

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель министра здравоохранения
Главный государственный санитарный врач
Республики Беларусь

О.В. Арнаутов

11 апреля 2011 г.

Регистрационный № 115-1210

**МЕТОД ПЦР-ОПРЕДЕЛЕНИЯ РЕЗИСТЕНТНЫХ К АНТИБИОТИКАМ
МЕНИНГОКОККОВ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

ГУ «Республиканский научно-практический центр
эпидемиологии и микробиологии»

АВТОРЫ:

д-р. мед. наук., проф. Титов Л. П.,
Глазкова С. Э.,
Лебедев Ф.А.

Минск 2010

НАЗНАЧЕНИЕ И ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Настоящая инструкция предназначена для молекулярной диагностики резистентных к антибиотикам штаммов *Neisseria meningitidis*, для совершенствования эпидемиологического мониторинга за возбудителем менингококковой инфекции, циркулирующим на территории республики.

Перечень необходимого оборудования, реактивов

Все оборудование и реактивы должны быть зарегистрированы на территории Республики Беларусь.

1. Ламинарный бокс с бактерицидной лампой
2. Набор для выделения ДНК из образцов, зарегистрированный на территории РБ.
3. Одноразовая пластиковая посуда (микропробирки для ПЦР на 0,5 и 1,5 мл).
4. Отдельные наборы автоматических пипеток переменного объема для выделения ДНК и приготовления реакционной смеси, электрофореза (ТУ 9452-002-33189998-2002).
5. Штативы для микропробирок, автоматических пипеток и наконечников к автоматическим пипеткам.
6. Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема (с аэрозольным барьером).
7. Холодильник на 2–8 °С с морозильной камерой (ГОСТ 16317).
8. Твердотельный термостат для микропробирок на 0,5 и 1,5 мл.
9. Микроцентрифуга для пробирок на 0,5–1,5 мл до 16 тыс. об.
10. Вортекс-шейкер для микропробирок.
11. Термоциклер для проведения ПЦР (ТУ 9452-001-46482062-98).
12. Источник постоянного тока для электрофореза.
13. Камера для горизонтального электрофореза.
14. Ультрафиолетовый трансиллюминатор для просмотра гелей и/или прибор для фотодетекции гелей.
15. Микроволновая печь для плавления агарозы.
16. Весы.
17. ПЦР-смесь: набор реактивов для постановки ПЦР — Master Mix.
18. Масло минеральное для ПЦР (если отсутствует в наборе для ПЦР, а также если в работе используется термоциклер без нагревающейся крышки).
19. Вода для ПЦР (если не входит в комплект набора для ПЦР.) Можно использовать стерильную бидистиллированную воду, стерильную воду для инъекций, а также деионизированную воду для ПЦР заводского производства.
20. Реагенты для приготовления агарозного геля и постановки электрофореза:
 - Агароза.
 - Этидиум бромид.
 - ТАЕ буфер.
 - Нагрузочный краситель (если отсутствует в наборе для ПЦР).

[Введите текст]

- Маркер молекулярного веса.

21. Дезинфицирующие растворы (например, 3–6% H₂O₂ используют для обработки поверхности ПЦР-бокса и для обеззараживания одноразового пластика при постановке ПЦР).

ПОЛИМЕРАЗНО-ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) — искусственный процесс многократного копирования (амплификации) специфической последовательности ДНК, осуществляемый *in vitro*. Копирование ДНК при ПЦР осуществляется специальным ферментом — ДНК-полимеразой, как и в клетках живых организмов. ДНК-полимераза, двигаясь по одиночной цепи ДНК (матрице), синтезирует комплементарную ей последовательность ДНК. Важно, что ДНК-полимераза не может начать синтез цепи ДНК «с нуля», ей необходима короткая «затравочная» цепь РНК или ДНК, к которой она может начать присоединять нуклеотиды.

ПЦР для определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам применяется, когда результаты фенотипических тестов могут быть искажены в связи со снижением активности антимикробных препаратов в процессе длительного культивирования микроорганизмов или при назначении ранней антимикробной терапии. Резистентность к определенным препаратам часто бывает связана с различными механизмами и мутациями в различных генах, которые независимо влияют на фенотип.

Основные принципы ПЦР:

Основные принципы ПЦР, а также требования к организации рабочих зон для проведения молекулярных исследований описаны в Инструкции № 81 «О методах микробиологической диагностики менингококковой инфекции и бактериальных менингитов» от 13.02.2006.

Для ПЦР генов *N. meningitidis*, участвующих в процессах антибиотикорезистентности, амплифицируют внутренние фрагменты генов *gyrA*, *parC*, *penA* и *groB* (последовательности праймеров приведены в таблице 1).

Таблица 1

Праймеры, используемые для амплификации фрагментов генов *N. meningitidis*, участвующих в процессах антибиотикорезистентности

Ген	Последовательность праймеров	Размер продукта
<i>gyrA</i>	GyrA F 5'-GACGGCCTAAAGCCGGTGCA-3' GyrA R 5'-ATGTTGGTTCGCCATACCGAC-3'	431 п.н.
<i>parC</i>	ParC F 5'- GTTTCAGACGGCCAAAAGCCC-3' ParC R 5'- GGAACAACAGCAATTCGCAAT-3'	300 п.н.
<i>penA</i>	penA F 5'-ATCGAACAGGCGACGATGTC-3' penA R 5'-GATTAAGACGGTGTTTTGACGG-3'	500 п.н.
<i>groB</i>	RPO F 5'-AAAАСТGTCCGAAGCCCAACAAAАСТСТ-3' RPO R 5'-АТАТАТТGGACGCGGTTCCGGGCGTT-3'	790 п.н.

Подготовка проб

Для выделения ДНК подходят спинно-мозговая жидкость (СМЖ), кровь, чистая культура нейссерий.

Стадия подготовки образцов для ПЦР описана в Инструкции «О методах микробиологической диагностики менингококковой инфекции и бактериальных менингитов» от 13.02.06 № 81.

Приготовленные бактериальные суспензии или образцы СМЖ, плазмы крови могут быть исследованы немедленно и сохраняться в течение 1–3 дней при 4 °С, несколько месяцев при -20 °С, неограниченно при -70 °С. Необходимо избегать нескольких циклов замораживания-оттаивания образцов.

Экстракция ДНК из образцов

ДНК из крови и бактериальной суспензии выделяется стандартными методами лизиса/сорбции/отмывания с использованием набора для выделения ДНК в соответствии с прилагаемой инструкцией.

Образцы СМЖ можно использовать в реакции амплификации непосредственно. Перед исследованием проба (100 мкл ЦСЖ, покрытые сверху 100 мкл минерального масла) инкубируется в термостате для микропробирок 20 мин при 99 °С для разрушения бактерий, после чего центрифугируется при 10000 g в течение 1 мин при комнатной температуре, супернатант отбирается для постановки ПЦР.

В зависимости от метода выделения образцы ДНК могут храниться при -20 °С от 1 до 12 мес.

Проведение ПЦР

При каждой операции используют и меняют одноразовые наконечники для автоматических пипеток с аэрозольным барьером, при этом работают в одноразовых перчатках. Одноразовая пластиковая посуда (пробирки, наконечники) должна сбрасываться в специальный контейнер с дезинфицирующим раствором на 1 ч.

ПЦР протокол для амплификации генов резистентности

Общий объем амплификационной смеси составляет 100 мкл (таблица 2).

Таблица 2

Состав ПЦР-реакции из расчета на 100 мкл

Реактивы	Объем (мкл)	Примечание
Праймер Р1 (F)	10,0	1 μМ финальная концентрация (10pM/мкл)
Праймер Р2 (R)	10,0	1 μМ финальная концентрация (10pM/мкл)
ПЦР-смесь	50	
ДНК	10	
H ₂ O для ПЦР	20	

Параллельно с опытными пробами ставится отрицательный контроль. Отрицательный контроль включает в себя все компоненты реакции, но вместо ДНК вносится соответствующее количество воды для ПЦР. Отрицательный контроль необходим для проверки ингредиентов реакции на

отсутствие в них ДНК или клеток возбудителя вследствие контаминации и исключить учет ложноположительных результатов. В качестве положительного контроля необходимо использовать ДНК штамма менингококка.

Пробирки переносятся в программируемый амплификатор, где проводится амплификация в автоматическом режиме по заданной программе. Количество циклов амплификации и температурный режим указаны в таблице 3.

Таблица 3

Температурный режим реакции амплификации

Ген	Условия реакции
<i>gyrA</i>	95°–120 с
<i>parC</i>	40 циклов:
<i>penA</i>	95°–45 с
	52°–60 с
	72°–30 с
<i>groB</i>	Дополнительно 72°–60 с — 1 цикл. Хранение 4°

Анализ и регистрация результатов

Специфические продукты амплификации генов выявляют методом электрофореза в 2% агарозном геле в присутствии бромистого этидия.

Агарозный гель готовят путем добавления 2 г агарозы на 100 мл 1х ТАЕ буфера. Агарозу расплавляют в микроволновой печи до полного расплавления. Бромистый этидий — 2,5 мкл (10 мг/мл) вносят в расплавленную агарозу, остывшую до 55–60°С.

Агарозный гель хорошо перемешивают и заливают в форму для геля, устанавливают специальные гребенки для образования лунок для внесения проб. В течение 30 мин происходит застывание геля (желатинизация).

Гель переносят в камеру для электрофореза, заполненную 1хТАЕ буфером. В первую лунку внести 10 мкл стандарта молекулярного веса. В иммунологическом микропланшете смешать 10 мкл продуктов амплификации и 2 мкл нагрузочного красителя, внести в оставшиеся лунки агарозы. Камеру подключают к источнику питания (напряжение рассчитывают исходя из стандартов 60 В на 1 см геля) и проводят электрофоретическое разделение продуктов амплификации в течение 1ч.

После электрофореза гель переносят на трансиллюминатор (или прибор для фотодетекции гелей) и проводят визуализацию результатов.

Мутации в генах *parC* и *gyrA* обуславливают наличие сниженной чувствительности или устойчивости к фторхинолонам и цефалоспорином. При амплификации данных генов формируются продукты длиной 300 и 431 п.о., соответственно. При одновременном формировании дополнительных продуктов амплификации можно судить о наличии мутаций в гене.

Сниженная чувствительность (устойчивость) к пенициллину обуславливает ген *penA*. При амплификации данного гена у штаммов

менингококков формируется специфический продукт в 500 п.о. А при присутствии дополнительного продукта амплификации в 400 п.о. (рисунок 1) можно судить о том, что анализируемый штамм обладает сниженной чувствительностью или умеренной устойчивостью к препаратам пенициллинового ряда (например, бензилпенициллин, оксациллин).

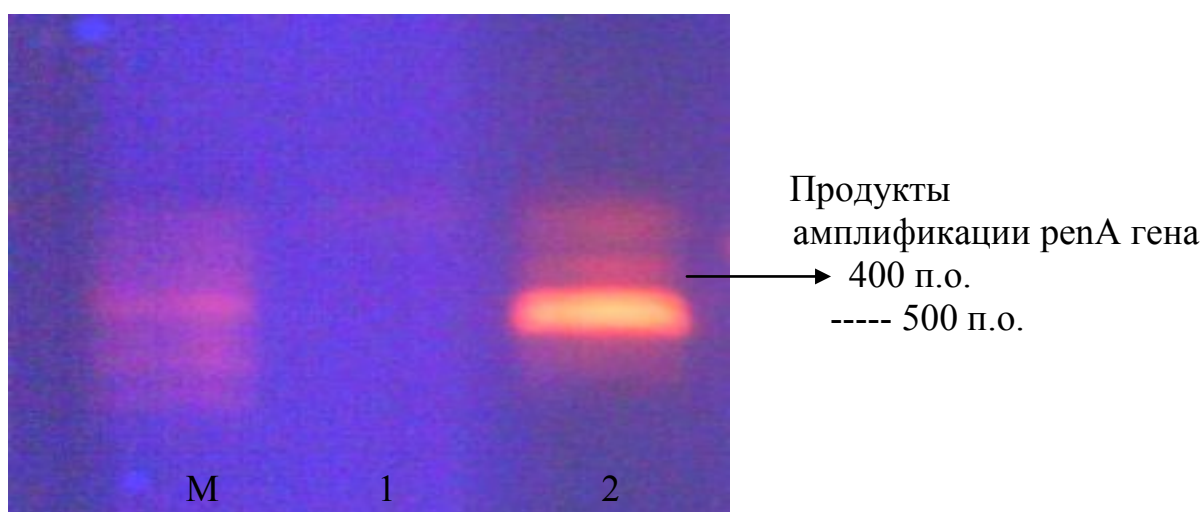


Рис. 1: Амплификация гена *repA*

Примечание: Линии 1,2 — исследуемые пробы, М — маркер молекулярного веса ДНК

Резистентность к рифампицину обуславливает мутация в гене *groV*. При амплификации гена *groV* формируется специфический продукт амплификации размером 790 п.о. Затем рекомендуется проводить секвенирование гена с целью определения локализации и типа мутаций, обуславливающих резистентность.

МЕРЫ БЕЗОПАСНОСТИ

На всех этапах проведения исследования работают в защитной одежде (медицинский халат), одноразовых перчатках, маске.

При каждой операции (выделение ДНК, постановка ПЦР, электрофорез) используют и меняют одноразовые наконечники для автоматических пипеток с аэрозольным барьером, при этом работают в одноразовых перчатках.

Одноразовая пластиковая посуда (пробирки, наконечники) должна сбрасываться в специальный контейнер с дезинфицирующим раствором минимум на 1 ч.

Инфекционный материал. Обезвреживание биоматериалов и реагентов проводят для каждой стадии отдельно, помещая одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) в специальные контейнеры, содержащие дезинфицирующий раствор.

Проведение электрофоретической детекции.

УФ-свет. При работе с включенным трансиллюминатором пользуются защитным экраном или специальной защитной маской, так как ультрафиолетовый свет вызывает ожоги лица и слизистой оболочки глаз.

Необходимо помнить, что УФ-свет вызывает мутации и разрушение исследуемой ДНК, поэтому длительная экспозиция ПЦР-продуктов в УФ-свете приводит к снижению интенсивности свечения. Если ПЦР-продукты подвергаются дальнейшим исследованиям (секвенированию, рестрикции, мутагенезу, клонированию) необходимо ограничить длительность УФ-облучения.

Этидия бромид — канцерогенное соединение, связывающее ДНК и вызывающее мутации в ней. Необходимо соблюдать меры безопасности: 1) работать в перчатках; 2) при попадании на кожу или слизистые оболочки тщательно промыть соответствующий участок водой; 3) реагенты, содержащие этидия бромид, перед утилизацией подвергать специальной обработке.

Нормы обработки реагентов при использовании этидия бромида описаны в Инструкции № 81 «О методах микробиологической диагностики менингококковой инфекции и бактериальных менингитов» от 13.02. 06.

ВОЗМОЖНЫЕ ОШИБКИ И ОСЛОЖНЕНИЯ ДИАГНОСТИКИ

Несоблюдение норм и сроков хранения реагентов и образцов

Требуется соблюдать все нормы и требования по подготовке проб из клинического материала, а также условия их транспортировки и хранения. Все реагенты хранить согласно указаниям производителя. Реагенты для проведения электрофореза хранить в защищенном от света месте. Реагенты для проведения ПЦР с истекшим сроком годности применять запрещается.

Проведение электрофоретической детекции

Работа с амплифицированной ДНК должна проводиться в отдельном помещении во избежание контаминации.

Результаты анализа не подлежат учету в следующих случаях:

1. Если в дорожке, соответствующей какому-либо положительному контролю, отсутствует специфическая полоса. Причиной могла явиться ошибка в подготовке реактивов, постановке ПЦР или сбой программы амплификатора.
2. Если в отрицательном контроле выявляется одна из специфических полос, значит, произошла контаминация реактивов или проб. В этом случае результаты анализа считаются недействительными, и анализы подлежат перестановке. Требуется повторить анализ проб, а также предпринять меры по выявлению источника контаминации.