

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ  
Первый заместитель Министра  
Д.Д. Пиневиц  
«*16*» *августа* 2019 г.  
Регистрационный № 051-0419



**МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ СИКВЕНС-ТИПОВ И КЛОНАЛЬНЫХ  
КОМПЛЕКСОВ ИНВАЗИВНЫХ *N. MENINGITIDIS* И *S. PNEUMONIAE***

(инструкция по применению)

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

АВТОРЫ: д-р мед. наук, профессор, член-корреспондент НАН Беларуси  
Титов Л.П., Хархаль А.Н.

Минск, 2019

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ  
Первый заместитель министра

\_\_\_\_\_ Д. Л. Пиневиц  
25.04.2019

Регистрационный № 051-0419

**МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ СИКВЕНС-ТИПОВ И КЛОНАЛЬНЫХ  
КОМПЛЕКСОВ ИНВАЗИВНЫХ *N. MENINGITIDIS* И *S. PNEUMONIAE***

инструкция по применению

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

АВТОРЫ: д-р мед. наук, проф., чл.-кор. НАН Беларуси Л. П. Титов, А. Н. Хархаль

Минск 2019

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен метод определения сиквенс-типов (СТ) и клональных комплексов (КК) инвазивных *N. meningitidis* и *S. pneumoniae*, который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на диагностику и медицинскую профилактику заболеваний, вызванных названными микроорганизмами.

Мультилокусное сиквенс-типирование (МЛСТ) менинго- и пневмококков — это современная технология, базирующаяся на секвенировании высококонсервативных внутренних фрагментов 7 генов «домашнего хозяйства» (ГДХ), которые экспрессируются на всех стадиях клеточного цикла, и широко применяемая в системе эпидемиологического надзора в качестве «золотого стандарта» для мониторинга популяции микроорганизма на конкретной территории, планирования и проведения эффективных мероприятий по профилактике инфекционных заболеваний и бактерионосительства.

Инструкция предназначена для врачей лабораторной диагностики, врачей-бактериологов, врачей-эпидемиологов, иных врачей-специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам в стационарных и (или) амбулаторных условиях, и (или) в условиях отделения дневного пребывания, и (или) осуществляющих государственный санитарный надзор.

## ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

Таблица 1. — Изделия медицинской техники для секвенирования

<i>Экстракция ДНК</i>	
ПЦР-бокс	
Микроцентрифуга для пробирок типа «эппендорф» (10 000–15 000xg)	
Термостат твердотельный для микропробирок на 1,5 и 0,5 мл (диапазон рабочих температур от 25 до 99 °С)	
Микроцентрифуга-вортекс	
Комплект пипеточных дозаторов (0,5–10; 20–200; 200–1 000 мкл)	
Холодильник, диапазон рабочих температур от 2 до 4 °С	
Морозильная камера, диапазон рабочих температур от -16 до -20 °С	
Бактерицидная УФ-лампа	
<i>ПЦР-реакция</i>	
ПЦР-бокс	
Термоциклер для ПЦР	
Микроцентрифуга-вортекс	
Бактерицидная УФ-лампа	
Комплект пипеточных дозаторов (0,5–10; 20–200 мкл)	
Холодильник, диапазон рабочих температур от 2 до 4 °С	
Морозильная камера, диапазон рабочих температур от -16 до -20 °С	
<i>Электрофоретическая детекция</i>	
Микроцентрифуга-вортекс	
Комплект пипеточных дозаторов (0,5–10; 20–200 мкл)	
Холодильник, диапазон рабочих температур от 2 до 4 °С	
Морозильная камера, диапазон рабочих температур от -16 до -20 °С	
Система для проведения горизонтального гель-электрофореза	
Источник постоянного тока для электрофореза	

### Продолжение таблицы 1

УФ-трансиллюминатор
Бактерицидная УФ-лампа
<i>Очистка продуктов реакции циклического секвенирования</i>
Комплект пипеточных дозаторов (0,5–10; 20–200 мкл)
Микроцентрифуга-вортекс
Морозильная камера, диапазон рабочих температур от -16 до -20 °С
Микроцентрифуга для пробирок типа «эппендорф» (10 000–17 000xg)
<i>Секвенирование</i>
Секвенатор ДНК

Таблица 2. — Реактивы для секвенирования

<i>Выделение ДНК</i>
Набор реагентов для выделения ДНК из биологического материала
Набор реагентов для выделения ДНК из культур микроорганизмов
Набор реагентов для выделения ДНК из агарозного геля
<i>ПЦР-реакция</i>
Набор реагентов для проведения ПЦР
ДНК-полимераза с буфером
Раствор MgCl <sub>2</sub> (25 мМ)
Смесь дНТФ (10 мМ)
Олигонуклеотидные праймеры 20 пМ
Вода стерильная бидистиллированная свободная от нуклеаз
Набор реагентов для реакции циклического секвенирования
<i>Электрофоретическая детекция</i>
Агароза для электрофореза
Маркер молекулярного веса (от 100 п.о., 1 000 п.о.)
ТАЕ-буфер
Бромистый этидий
<i>Очистка продуктов реакции циклического секвенирования</i>
Этанол медицинский 96,6 %
Этанол медицинский 70 %
Ацетат натрия (3М)
ЭДТА (125 мМ)
Формаид
<i>Секвенирование</i>
Набор реагентов в соответствии с инструкцией производителя секвенатора

### **ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ**

Менингококковая инфекция (МКБ10–А39); пневмококковая инфекция (А40).

### **ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ**

Отсутствуют.

### **ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА**

Материалом для исследования являются ДНК менинго- и пневмококков, выделенных из чистых культур бактерий или биологического материала.

### Экстракция ДНК менинго- и пневмококков

Тотальную ДНК выделяют с использованием коммерческого набора, предназначенного для выделения ДНК из биологического материала (СМЖ, кровь, мазки носоглотки и т. д.) или из чистых культур микроорганизмов. Выделенные образцы ДНК хранят при -20 °С не более 1 года. Допускается хранение биологического материала при -70 °С не более 1 года для повторного выделения ДНК.

#### ПЦР для амплификации генов «домашнего хозяйства»

ГДХ менингококков, используемые для МЛСТ: *abcZ* (АВС-переносчик), *adk* (аденилатциклаза), *aroE* (шикиматдегидрогеназа), *fumC* (фумаратгидратаза), *gdh* (глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа), *pdhC* (субъединица пируватдегидрогеназы) и *pgm* (фосфоглюкомутаза). ГДХ пневмококков, используемые для МЛСТ: *aroE* (шикиматдегидрогеназа), *gdh* (глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа), *gki* (глюкокиназа), *recP* (транскетолаза), *spi* (сигнальная пептидаза), *xpt* (ксантин-фосфорибозилтрансфераза), *dll* (D-аланин-D-аланинлигаза).

Последовательности праймеров представлены в таблице 3. Объем смеси для амплификации генов «домашнего хозяйства» составляет 25 мкл (таблица 4).

Таблица 3. — Праймеры для амплификации ГДХ менингококков и пневмококков

Ген	Последовательность, 5'– 3'	Размер ампликона
Гены «домашнего хозяйства» менингококков		
<i>abcZ</i>	F: TGTTCGCTTCGACTGCCAAC R: TCCCCGTCGTA AAAACAATC	433 п.о.
<i>adk</i>	F: CCAAGCCGTGTAG AATCGTAAACC R: TGCCCAATGCGCCCAATAC	465 п.о.
<i>aroE</i>	F: TTTGAAACAGGCGGTTGCGG R: CAGCGGTAATCCAGTGCGAC	490 п.о.
<i>fumC</i>	F: TCCCCGCCGTA AAAAGCCCTG R: GCCCGTCAGCAAGCCCAAC	465 п.о.
<i>gdh</i>	F: CTGCCCCCGGGGTTTTTCATCT R: TGTTGCGCGTTATTTCAAAGAAGG	501 п.о.
<i>pdhC</i>	F: CCGGCCGTACGACGCTGAAC R: GATGTCGGAATGGGGCAAACA	480 п.о.
<i>pgm</i>	F: CTTC AAAGCCTACGACATCCG R: CGGATTGCTTTCGATGACGGC	450 п.о.
Гены «домашнего хозяйства» пневмококков		
<i>aroE</i>	F: TCCTATTAAGCATTTCTATTTCTCCCTTC R: ACAGGAGAGGATTGGCCATCCATGCCCACTG	405 п.о.
<i>gdh</i>	F: ATGGACAAACCAGCNAGYTT R: GCTTGAGGTCCCATRCTNCC	460 п.о.
<i>gki</i>	F: GGCATTGGAATGGGATCACC R: TCTCCCGCAGCTGACAC	483 п.о.
<i>recP</i>	F: GAATGTGTGATTCAATAATCACC TCAAATAGAAGG R: TGCTGTTTCGATAGCAGCATGGA TGGCTTCC	450 п.о.

Продолжение таблицы 3

<i>spi</i>	F: TTATTCCTCCTGATTCTGTC R: GTGATTGGCCAGAAGCGGAA	474 п.о.
<i>xpt</i>	F: TTAACSTTTTAGACTTTAGGAGGTCTTATG R: CGGCTGCTTGCGAGTGTTTTTCTTGAG	486 п.о.
<i>ddl</i>	F: TAAAATCACGACTAAGCGTGTTCTGG R: AAGTAGTGGGTACATAGACCACTGGG	441 п.о.

Таблица 4. — Компоненты реакционной смеси ПЦР

Компонент	Необходимое количество на одну ПЦР
Вода для ПЦР	до 25 мкл
Буфер для ДНК-полимеразы (10x)	2,5 мкл
Раствор MgCl <sub>2</sub> (25 мМ)	3 мкл
Смесь дНТФ (10 мМ)	0,5 мкл
Прямой праймер (F) (20 мМ)	0,25
Обратный праймер (R) (20 мМ)	0,25
ДНК-полимераза (5 ЕД/мкл)	0,2 мкл
Образец ДНК	2–5 мкл

Амплификация проводится в автоматическом режиме по заданным программам, представленным в таблице 5.

Таблица 5. — Условия амплификации фрагментов ГДХ менинго- и пневмококков

Гены	Шаг	Температура	Время
ГДХ менингококков	Денатурация 35 циклов	94 °С	4 мин
		95 °С	25 с
		62 °С	35 с
		72 °С	55 с
		72 °С	1 мин
ГДХ пневмококков	Денатурация 30 циклов	94 °С	5 мин
		95 °С	15 с
		54 °С	30 с
		72 °С	45 с
		72 °С	10 мин
	Элонгация	72 °С	

Анализ продуктов амплификации осуществляют методом электрофореза в 1,5 % агарозном геле с последующим окрашиванием бромистым этидием (0,5 мг/мл) и детекцией в ультрафиолетовом трансиллюминаторе (312 нм). Образец аккуратно вырезают из геля и выделяют ДНК коммерческим набором для выделения ДНК из агарозного геля в соответствии с инструкцией производителя.

#### Реакция циклического секвенирования

Реакция циклического секвенирования осуществляется с применением коммерческих наборов, разработанных для использования на соответствующей модели секвенатора. В реакции используется только один праймер. Необходимо проводить две реакции: с прямым и обратным праймером, последовательности которых представлены в таблице 4. Постановку реакции осуществляют в соответствии с инструкцией к используемому набору.

### **Очистка продуктов реакции циклического секвенирования**

Очистка продуктов реакции циклического секвенирования производится методом переосаждения, который включает следующие этапы:

- приготовление осаждающей смеси (50 мкл 96,6 % этанола, 2 мкл 3М ацетата натрия, 2 мкл 125 mM ЭДТА);
- внесение в осаждающую смесь 10 мкл полученного продукта реакции циклического секвенирования;
- интенсивное перемешивание содержимого пробирок и инкубация 10 мин при комнатной температуре;
- центрифугирование 15 мин при 17 000 g;
- плавно удаляется надосадочная жидкость, вносится 70 мкл 70 % ледяного этанола;
- инкубация 15–20 мин при температуре -20 °С;
- центрифугирование 10 мин при 17 000 g;
- после удаления надосадочной жидкости открытые пробирки инкубируются при 70 °С 3–4 мин;
- после внесения 15 мкл формамида инкубация с закрытой крышкой при 70 °С 1 мин.

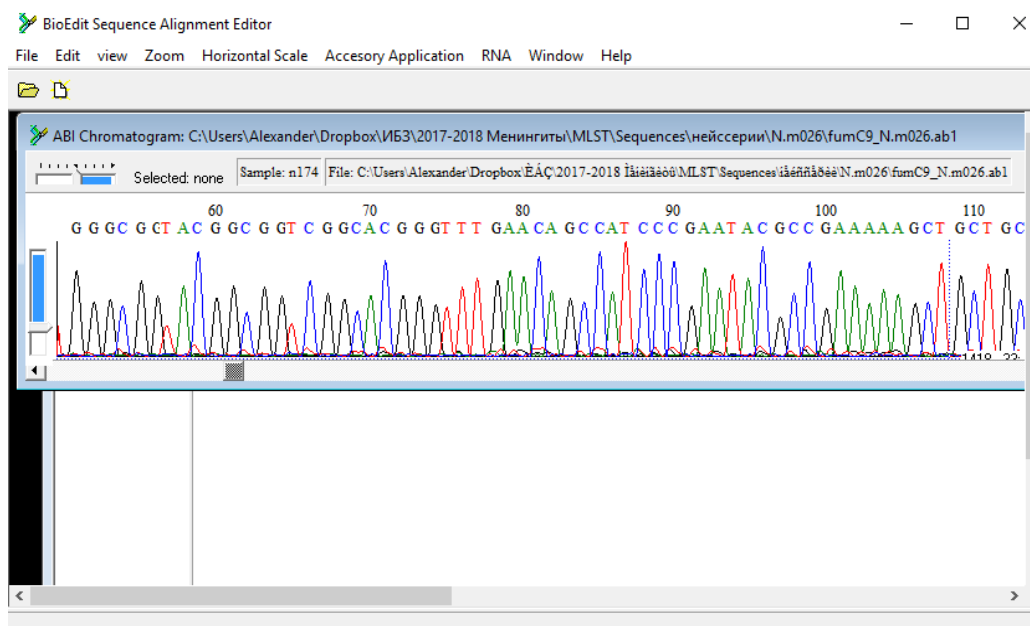
Также очистка возможна с использованием коммерческих наборов в соответствии с инструкцией производителя.

### **Секвенирование фрагментов ГДХ**

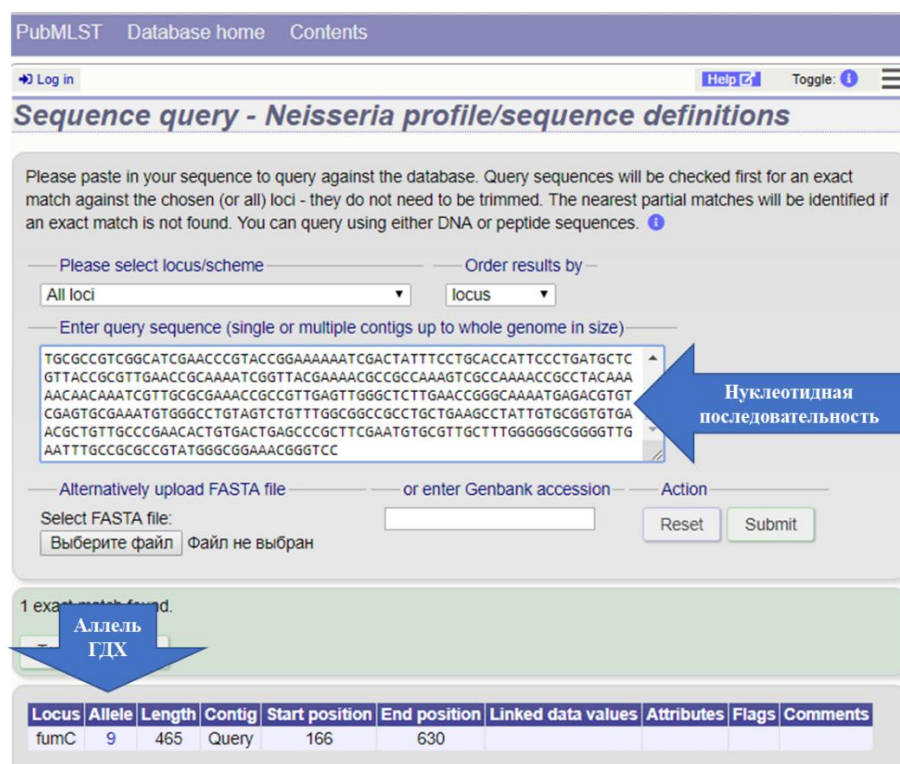
Электрофоретическое разделение продуктов реакции циклического секвенирования и распознавание последовательности ДНК осуществляется с помощью секвенатора в соответствии с инструкцией к прибору с использованием соответствующего программного обеспечения.

### **Определение аллелей ГДХ**

При получении нуклеотидных последовательностей высокого качества прочтения (ошибки прочтения не более 5–10 %) (рисунок 1) определяются аллели всех 7 генов путем сравнения с референтными последовательностями базы данных PubMLST <https://pubmlst.org/neisseria/> для ГДХ менингококков и <https://pubmlst.org/spneumoniae/> для ГДХ пневмококков (рисунок 2).



**Рисунок 1. — Нуклеотидная последовательность высокого качества прочтения (BioEdit Sequence Alignment Editor)**



**Рисунок 2. — Определение аллели ГДХ *fumC* в базе данных PubMLST**

### Определение сиквенс-типа

После исследования аллелей каждого из 7 генов для определенного изолята, с использованием базы данных PubMLST (<http://pubmlst.org/>) устанавливается СТ (аллельный профиль), соответствующий определенной комбинации 7 аллелей (рисунок 3). В случае отсутствия в базе определенных комбинаций аллелей подается заявка на депонирование последовательностей ДНК нового СТ с



выдачей номера нового СТ. С помощью алгоритма BURST ([http://eburst.mlst.net/v3/mlst\\_datasets](http://eburst.mlst.net/v3/mlst_datasets)) определяется КК, который представляет собой группу взаимосвязанных СТ, берущих начало от общего предка. В базе данных pubMLST также возможно рассчитать отношение установленного СТ к определенному КК (рисунок 3).

### Заключение

К преимуществам МЛСТ относятся возможность исследования биологического материала без необходимости получения жизнеспособной чистой культуры микроорганизма, анализ данных и сопоставление результатов независимо работающих лабораторий по всему миру через интернет. Данные секвенирования являются мощным инструментом работы эпидемиологов для мониторинга циркулирующих на конкретных территориях типов менингококков и пневмококков, скрининговых исследований бактерионосителей, прогнозирования эффективности санации и вакцинации.

PubMLST Database home Contents

Log in Help Toggle

**Search *Neisseria* profile/sequence definitions database by combinations of loci**

Schemes

Please select the scheme you would like to query:

MLST Select

Please enter your allelic profile below. Blank loci will be ignored.

abcZ	adk	aroE	fumC	gdh	pdhC	pgm
2	3	4	3	8	4	6

Autofill profile

ST: Autofill

Options

Search: Exact or nearest match

Display/sort options

Order by: ST ascending

Display: 25 records per page

Action

Reset Submit

7 matches found (7 loci).

Word returned. Click the hyperlink for detailed information.

ST	abcZ	adk	aroE	fumC	gdh	pdhC	pgm	clonal complex
11	2	3	4	3	8	4	6	ST-11 complex

Analysis tools:

Export Profiles Sequences

**Рисунок 3. — Определение сиквенс-типа и клонального комплекса менингококка в базе данных PubMLST**

## ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

В таблице 6 представлены наиболее часто возникающие ошибки при применении метода, изложенного в настоящей инструкции, их возможные причины и пути устранения.

Таблица 6. — Возможные ошибки или осложнения и пути их устранения

Возможная причина	Пути устранения
<i>Отсутствие специфических продуктов ПЦР</i>	
Дегградация или низкая концентрация ДНК	Повторное выделение ДНК методом, обеспечивающим достаточный выход; соблюдение сроков и условий хранения ДНК
Реагенты: несоблюдение концентраций компонентов реакции, условий и сроков хранения	Исключить ошибки приготовления реакционной смеси; использовать качественные реагенты, соблюдать условия и сроки хранения
Присутствие ингибиторов ПЦР	Выделение ДНК методом, обеспечивающим высокую степень очистки (выход ДНК более 90 %); использование одноразовой стерильной пластиковой посуды и наконечников на всех стадиях работы
<i>Наличие неспецифических продуктов ПЦР</i>	
Использование экстрагированной ДНК, из клинических образцов	Предварительная детекция генов менингококка и/или пневмококка в образце
Исследование ДНК возбудителей других видов	Предварительная детекция генов менингококка и/или пневмококка в образце
Низкая концентрация ДНК	Увеличение объема вносимой ДНК
<i>Наличие специфических продуктов в отрицательном контроле</i>	
Контаминация	Использование одноразовой стерильной пластиковой посуды и наконечников, халатов, одноразовых перчаток; химическая и УФ-дезинфекция всех поверхностей рабочих зон
<i>Реакция циклического секвенирования</i>	
Слабый сигнал	Увеличение объема вносимой ДНК
Отсутствие сигнала	Проверка специфичности продукта и перевыделение ДНК из геля; качественная отмывка продукта реакции циклического секвенирования; увеличение объема вносимой ДНК
Гетерогенный сигнал	Проверка специфичности продукта и перевыделение ДНК из геля; прочтение последовательности с обратного праймера (F/R)
Преждевременный обрыв сигнала	Прочтение последовательности с обратного праймера(F/R); увеличение температуры денатурации в реакции циклического секвенирования
Наличие димеров пиков	Аккуратное вырезание фрагмента, содержащего основной продукт ПЦР; качественная отмывка продукта реакции циклического секвенирования