	Денатурация	94°C	2 мин	1
2	Денатурация	94°C	20 с	5
	Отжиг	60°C	20 с	
	Элонгация	72°C	20 с	
3	Денатурация	94°C	10 с	25
	Отжиг	60°C	10 с	
	Элонгация	72°C	10 с	
4	Хранение	10°C	20 мин	1

3. Анализ продуктов ПЦР-амплификации. Контроль наличия продуктов амплификации проводят методом электрофореза в 1,5% агарозном геле с последующим окрашиванием бромистым этидием. Агарозный гель (1,5–2%) готовят путем добавления 1,5–2 г агарозы на 100 мл 1х ТАЕ или ТБЕ буфера. Агарозу плавят на водяной бане при 100°C или в микроволновой печи до полного расплавления. Буфер для электрофореза: ТАЕ (50х) на 1 л: 0,04 М Трис-ацетат (242 г Трис, 57,1 мл ледяной уксусной кислоты), 0,002 М ЭДТА (100 мл 0,5 М ЭДТА, рН 8,0). ТБЕ (5х) на 1 л: 0,089 М Трис-борат (54 г Трис,

27,5 г борной кислоты), 0,002 М ЭДТА (20 мл 0,5 М ЭДТА, рН 8,0). Бромистый этидий (10 мг/мл) вносят в расплавленную агарозу, остывшую до 55–60°C, в конечной концентрации 0,1–10 мкг/мл.

Постановка электрофореза:

- в электрофорезную кювету вставляют гребенку так, чтобы расстояние между дном кюветы и зубцами гребенки составляло 1 мм;

- подготовленную агарозу заливают в электрофорезную кювету с гребенкой и дают ей застыть;

- после застывания агарозы гребенку аккуратно достают, стараясь не повредить образовавшиеся лунки, гель помещают в прибор для электрофореза так, чтобы лунки располагались ближе к отрицательному электроду;

- прибор для электрофореза наполняют 1X буфером ТАЕ или ТБЕ так, чтобы гель был полностью им покрыт;

- 10 мкл ПЦР-амплифицированной подготовленной пробы вносят в чистые пробирки и добавляют 3 мкл буфера для проб, перемешивают;

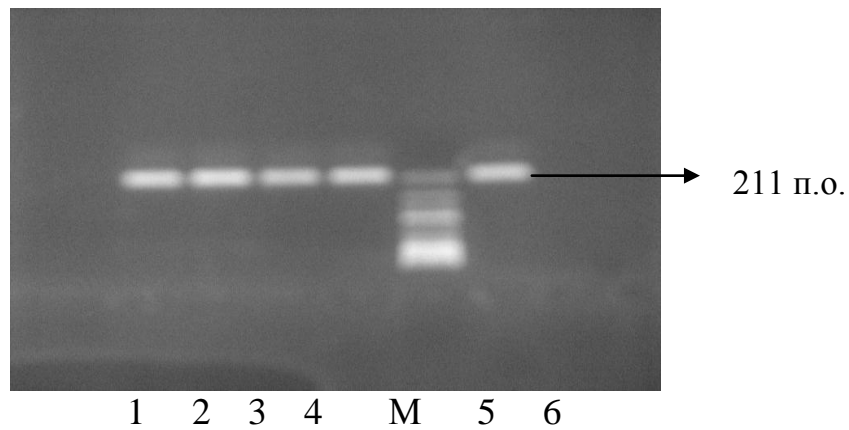
- через слой жидкости, внимательно, в отдельные лунки вносят по 15 мкл пробы, положительный, отрицательный контроли и ДНК маркера;

- электрофорез проводят при напряжении 10 В/см.

4. Учет результатов

Учет результатов проводят визуально с помощью трансиллюминатора. При этом агарозный гель либо достают из кюветы и помещают на стекло трансиллюминатора либо используют емкости из УФ-проницаемых материалов. Качество проведенного анализа считается удовлетворительным при выполнении следующих условий: наличие в дорожке положительного контрольного образца полосы ДНК специфического размера; отсутствие специфической полосы в дорожке отрицательного контрольного образца. Во всех других случаях результаты исследования не учитываются. Проба считается положительной при наличии в соответствующей дорожке геля полосы ДНК, совпадающей по размеру (т. е. находящейся на одном уровне) с полосой положительного контроля. Размер полос определяют по соотношению с ДНК-маркером. Результаты фиксируют посредством фотографирования или видеосъемкой геля при использовании УФ-фильтров.

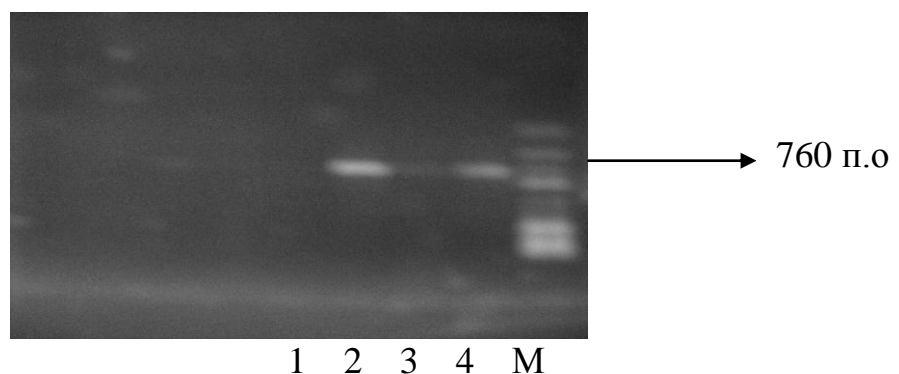
Положительными считаются образцы, которые содержат специфическую светящуюся полосу на уровне 211 п.о. большей или меньшей интенсивности, подтверждают принадлежность к роду *Listeria*.



Линия 1 — продукт амплификации изолята бактерии *Listeria innocua* 24; линия 2 — продукт амплификации изолята бактерии *Listeria ivanovii* 19119; линия 3 — продукт амплификации изолята бактерии *Listeria monocytogenes* 975; линия 4 — продукт амплификации изолята бактерии *Listeria welshimeri* 305/4; линия М — маркер молекулярного веса ДНК; линия 5 — продукт амплификации контрольного образца изолята бактерии *Listeria monocytogenes* ATCC 7644; линия 6 — отрицательный контроль

Рисунок 1. — Электрофореграмма результатов амплификации родового гена Prs

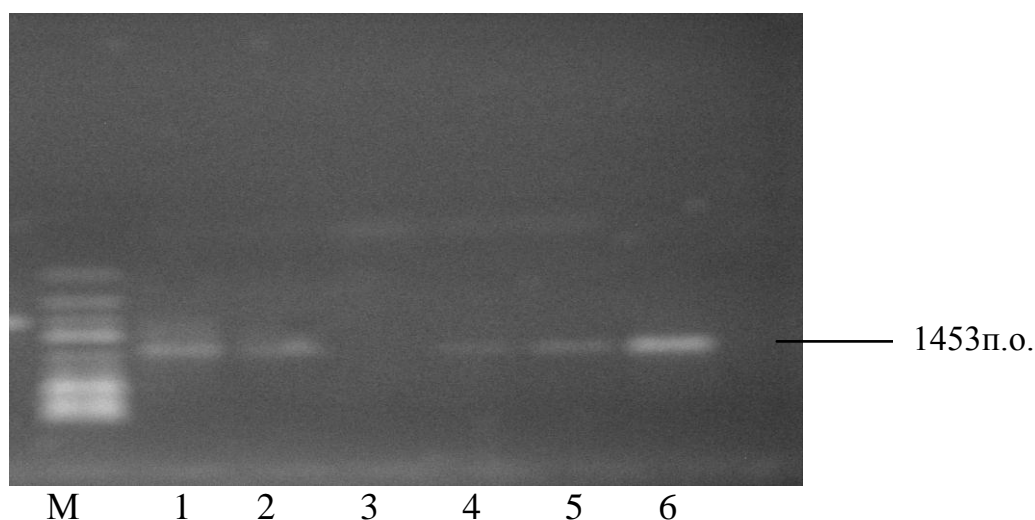
Положительными считаются образцы, которые содержат специфическую светящуюся полосу на уровне 760 п.о. большей или меньшей интенсивности.



Линия 1 — отрицательный контроль; линия 2 — положительный контроль; линия 3 — искомый видоспецифичный фрагмент изолята *Listeria monocytogenes* 975; линия 4 — искомый видоспецифичный фрагмент изолята *Listeria monocytogenes* 32991; линия М — маркер молекулярного веса ДНК

Рисунок 2. — Электрофореграмма результатов амплификации видового гена InlA *Listeria monocytogenes*

Положительными считаются образцы, которые содержат специфическую светящуюся полосу на уровне 1453 п.о. большей или меньшей интенсивности, что указывает на принадлежность к виду *Listeria monocytogenes*.



Линии М — маркер молекулярного веса ДНК; линия 1 — искомый видоспецифичный фрагмент гена изолята *Listeria monocytogenes* 5760; линия 2 — искомый видоспецифичный фрагмент изолята *Listeria monocytogenes* 975; линия 3 — отрицательный контроль; линия 4 — искомый видоспецифичный фрагмент изолята *Listeria monocytogenes* 5917; линия 5 — искомый видоспецифичный фрагмент изолята *Listeria monocytogenes* 32991; линия 6 — положительный контроль

Рисунок 3. — Электрофореграмма результатов амплификации видового гена ActA

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Отсутствие специфической полосы в пробе положительного контроля или ее наличие в пробе отрицательного контроля свидетельствует о невозможности учета результатов реакции.

Отсутствие специфической полосы в препарате положительного контроля может быть следствием деградации ДНК на одном из этапов исследования и/или внесения в реакцию ингибиторов реакции. Пути устранения: на всех этапах исследования необходимо использование одноразовой стерильной пластиковой посуды и наконечников во избежание внесения ингибиторов реакции.

Наличие специфической полосы в препарате отрицательного контроля свидетельствует о контаминации проб. Пути устранения:

- соблюдение пространственного разделения рабочих зон;
- работа только в одноразовых перчатках и их смена при переходе из одной зоны в другую;
- использование отдельных комплектов спецодежды для каждого из рабочих зон.