

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель министра

_____ Р.А. Часнойть
5 марта 2009 г.
Регистрационный № 118-1207

**ГЕНОДИАГНОСТИКА МЕНИНГОКОККОВОГО МЕНИНГИТА
МЕТОДОМ МУЛЬТИЛОКУСНОГО
СЕКВЕНИРОВАНИЯ-ТИПИРОВАНИЯ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: ГУ « Научно- исследовательский институт
эпидемиологии и микробиологии»

АВТОРЫ: д-р мед. наук, проф. Л.П. Титов, Е.С. Носова, С.Э. Глазкова

Минск 2009

НАЗНАЧЕНИЕ И ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Настоящая инструкция предназначена для молекулярного типирования бактерий *Neisseria meningitidis*, для совершенствования эпидемиологического мониторинга за возбудителем менингококковой инфекции и установления генетических взаимосвязей *Neisseria meningitidis*, циркулирующих на территории республики.

Инструкция предназначена для специалистов клинических и референс-лабораторий санитарно-эпидемиологических учреждений Республики Беларусь.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, ПРЕПАРАТОВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

1. Ламинарный бокс с бактерицидной лампой.
2. Набор для выделения ДНК из образцов.
3. Набор для выделения ДНК из агарозного геля.
4. Одноразовая пластиковая посуда (микропробирки для ПЦР на 0,2; 0,5; 1,5 мл).
5. Отдельные наборы автоматических пипеток переменного объема для выделения ДНК и приготовления реакционной смеси, электрофореза.
6. Штативы для микропробирок, автоматических пипеток и наконечников к автоматическим пипеткам.
7. Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема (с аэрозольным барьером).
8. Холодильник на 2–8 °С с морозильной камерой.
9. Твердотельный термостат для микропробирок на 1,5 и 0,5 мл.
10. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 16 тыс. г.
11. Вортекс-шейкер для микропробирок.
12. Амплификатор.
13. Источник постоянного тока для электрофореза.
14. Камера для горизонтального электрофореза.
15. Ультрафиолетовый трансиллюминатор для просмотра гелей.
16. Весы.
17. Электроплитка или микроволновая печь для плавления агарозы.
18. Секвенатор.
19. Прибор для фотополимеризации гелей.
20. Компьютер с программным обеспечением для управления электрофоретическим разделением, хранения данных и анализа.
21. Дополнительные принадлежности — реагенты для секвенирования, аппаратные средства.

МУЛЬТИЛОКУСНОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЕ-ТИПИРОВАНИЕ (МЛСТ)

Основные принципы МЛСТ:

1. Для проведения методики МЛСТ амплифицируют от 6 до 14 бактериальных генов, «нейтральных», не кодирующих факторы

патогенности, но являющихся маркерами филогенетического родства. Они работают постоянно, на всех стадиях клеточного цикла, обеспечивают процесс гликолиза, биосинтез аминокислот и нуклеотидов, катаболизм белков, синтез клеточных структур, производство энергии и т. п. Эти гены называют генами «домашнего хозяйства» (хаускипинг-гены).

Для генотипирования нейссерий используют 7 генов «домашнего хозяйства»: *abcZ* (предположительно ABC переносчик), *adk* (аденилаткиназа), *aroE* (шикиматдегидрогеназа), *fumC* (фумаратгидратаза), *gdh* (глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа), *pdhC* (субъединица пируватдегидрогеназы), *pgm* (фосфоглюкомутаза).

2. Для каждого исследуемого штамма нуклеотидные последовательности вышеописанных генов определяются методом прямого секвенирования. Каждая уникальная последовательность определяет аллель локуса. Для каждого гена аллели 7 локусов представляют аллельный профиль, который определяет секвенс-тип (СТ) каждого изолята. Последовательности, которые отличаются даже одним нуклеотидом, являются разными аллелями. Известные комбинации мутаций в каждом гене описываются как аллельные варианты, что обеспечивает возможность сопоставления аллельных профилей исследуемых штаммов с таковыми из международной базы данных.

3. В Интернете поддерживаются Web-сайты, содержащие базы данных об известных уникальных последовательностях и соответствующих им секвенс-типах. Исследователи с помощью базы данных могут классифицировать обнаруженный СТ как известный или новый, а также внести свои результаты в общемировую базу. В последней хранятся в стандартизированной форме индивидуальные сведения о каждом штамме, включающие СТ и, если известно, результаты типирования другими методами (серологическими и пр.) и эпидемиологические данные (страна выделения, источник изолята, например, СМЖ и пр.).

Преимущества МЛСТ

- метод можно применять, непосредственно используя клинический материал (кровь, цереброспинальную жидкость и т. п.) без выделения и хранения бактерий, что сокращает время исследования и позволяет провести типирование в отсутствие жизнеспособного возбудителя;

- исключается необходимость наличия референс-штаммов;

- методика проведения, форма представления и анализ результатов позволяет сопоставлять и интегрировать данные независимо работающих лабораторий в единую базу данных сети Интернет;

Метод МЛСТ включает:

1. ПЦР: амплификация фрагментов 7 хаускипинг-генов (7 x ПЦР реакций).

2. Секвенс ПЦР-продуктов;

3. Анализ:

- выравнивание последовательностей с помощью программы MEGA;

- внесение последовательностей на Web-сайт <http://pubmlst.org/neisseria/> и получение заключения о секвенс-типе.

Для МЛСТ анализа *N. meningitidis* амплифицируют внутренние фрагменты 7 генов «домашнего хозяйства» (последовательности праймеров приведены в табл. 1).

Таблица 1

Праймеры, используемые для амплификации фрагментов 7 генов «домашнего хозяйства» *N. meningitidis* в ПЦР

Ген	Праймер	5'-3' последовательность	Размер продукта, п.н.
abcZ	abcZ-P1C abcZ-P2C	5-TGTTCCGCTTCGACTGCCAAC-3 5-TCCCCGTCGTAAAAACAATC-3	700 п.н.
adk	adk-P1B adk-P2B	5- CCAAGCCGTGTAGAATCGTAAAC C-3 5-TGCCCAATGCGCCCAATAC-3	
aroE	aroE-P1B aroE-P2B	5-TTTGAAACAGGCGGTTGCGG-3 5-CAGCGGTAATCCAGTGCGAC-3	
fumC	fumC-P1B fumC-P2B	5-TCCCCGCCGTAAAAGCCCTG-3 5-GCCCGTCAGCAAGCCCAAC-3	
gdh	gdh-P1B gdh-P2B	5-CTGCCCCCGGGGTTTTTCATCT-3 5- TGTTGCGCGTTATTTCAAAGAAG G-3	
pdhC	pdhC-P1B pdhC-P2B	5-CCGGCCGTACGACGCTGAAC-3 5-GATGTCGGAATGGGGCAAACA- 3	
pgm	pgm-P1 pgm-P2	5'-CTTCAAAGCCTACGACATCCG- 3' 5'-CGGATTGCTTTCGATGACGGC- 3'	

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР

Взятие проб биологического материала

Для выделения ДНК используют ЦСЖ, кровь, чистую культуру нейссерий.

При необходимости исследуются образцы ЦМЖ, которые берут у больных менингитом при спинномозговой пункции. Для ПЦР-диагностики достаточно 100–500 мкл ЦСЖ.

Для выделения ДНК используют свежую культуру нейссерий. Одна колония переносится стерильной петлей в одноразовую пробирку с очищенной стерильной водой или физраствором. Приготовленные подобным образом бактериальные суспензии (или образцы ЦМЖ) могут исследоваться немедленно, храниться в течение 1–3 дней при +4 °С или подвергаться глубокой заморозке. При -20 °С образец может храниться несколько месяцев, при -70 °С неограниченно долго. Следует избегать нескольких циклов замораживания-оттаивания образца, поэтому, если образец планируется исследовать неоднократно, аликвоты должны быть разлиты в отдельные пробирки.

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

Экстракция ДНК из образцов

ДНК из бактериальной суспензии выделяется стандартными методами лизиса/сорбции/отмывания с использованием набора для выделения ДНК в соответствии с прилагаемой инструкцией или фенол-хлороформной экстракцией.

Образцы ЦСЖ 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.

ПЦР протокол для амплификации генов «домашнего хозяйства»

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

Таблица 2

Состав ПЦР реакции из расчета на 100 мкл

Реактивы	Объем	Примечание
Праймер Р1	10,0 мкл	1 μМ финальная концентрация (10 pM/мкл)
Праймер Р2	10,0 мкл	1 μМ финальная концентрация (10 pM/мкл)
dNTP (50-200μM)	16,0 мкл	125 мкл каждого 10 mM

		dNTP + 500 мкл H ₂ O
MgCl ₂ (25mM)	6,0 мкл	1,5 mM финальная концентрация
Taq полимераза	0,5 мкл	2,5 ед. фермента
10x буфер	10,0 мкл	
ДНК	1 мкл	50 ng/мкл
H ₂ O	46,5 мкл	Используется бидистиллированная H ₂ O или заводского производства

Параллельно с опытными пробами ставятся контрольные: положительный и отрицательный контроль. Положительный контроль включает в себя все компоненты реакции, но вместо материала клинического образца вносится контрольный препарат ДНК исследуемого возбудителя. Отрицательный контроль включает в себя все компоненты реакции, но вместо ДНК вносится соответствующее количество деионизованной воды (заводского производства). Отрицательный контроль необходим для проверки ингредиентов реакции на отсутствие в них ДНК или клеток возбудителя вследствие контаминации и исключения ложноположительных результатов.

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

ПЦР осуществляют с использованием режимов 94 °С — 2 мин (94 °С — 1 мин, 60 °С — 1 мин, 72 °С — 1 мин) — 30 циклов для *abcZ*, *fumC*, *pgm*, *rdhC*, *aroE*, температура амплификации для *adk* пары праймеров составляет 65 °С, для *gdh* — 63 °С.

Таблица 3

Температурный режим реакции

Шаг	Температура	Время/мин
1	94	2
2	94	1
3	60-65	1
4	72	2
5	Повторить 2, 3 и 4 шага 29 раз	
6	72	2
7	4	

Анализ и регистрация результатов

Специфические продукты амплификации генов *abcZ*, *fumC*, *pgm*, *pdhC*, *aroE*, *adhk*, *gdh* выявляют методом электрофореза в 1,5–2% агарозном геле в присутствии бромистого этидия.

Агарозный гель (1,5–2%) готовят путем добавления 1,5–2 г агарозы на 100 мл 1x TAE или TBE буфера. Агарозу расплавляют на водяной бане или в микроволновой печи до полного расплавления.

Буфер для электрофореза:

TAE (10x) 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, pH 8,0).

TBE (5x) 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, pH 8,0).

Бромистый этидий (10 мг/мл) вносят в расплавленную агарозу, остывшую до 55–60 °С, в конечной концентрации 0,1–10 мкг/мл.

Секвенс-анализ специфичных ПЦР продуктов

Очистку продуктов ПЦР можно осуществлять с использованием набора для выделения ДНК из агарозных гелей в соответствии с прилагаемой инструкцией, а также методом с использованием полиэтиленгликоля (ПЭГ). Для этого всю амплификационную смесь после проведения ПЦР переносят в 1,5 мл микропробирку. Добавляют 60 мкл 20% ПЭГ-8000 / 2,5 М NaCl, перемешивают. Инкубируют в течение 15 мин при 37 °С. Пробы центрифугируют на максимальной скорости 10 мин. Супернатант удаляют, добавляют 0,5 мл 70% этанола, центрифугируют на максимальной скорости 5 мин. Супернатант удаляют, осадок подсушивают и ресуспендируют в 20–30 мкл стерильной воды (бидистиллированной или заводского производства) и хранят при -20 °С.

Секвенс-реакция

Циклическую секвенс-реакцию можно осуществлять при помощи специального секвенс-набора в соответствии с прилагаемой инструкцией.

В качестве матрицы используют амплифицированные и очищенные фрагменты ДНК.

Праймеры для секвенс-реакции представлены в табл. 4.

Таблица 4

Праймеры, используемые для реакции секвенирования внутренних фрагментов 7 генов «домашнего хозяйства»

Ген	Праймер	5'-3' последовательность	Размер продукта, п.н.
abcZ	abcZ-S1A abcZ-S2	5'- ААТСГТТТАТГТАССГСАГР- 3' 5'-	433

		GAGAACGAGCCGGGATAGG A-3'	
adk	adk-S1A adk-S2	5'-AGGCWGGCACGCCCTTGG- 3' 5'- CAATACTTCGGCTTTCACGG- 3'	465
aroE	aroE-S1A aroE-S2	5-GCGGTCAAYACGCTGRTK- 3 5- ATGATGTTGCCGTACACATA- 3	490
fumC	fumC-S1 fumC-S2	5- TCCGGCTTGCCGTTTGTTCAG- 3 5- TTGTAGGCGGTTTTGGCGAC- 3	465
gdh	gdh-S3 gdh-S4C	5'- CCTTGGCAAAGAAAGCCTGC -3' 5-RCGCACGGATTCATRYGG-3	501
pdhC	pdhC-S1 pdhC-S2	5'- TCTACTACATCACCCCTGATG- 3' 5'- ATCGGCTTTGATGCCGTATTT -3'	480
pgm	pgm-S1 pgm-S2A	5'- CGGCGATGCCGACCGCTTGG -3' 5'- GGTGATGATTTTCGGTYGCRC C-3'	450

Секвенс-анализ осуществляют с использованием секвенс-анализатора. Результаты оценивают с применением специальной программы.

Результаты секвенирования предоставляются в виде .alx файла, содержащего графическое отображение разделения продуктов секвенирования. Для работы с файлом можно использовать разные программы, способные воспринимать данный формат.

Нуклеотидные последовательности *abcZ*, *fumC*, *pgm*, *pdhC*, *aroE*, *adk*, *gdh* генов анализируемых штаммов сравнивают между собой, а также с последовательностями, представленными в базе данных GeneBank с помощью сервиса BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

Восстановление последовательностей изученных генов, выравнивание и сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей проводят с использованием специального программного пакета.

Всю информацию о последовательности каждого из 7 генов получают на Web-сайте <http://www.mlst.net>. Каждый уникальный вариант последовательности (отличающийся от другого как минимум на один нуклеотид) рассматривается как аллельный вариант, которому присваивается соответствующий номер.

Для характеристики аллелей каждого из 7 генов используют страницу http://pubmlst.org/perl/mlstdbnet/mlstdbnet.pl?file=pubnm_profiles.xml&page=allseq.

Полученные последовательности вводят в окно, соответствующее каждому гену (рис. 1).

Query: Locus | Multiple Locus | Batch Locus | BLAST | Compare alleles | Profile | Batch Profile | ST | List | Browse | Search
Download: Alleles | Profiles | Traces
Links: Contents | Home | Options | PubMLST.org | mlstdbNet software | User guide

Neisseria MLST multiple locus query

Enter sequences (DNA) below using copy and paste:

abcZ	ACCAACCAATTTGGACATCGACGCGATTATTTGGTTGGA GGCAGCCTGGTTGTGATTACCCACGACCGCGCTTTTTC GTCCGAATCGATC	adk	TGATTCAGCGCGACGACGACAAAAGAAACCGTGAAA AGCAAAACCGAAGTTTGGTTGATTTTTACAGCAAACTGC ACATCAAAGTTGACGGCACTCAGCCGGTA
aroE	ACGACAATCGGGTGCAGAAAAAAGTCCGACGGACTGG GGCTTCCTACGCCCTCTGGCGCGGATTTACGCCCGATA GAAAAGCCATG	fumC	AATCCGTCCGCCTGTTGGGCGACGGCTGCAACAGTTC TCGAACCCGTACCGGAAAAATTCGACTATTTCTGCAC CGTTAAACCGTAAAAATCGGCTACGAAAAAC
gdh	AAAAGCCGAAATCGAAAAACGACGCTGGAAGGGCGTCC CGCATGGCGGGCAAAAGTGGCGGAAATCGTTTGAACCT TTTGAAGGCAGCCGACCCGGC	pdhC	ACATCTTGAAGGTATGTACCTGCTGAAAGCCGGCGGC TGATGGGTTCCGGTACGATTTTGCAGAAAGTATTGCC ACTTCGGCGTGAAGCAGACATTTGTCTTGCCCATCT
pgm	TTGGAAATCCTGTCCGCCTCCGATAATCCGTCCGAAGT ATTTCCACTCCGGAACCTAACATTGACCTGCCGGAAGG GAAAGCTGGCTGCCAATGCCAAGTTTGA		

Рис. 1. Внесение данных секвенирования в базу МЛСТ

Аллельный профиль для штаммов представляет набор аллельных вариантов по всем 7 локусам. По результатам анализа тестируемому штамму присваивается секвенс-тип или аллельный профиль (рис. 2).

PubMLST Query: [Locus](#) | [Multiple Locus](#) | [Batch Locus](#) | [BLAST](#) | [Compare alleles](#) | [Profile](#) | [Batch Profile](#) | [ST](#) | [List](#) | [Browse](#) | [Search](#)
 Download: [Alleles](#) | [Profiles](#) | [Traces](#)
 Links: [Contents](#) | [Home](#) | [Options](#) | [PubMLST.org](#) | [mlstadbNet software](#) | [User guide](#)

Allelic profile query - Neisseria MLST database

Please enter your allelic profile below:

abcZ	adk	aroE	fumC	gdh	pdhC	pgm
9	143	9	9	249	6	9

Type of search:

Order by:

Display records per page

Closest match: 6 matches

1 record returned.

Click the ST hyperlinks for further information including isolates with a matching profile.

ST	abcZ	adk	aroE	fumC	gdh	pdhC	pgm	clonal complex
3346	9	6	9	9	249	6	9	ST-41/44 complex/Lineage 3

Рис. 2. Аллельный профиль штамма

Близкородственные штаммы имеют один и тот же аллельный профиль, штаммы родственные, но в меньшей степени, имеют схожие аллельные профили и объединяются в клональные группы (комплексы).

Филогенетическая связь изолятов отображается на дендрограмме, построенной на основе различий аллельных профилей штаммов. Дендрограмма является наиболее удобным методом интерпретации результатов, на ней отображаются идентичные или схожие аллельные профили штаммов; различия аллельных профилей в трех и более из 7 локусов считаются недостоверными и не должны учитываться.