

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

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель Министра здравоохранения –
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:

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

АВТОРЫ:

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

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.

1. Показания

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

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

- женщины вне беременности: наличие в анамнезе повторные ангины, 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.

2. Перечень необходимого оборудования, реактивов, препаратов, 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% бромфеноловый синий); O'Gene Ruler1kb DNA Ladder ; агароза LE; бромистый этидий; 50×ТАЕ буфер для электрофореза;
13. Твердотельный термостат для микропробирок на 1,5 мл 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.

3. Подготовка образцов

3.1. материал для исследований

- мазки из зева, отделяемое глаз, кровь (при септической форме), спинно-мозговая 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.

Спинально-мозговую жидкость в количестве не менее 1 мл собирают, используя одноразовые иглы, в одноразовые пластиковые пробирки объемом 1,5 или 2,0 мл. Предварительная обработка проб не требуется.

Образцы плаценты размером 3x3x3 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°С в течение 20 мин, после чего 100 мкл верхней фазы используют для выделения ДНК.

Моча 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% 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%-ный 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.

3.2. 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.

4. Полимеразная цепная реакция.

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

$$V = C_k * V_k / C_u,$$

где V - необходимый объем праймера

C_k - конечная концентрация праймера (10 пМ/мкл)

V_k - конечный объем смеси (25 мкл)

C_u - исходная концентрация праймера

4.1. 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' - GCATTGCGTGAAGCTGGCCAC - 3'	211 п.о.
обратный	5' - CAGAAGCATTTTCATGAAC - 3'	

Состав реакционной смеси представлен в табл.2.

Общий объем реакционной смеси составляет 25 мкл.

Таблица 2 – Состав реакционной смеси для обеих ПЦР реакций

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 (табл.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 ⁰ С	2 мин	1
2	денатурация	94 ⁰ С	5с	5
	отжиг	50 ⁰ С	5с	
	элонгация	72 ⁰ С	5с	
3	денатурация	94 ⁰ С	2с	25
	отжиг	50 ⁰ С	2с	
	элонгация	72 ⁰ С	2с	
4	хранение	10 ⁰ С	20мин	1

4.2. 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 (табл.5,6) Алгоритм регулирования:«точный». При достижении в

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

Таблица 5 – Программа амплификации видового гена *Inl A* для идентификации *Listeria monocytogenes*:

Цикл	Процесс	Температура	Время	Количество циклов
1	денатурация	94 ⁰ С	2 мин	1
2	денатурация	94 ⁰ С	20с	5
	отжиг	43 ⁰ С	20с	
	элонгация	72 ⁰ С	20с	
3	денатурация	94 ⁰ С	5с	25
	отжиг	43 ⁰ С	5с	
	элонгация	72 ⁰ С	5с	
4	хранение	10 ⁰ С	20мин	1

Таблица 6 – Программа амплификации видового гена *Act A* для идентификации *Listeria monocytogenes*:

Цикл	Процесс	Температура	Время	Количество циклов
1	денатурация	94 ⁰ С	2 мин	1
2	денатурация	94 ⁰ С	20с	5
	отжиг	60 ⁰ С	20с	
	элонгация	72 ⁰ С	20с	
3	денатурация	94 ⁰ С	10с	25
	отжиг	60 ⁰ С	10с	
	элонгация	72 ⁰ С	10с	
4	хранение	10 ⁰ С	20мин	1

5. 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 °С, 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 1Х 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.

6. 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 ультрафиолетовых фильтров.

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

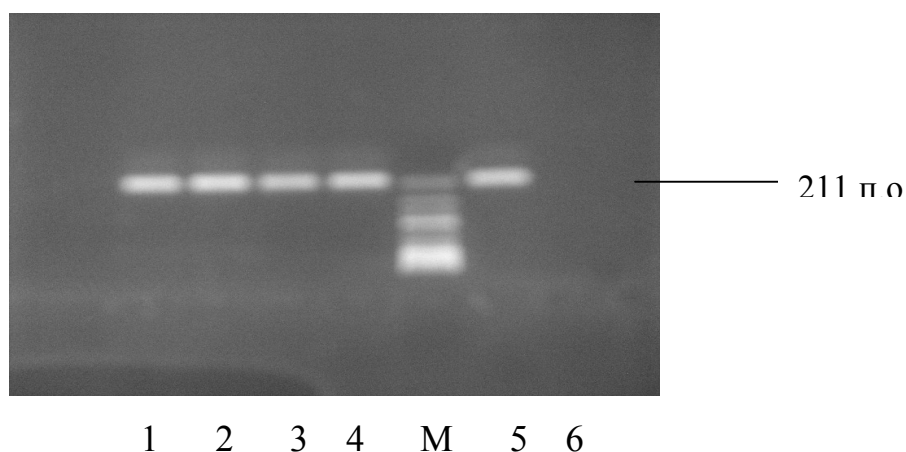


Рисунок 1 – Электрофореграмма результатов амплификации родового гена *Prs*

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

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

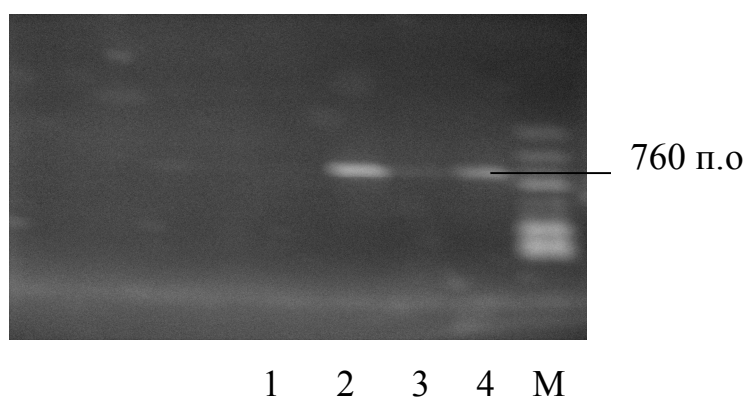


Рисунок 2 – Электрофореграмма результатов амплификации видового гена Inl A *Listeria monocytogenes*

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

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*

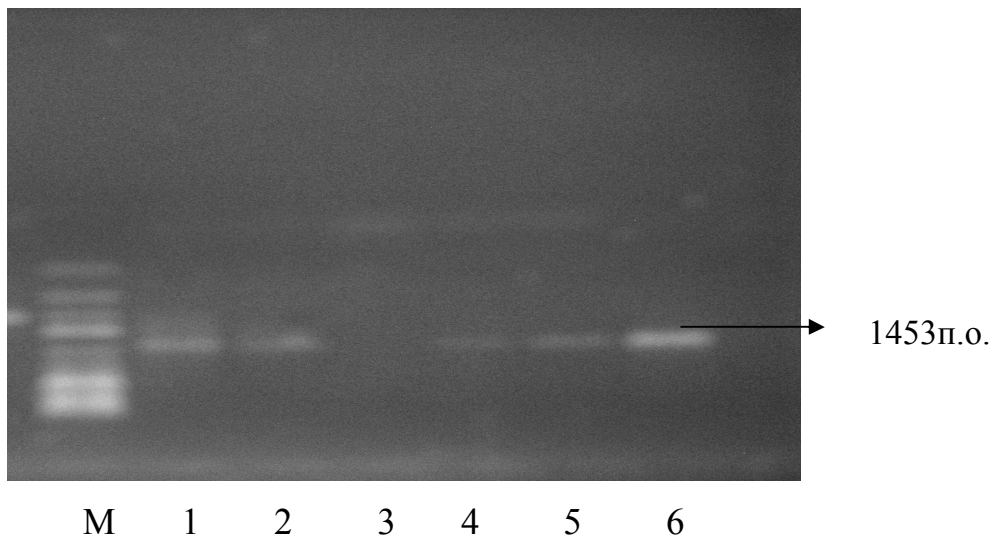


Рисунок 3 – Электрофореграмма результатов амплификации видового гена Act A

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

7. Возможные проблемы при проведении данного метода и их устранение

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 реакционную смесь 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.