

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель Министра здравоохранения –
Главный государственный санитарный врач
Республики Беларусь



И.В. Гаевский

2015 г.

Регистрационный № 006-0815

**МЕТОД ПРОВЕДЕНИЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО
ТИПИРОВАНИЯ ШТАММОВ *BORDETELLA PERTUSSIS* НА ОС-
НОВАНИИ МУЛЬТИЛОКУСНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ ГЕНОВ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

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

АВТОРЫ:

к.м.н. Колодкина В.Л., Мартынов В.С.

Минск, 2015

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) изложен метод молекулярно-генетического типирования штаммов *B. pertussis* на основании мультилокусного секвенирования генов и филогенетический анализ сиквенс-типов штаммов, что необходимо для оценки влияния используемых вакцин на изменчивость штаммов *B. pertussis*, циркулирующих в Республике Беларусь.

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

1 Показания к применению

Определение генотипа клинических изолятов *Bordetella pertussis*, выделенных на территории Республики Беларусь для характеристики адаптации возбудителя коклюша в условиях вакцинации, сравнения циркулирующих штаммов *B. pertussis* со штаммами, используемыми для производства вакцин, а также со штаммами, вызвавшими вспышки заболевания в других странах.

2 Перечень необходимого оборудования, реактивов, препаратов, изделий медицинской техники

- ламинарный бокс с бактерицидной лампой;
- твердотельный термостат для микропробирок на 1,5 мл и 0,5 мл;
- термоциклер для проведения ПЦР;
- компьютер с программным обеспечением для управления прибором ПЦР;
- генетический анализатор (секвенатор);
- набор реагентов для проведения реакции секвенирования;
- микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 13 тыс. об./мин;
- центрифуга-вортекс;

- морозильник;
- холодильный шкаф;
- набор реагентов для выделения ДНК;
- набор реагентов для выделения ДНК из геля;
- набор олигонуклеотидов (праймеров);
- буфер для ПЦР 10X: 65 мМ Трис-НСl (рН 8,8); 16,6 мМ (NH₄)₂SO₄; 0,02% Твин 20;
- *Taq* полимеразы (рекомбинантная), 5 единиц/мкл;
- загрузочный буфер: 0,4% бромфеноловый голубой; 50% глицерин; 0,01М NaH₂PO₄;
- реактивы для проведения ПЦР: 10 мМ смесь дНТФ; 25 мМ раствор MgCl₂; 100% ДМСО;
- автоматические дозаторы переменного объема (от 0,1 до 10 мкл, от 20 до 200 мкл, от 100 до 1000 мкл);
- одноразовые наконечники с фильтром до 10, 100, 200, 1000 мкл;
- одноразовые пластиковые микропробирки на 0,2, 0,5, 1,5 мл;
- одноразовая пластиковая посуда для постановки ПЦР – микропробирки;
- штативы для микропробирок, автоматических пипеток и наконечников к автоматическим пипеткам.

3 Подготовка клинических образцов для исследования

3.1 Получение клинических изолятов

Носоглоточные мазки от пациентов с подозрением на коклюш культивируют на кровяно-угольном агаре с добавлением цефалексина (40 мкг/мл) в течение 3-7 суток при +37°C. Чашки с посевом анализируют ежедневно на наличие типичных колоний *B. pertussis*. Колонии отсеивают и идентифицируют в реакции агглютинации с использованием адсорбированных поливалентных и монорецепторных диагностических сывороток коклюшных к агглютиногенам 1, 2, 3. Морфологию клеток исследуют

микроскопически, используя окраску по Граму. В качестве биохимических тестов, позволяющих идентифицировать штаммы рода *Bordetella* фенотипически, используют способность изолятов к утилизации мочевины (тест на уреазу), цитратов на среде Симмонса, редукции нитратов и подвижность в полужидком агаре.

Для длительного хранения выделенные клинические изоляты высушивают или хранят в сахарозо-желатиновой среде с добавлением глицерина при -20°C до проведения исследования.

3.2 Выделение ДНК

Экстракцию хромосомальной ДНК из суспензии 72 часовой культуры *B. pertussis*, выращенной на среде КУА с добавлением 10% крови КРС, осуществляют стандартным методом с использованием коммерческого набора для выделения ДНК в соответствии с прилагаемой инструкцией. Выделенные образцы ДНК хранят при -20°C .

4 Амплификация генов *B. pertussis*

Таблица 1 – Праймеры для амплификации генов.

Ген	Размер гена	Нуклеотидная последовательность праймеров	Размер анализируемого региона
<i>ptxA</i> (субъединица S1 коклюшного токсина)	810 п.н.	<i>ptxA-F</i> : CCCCCTGCCATGGTGTGATC <i>ptxA-R</i> : O:AGAGCGTCTTGCGGTCGATC	935 п.н. (447 п.н.– 1381 п.н.).
<i>ptxC</i> (субъединица 3 коклюшного токсина S3)	840 п.н.	<i>ptxC-F</i> : TTTATCGCGAAACTTTCT <i>ptxC-R</i> : biotin-TGGACAGGCGAACAG	388 п.н. (3270 п.н.– 3658 п.н.)
<i>ptxP</i> (промоторная область коклюшного токсина)	≈ 170 п.н. вверх от S1 субъединицы КТ	<i>ptxP-F</i> : AATCGTCCTGCTCAACCGCC <i>ptxP-R</i> : GGTTACGGTGGCGGGAGGA	573 п.н. (60 п.н.– 633 п.н.)
<i>prn</i> (пертактин)	2739 п.н.	<i>prn-F</i> : GCCAATGTCACGGTCCAA <i>prn-R</i> : CCGGATTCAGGCGCAACTC	1410 п.н. (649 п.н.–2059 п.н.)
<i>tcfA</i> (фактор колонизации трахеи)	2019 п.н.	<i>tcfA-F</i> : CTCCGGTTGCGAAGCCAGGT <i>tcfA-R</i> : GATTCAAGCCTCCAGCCGAC	455 п.н. (578 п.н.– 1032 п.н.)
<i>fim2</i>	627 п.н.	<i>fim2-F</i> : biotin-TGGGTGCGAACGAGGCGA <i>fim2-R</i> : CCGGCCGGGCTCCTTGAG	270 п.н.
<i>fim3</i>	615 п.н.	<i>Fim3-F</i> : CCCCCGGACCTGTATTCTGATG <i>Fim3-R</i> : GCTGAGCGTGCTGAAGGACAAGAT	800 п.н.

Все олигонуклеотиды синтезируют под заказ в высушенном виде. Каждый олигонуклеотид растворяют отдельно в бидистиллированной воде. Готовят растворы праймеров с конечной концентрацией равной 40 мкМ. Разведения готовят по формуле:

$$V [H_2O] = n [\text{праймера}] / C [\text{концентрация}]$$

где $V [H_2O]$ – объем воды необходимый для растворения праймера, мл;

$n [\text{праймера}]$ – химическое количество праймера, нмоль;

$C [\text{концентрация}]$ – конечная концентрация праймера в растворе, мкМ.

Полученные растворы хранить при $-20^{\circ}C$, избегая многократного размораживания и замораживания растворов.

4.1 Полимеразная цепная реакция для накопления фрагмента гена *ptxA*

Состав реакционной смеси для ПЦР 5 мкл x (N+1) – 10X ПЦР буфера (конечная концентрация 1X)

(на N пробирок) 5 мкл x (N+1) – $MgCl_2$ (2,5 мМ)

1 мкл x (N+1) – ДНТФ (200 мкМ)

0,5 мкл x (N+1) – праймера *ptxA-F* (20 нкмоль)

0,5 мкл x (N+1) – праймера *ptxA-R* (20 нкмоль)

2,5 мкл x (N+1) – ДМСО (5%)

6 мкл x (N+1) – загрузочный буфер (12%)

0,5 мкл x (N+1) – Taq-полимераза (2,5 ед)

24 мкл x (N+1) – H_2O

Общий объем 45 мкл x (N+1)

ДНК матрица – 5 мкл

– маркируют пробирки;

– раскапывают ПЦР-смесь по 45 мкл на N пробирок (учитывая положительный и отрицательный контроли);

- в качестве положительного контроля используют ДНК *B. pertussis* Tohama I, (по 100 копий геномной ДНК на реакцию). Положительный контроль в объеме 5 мкл добавляют в пробирку в последнюю очередь.
- в качестве отрицательного контроля используют 5 мкл H₂O (свободная от рибонуклеаз с маркировкой «RNAse, DNAse free»).
- в пробирки с ПЦР-смесью вносят по 5 мкл ДНК матрицы;
- пробирки помещают в термоциклер;
- программируют термоциклер в соответствии с режимом амплификации, указанным ниже:

– денатурация 95°C – 3 минуты	
– денатурация 95°C – 15 сек	35 циклов
– отжиг 59°C – 15 сек	
– элонгация 72°C – 1 мин	
– элонгация 72°C – 10 мин	последний цикл

4.2 Полимеразная цепная реакция для накопления фрагмента гена *ptxC*

Состав реакционной смеси для ПЦР (на N пробирок)	<p>5 мкл x (N+1) – 10X ПЦР буфера (конечная концентрация 1X)</p> <p>5 мкл x (N+1) – MgCl₂ (2,5 mM)</p> <p>1 мкл x (N+1) – ДНТФ (200 мкM)</p> <p>1 мкл x (N+1) – праймера <i>ptxC-F</i> (40 пкмоль)</p> <p>1 мкл x (N+1) – праймера <i>ptxC-R</i> (40 пкмоль)</p> <p>2,5 мкл x (N+1) – ДМСО (5%)</p> <p>6 мкл x (N+1) – загрузочный буфер (12%)</p> <p>0,5 мкл x (N+1) – Taq-полимераза (2,5 ед)</p> <p>23 мкл x (N+1) – H₂O</p>
Общий объем	45 мкл x (N+1)
ДНК матрица	– 5 мкл

– раскапывают ПЦР смесь в пробирки и вносят ДНК-матрицу также как описано в п. 4.1;

– программируют термоциклер в соответствии с режимом амплификации, указанным ниже:

– денатурация 94°C – 10 минут	
– денатурация 94°C – 30 сек	35 циклов
– отжиг 60°C – 2 минуты	
– элонгация 72°C – 1 мин	
– элонгация 72°C – 10 мин	последний цикл

4.3 Полимеразная цепная реакция для накопления *ptxP* – промоторной области коклюшного токсина

Состав реакционной смеси для ПЦР (на N пробирок)	5 мкл x (N+1) – 10X ПЦР буфера (конечная концентрация 1X)
	5 мкл x (N+1) – MgCl ₂ (2,5 мМ)
	1 мкл x (N+1) – ДНТФ (200 мкМ)
	0,5 мкл x (N+1) – праймера <i>ptxP-F</i> (20 нкмоль)
	0,5 мкл x (N+1) – праймера <i>ptxP-R</i> (20 нкмоль)
	2,5 мкл x (N+1) – ДМСО (5%)
	6 мкл x (N+1) – загрузочный буфер (12%)
	0,5 мкл x (N+1) – Taq-полимераза (2,5 ед)
	24 мкл x (N+1) – H ₂ O
Общий объем	45 мкл x (N+1)

– раскапывают ПЦР смесь в пробирки и вносят ДНК-матрицу также как описано в п. 4.1;

– программируют термоциклер в соответствии с режимом амплификации, указанным ниже:

– денатурация 94°C – 10 минут	
– денатурация 94°C – 15 сек	35 циклов
– отжиг 60°C – 30 сек	
– элонгация 72°C – 1 мин	
– элонгация 72°C – 10 мин	последний цикл

4.4 Полимеразная цепная реакция для накопления фрагмента гена *prn*

Состав реакционной смеси для ПЦР (на N пробирок)	5 мкл x (N+1) – 10X ПЦР буфера (конечная концентрация 1X) 5 мкл x (N+1) – MgCl ₂ (2,5 mM) 1 мкл x (N+1) – ДНТФ (200 мкM) 0,25 мкл x (N+1) – праймера <i>prn</i> -F (10 пкмоль) 0,25 мкл x (N+1) – праймера <i>prn</i> -R (10 пкмоль) 2,5 мкл x (N+1) – ДМСО (5%) 6 мкл x (N+1) – загрузочный буфер (12%) 0,5 мкл x (N+1) – Taq-полимераза (2,5 ед) 24,5 мкл x (N+1) – H ₂ O
Общий объем	45 мкл x (N+1)

– раскапывают ПЦР смесь в пробирки и вносят ДНК-матрицу также как описано в п. 4.1;

– программируют термоциклер в соответствии с режимом амплификации, указанным ниже:

– денатурация 95°C – 3 минуты	
– денатурация 95°C – 20 сек – отжиг 55°C – 30 сек – элонгация 72°C – 1 мин	35 циклов
– элонгация 72°C – 10 мин	последний цикл

4.5 Полимеразная цепная реакция для накопления фрагмента гена *tcfA*

Состав реакционной смеси для ПЦР *5 мкл x (N+1) – 10X ПЦР буфера (конечная концентрация 1X)*

(на N пробирок)

5 мкл x (N+1) – MgCl₂ (2,5 mM)

1 мкл x (N+1) – ДНТФ (200 мкM)

*1 мкл x (N+1) – праймера *tcfA-F* (40 нкмоль)*

*1 мкл x (N+1) – праймера *tcfA-R* (40 нкмоль)*

2,5 мкл x (N+1) – ДМСО (5%)

6 мкл x (N+1) – загрузочный буфер (12%)

0,5 мкл x (N+1) – Taq-полимераза (2,5 ед)

23 мкл x (N+1) – H₂O

Общий объем

45 мкл x (N+1)

ДНК матрица – 5 мкл

– раскапывают ПЦР смесь в пробирки и вносят ДНК-матрицу также как описано в п. 4.1;

– программируют термоциклер в соответствии с режимом амплификации, указанным ниже:

– денатурация 95°C – 10 минут	
– денатурация 95°C – 30 сек	35 циклов
– отжиг 60°C – 2 минуты	
– элонгация 72°C – 1 мин	
– элонгация 72°C – 10 мин	последний цикл

4.6 Полимеразная цепная реакция для накопления фрагмента гена *fit2*

Состав реакционной смеси для ПЦР (на N пробирок)	5 мкл x (N+1) – 10X ПЦР буфера (конечная концентрация 1X) 5 мкл x (N+1) – MgCl ₂ (2,5 мМ) 1 мкл x (N+1) – ДНТФ (200 мкМ) 0,5 мкл x (N+1) – праймера <i>fit2-F</i> (20 нкмоль) 0,5 мкл x (N+1) – праймера <i>fit2-R</i> (20 нкмоль) 2,5 мкл x (N+1) – ДМСО (5%) 6 мкл x (N+1) – загрузочный буфер (12%) 0,5 мкл x (N+1) – Taq-полимераза (2,5 ед) 24 мкл x (N+1) – H ₂ O
Общий объем	45 мкл x (N+1)

– раскапывают ПЦР смесь в пробирки и вносят ДНК-матрицу также как описано в п. 4.1;

– программируют термоциклер в соответствии с режимом амплификации, указанным ниже:

– денатурация 95°C – 10 минут	
– денатурация 95°C – 30 сек	35 циклов
– отжиг 58°C – 30 сек	
– элонгация 72°C – 1 мин	
– элонгация 72°C – 10 мин	последний цикл

4.7 Полимеразная цепная реакция для накопления фрагмента гена *fit3*

Состав реакционной смеси для ПЦР (на N пробирок)	5 мкл x (N+1) – 10X ПЦР буфера (конечная концентрация 1X) 5 мкл x (N+1) – MgCl ₂ (2,5 mM) 1 мкл x (N+1) – ДНТФ (200 мкM) 0,5 мкл x (N+1) – праймера <i>fit3-F</i> (20 пкмоль) 0,5 мкл x (N+1) – праймера <i>fit3-R</i> (20 пкмоль) 2,5 мкл x (N+1) – ДМСО (5%) 6 мкл x (N+1) – загрузочный буфер (12%) 0,5 мкл x (N+1) – Taq-полимераза (2,5 ед) 24 мкл x (N+1) – H ₂ O
Общий объем	45 мкл x (N+1)

– раскапывают ПЦР смесь в пробирки и вносят ДНК-матрицу также как описано в п. 4.1;

– программируют термоциклер в соответствии с режимом амплификации, указанным ниже:

– денатурация 95°C – 10 минут	
– денатурация 95°C – 15сек	35 циклов
– отжиг 56°C – 40 сек	
– элонгация 72°C – 1 мин	
– элонгация 72°C – 10 мин	последний цикл

4.8 Учет результатов амплификации и выделение фрагментов ДНК соответствующих генов

Для учета результатов и выделения фрагментов ДНК генов проводят электрофорез в 1,5% агарозном геле в трис-боратном ЭДТА буфере, pH 8,4 (0,05M трис-борат, 0,005M ЭДТА).

Учет результатов проводят визуально с помощью трансиллюминатора путем сравнения электрофоретической подвижности ампликонов с подвижностью маркера длин ДНК (с диапазоном фрагментов ДНК длиной 100-1500 п.н.).

При наличии в трансиллюминаторе переключателя между коротковолновой и длинноволновой областью УФ-излучения, он должен быть переведен в положение, соответствующее длинноволновому УФ-излучению. При этом гель не должен подвергаться УФ-облучению дольше, чем в течение 30 сек – 1 мин.

Продуктом реакции амплификации является фрагмент ДНК размером 935 п.н. для гена *ptxA*, 388 п.н. – для гена *ptxC*, 573 п.н. – для промоторной области *ptxP*, 1410 п.н. – для гена *prn*, 455 п.н. – для гена *tcfA*, 270 н.п – для гена *fim2*, 800 п.н.– для гена *fim3*.

При наличии в дорожках геля соответствующей полосы, она аккуратно и быстро вырезается с помощью стерильных пинцета и скальпеля. Вырезанный фрагмент геля помещается в стерильную пластиковую пробирку и маркируется в соответствии с номером пробы и гена.

4.9 Выделение и очистка ДНК из геля

Выделение и очистка фрагмента ДНК осуществляется с помощью коммерческих наборов для выделения ДНК из геля, в соответствии с инструкцией производителя. Полученный очищенный препарат ДНК используется в сиквенс -реакции.

5 Секвенирование генов *B. pertussis*

Первым этапом является определение концентрации ДНК в исследуемых пробах и ее чистоты. Концентрация ДНК определяется спектрофотометрически по измерению оптической плотности раствора при длине

волны 260 нм (OD_{260}). Для определения чистоты препарата проводят измерения OD_{260}/OD_{280} . Препарат считается чистым если отношение значений 260нм/280нм приблизительно равно 1,8. Для определения концентрации ДНК используют спектрофотометр, позволяющий проводить измерения непосредственно в капле жидкости объемом 1 – 5 мкл.

Постановка реакции термоциклического секвенирования осуществляется с помощью коммерческих наборов, разработанных для использования на соответствующей модели генетического анализатора (секвенатора). Для каждой пробы проводят 2 реакции – отдельно с прямого и обратного праймеров. Для секвенирования ДНК используют такие же праймеры, как и для амплификации, нуклеотидная последовательность которых представлена в таблице 1. Постановку термоциклической реакции осуществляют в соответствии с инструкцией к используемому коммерческому набору для секвенирования.

Очистка продукта реакции термоциклического секвенирования осуществляется либо с использованием коммерческих наборов, либо преципитацией этанолом. В случае использования коммерческого набора очистка производится в соответствии с инструкцией к данному набору. При очистке с помощью преципитации этанолом используют протокол, изложенный в инструкции к набору для секвенирования.

Заключительным этапом является электрофоретическое разделение продуктов реакции термоциклического секвенирования и распознавание последовательности ДНК. Данный этап проводится с помощью автоматического ДНК-анализатора в соответствии с инструкцией к прибору и с использованием соответствующего программного обеспечения.

6 Обработка и компьютерный анализ нуклеотидных последовательностей

6.1 Первичная обработка нуклеотидных последовательностей генов *B. pertussis*

Первичная обработка результатов секвенирования проводится с использованием программного обеспечения ДНК-анализатора или специализированных программ, способных обрабатывать первичные данные (MEGA 5.2).

Первым этапом является оценка качества полученной нуклеотидной последовательности. Последовательность, содержащая не более 0,5-1% нераспознанных нуклеотидов, может рассматриваться как хороший результат секвенирования. Последовательность, содержащая 5% и более нераспознанных нуклеотидов, не может быть использована для анализа. В этом случае проводится повторное секвенирование пробы ДНК.

Для каждой пробы получают 2 нуклеотидные последовательности – с прямого и обратного праймеров. Это обусловлено возможностью возникновения ошибок в процессе секвенирования. Для устранения этих ошибок 2 нуклеотидные последовательности, полученные для каждой пробы, сравнивают между собой и с последовательностью гена типового штамма *B. pertussis* Tohama I. На основании этого сравнения получают консенсусную последовательность для секвенированного фрагмента ДНК. Консенсусная последовательность не должна содержать нераспознанных нуклеотидов. В противном случае проводится повторное секвенирование пробы ДНК, и новые нуклеотидные последовательности добавляются к полученным ранее для построения консенсусной последовательности.

6.2 Определение аллелей генов

После того, как получена консенсусная последовательность, не содержащая нераспознанных нуклеотидов, проводят ее сравнение с нуклео-

тидными последовательностями, представленными в базе данных GenBank с помощью программы BLAST (программа запускается по адресу [http:// blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast)).

Программа BLAST представляет результат в графическом виде, а также в виде таблицы, в которой перечислены все найденные нуклеотидные последовательности, расположенные по мере убывания сходства с исследуемой последовательностью.

Для отнесения полученной нуклеотидной последовательности к определенному аллелю гена (таблица 2) она должна на 100% совпадать с последовательностью аллеля гена, представленной в базе данных GenBank.

Таблица 2 – Аллели генов вирулентности *B. pertussis* с кодами доступа в GenBank

Название гена	Аллель гена	Код доступа
1	2	3
<i>ptxA</i> – ген, кодирующий субъединицу S1 коклюшного токсина	<i>ptxA1</i>	AJ245366
	<i>ptxA2</i>	AJ245367
	<i>ptxA4</i>	AJ506996.1
	<i>ptxA5</i>	AJ006159
	<i>ptxA6</i>	AJ506994
	<i>ptxA7</i>	AJ506995.1
	<i>ptxA8</i>	AY879289
	<i>ptxA9</i>	JX100835
	<i>ptxA10</i>	HM212424.1
	<i>ptxA11</i>	AY879289
	<i>ptxA12</i>	JX100836.1
	<i>ptxA13</i>	KF991239.1
<i>ptxC</i> – ген, кодирующий субъединицу S3 коклюшного токсина	<i>ptxC1</i>	M13223
	<i>ptxC2</i>	AJ420987
	<i>ptxC3</i>	KF991240.1
<i>ptxP</i> – промоторная область коклюшного токсина	<i>ptxP1</i>	FN252323.1
	<i>ptxP2</i>	FN252322.1
	<i>ptxP3</i>	FN252324.1
	<i>ptxP4</i>	FN252325.1
	<i>ptxP5</i>	FN252326.1
	<i>ptxP6</i>	FN252327.1
	<i>ptxP7</i>	FN252328.1

1	2	3
<i>ptxP</i> – промоторная область коклюшного токсина	<i>ptxP8</i>	FN252329.1
	<i>ptxP9</i>	FN252330.1
	<i>ptxP10</i>	FN252331.1
	<i>ptxP11</i>	FN252332.1
	<i>ptxP12</i>	FJ980276.1
	<i>ptxP15</i>	HM440343.1
	<i>ptxP16</i>	HM440344.1
	<i>ptxP17</i>	HM440341.1
	<i>ptxP18</i>	HM440342.1
	<i>ptxP19</i>	JQ029160.1
	<i>ptxP20</i>	KJ433481.1
<i>tcfA</i> – ген, кодирующий фактор колонизации трахеи	<i>tcfA1</i>	U16754
	<i>tcfA2</i>	AJ009785
	<i>tcfA3</i>	AJ420991
	<i>tcfA4</i>	AJ507643.1
	<i>tcfA5</i>	AJ420992
	<i>tcfA6</i>	AY375533.2
	<i>tcfA7</i>	AM238667.1
	<i>tcfA8</i>	AM238668.1
	<i>tcfA9</i>	AM260201.1
<i>prn</i> – ген, кодирующий пертактин	<i>prn1</i>	AJ011091
	<i>prn2</i>	AJ011092
	<i>prn3</i>	AJ011093
	<i>prn4</i>	AJ011015

1	2	3
<i>prn</i> – ген, кодирующий пертактин	<i>prn5</i>	AJ011016
	<i>prn6</i>	AJ132095
	<i>prn7</i>	AJ133784.1
	<i>prn8</i>	AJ133245.1
	<i>prn9</i>	AY382175.1
	<i>prn10</i>	AJ784875.1
	<i>prn11</i>	AJ507642.1
	<i>prn12</i>	AB278117.1
	<i>prn13</i>	EF486277.1
	<i>prn14</i>	HQ165753.1
	<i>prn15</i>	JX100834.1
	<i>prn16</i>	KC981248.1
	<i>prn17</i>	KC981249.1
	<i>prn18</i>	KJ433480.1
<i>fim2</i> – ген, кодирующий основной белок фимбрии 2	<i>fim2-1</i>	AY845256.1
	<i>fim2-2</i>	AJ420988
	<i>fim2-3</i>	GQ250864.1
<i>fim3</i> – ген, кодирующий основной белок фимбрии 3	<i>fim3-1</i>	X51543
	<i>fim3-2</i>	AY464180.1
	<i>fim3-3</i>	AY464181.1
	<i>fim3-4</i>	AY464179.1
	<i>fim3-5</i>	JX100833.1
	<i>fim3-6</i>	AY845257.1
	<i>fim3-7</i>	LK871856.1

Отсутствие в базе данных нуклеотидной последовательности со 100% гомологией в сравнении с исследуемой последовательностью свидетельствует об обнаружении нового аллеля определенного гена. Нуклеотидные последовательности полученные для каждого гена с прямого и обратного праймеров должны полностью перекрываться и не иметь различий. В противном случае следует провести повторное секвенирование данного образца.

На основании данных об аллелях всех семи генов вирулентности определяется аллельный профиль для каждого анализируемого клинического изолята.

Например:

Клинический изолят ВР2971

Аллельный профиль *ptxA1/ptxC2/ptxP3/tcfA2/prn2/fim2-1/fim3-2*

7 Определение сиквенс-типа штаммов *B. pertussis*

Для определения сиквенс-типа клинических изолятов *B. pertussis* проводят сравнение аллельных профилей анализируемых клинических изолятов с базой данных по молекулярно-генетической характеристике штаммов *B. pertussis* циркулирующих в Республике Беларусь. База данных имеет формат таблицы Excel и хранится в ГУ «РНПЦ эпидемиологии и микробиологии».

8 Филогенетический анализ штаммов *B. pertussis*

8.1 Построение филогенетического дерева

Все этапы филогенетического анализа проводят с использованием программы MEGA версии 5.2 и выше.

Для построения филогенетического дерева и сравнительного анализа используются клинические изоляты, штаммы *B. pertussis*, циркулировавшие в довакцинальный период, производственные вакцинные штаммы, штаммы, циркулирующие в мире.

Для филогенетического анализа штаммов *B. pertussis* используются нуклеотидные последовательности семи генов вирулентности (*ptxA*, *ptxC*, *ptxP*, *tcfA*, *prn*, *fim2*, *fim3*), полученных для каждого анализируемого штамма, штамма Tohama I как прототипного штамма циркулирующего в довакцинальный период и других сравниваемых штаммов.

На первом этапе проводят выравнивание нуклеотидных последовательностей отдельных генов различных штаммов между собой, а также с последовательностью соответствующего гена штамма Tohama I. После выравнивания удаляют все «выступающие края» так, чтобы все анализируемые последовательности генов были одинаковой длины.

После выравнивания отдельных генов для каждого анализируемого штамма, в том числе и штамма Tohama I, составляют общую нуклеотидную последовательность из фрагментов семи генов вирулентности (*ptxA*, *ptxC*, *ptxP*, *tcfA*, *prn*, *fim2*, *fim3*).

На основании этих последовательностей проводят построение дендрограммы с использованием статистического метода Neighbor Joining. Изоляты одного сиквенс-типа формируют на филограмме единые группы.



Рисунок 1. Филогенетическое дерево клинических изолятов *B. pertussis*, построенное на основании нуклеотидных последовательностей семи генов вирулентности (*ptxA*, *ptxC*, *ptxP*, *tcfA*, *prn*, *fim2*, *fim3*), с использованием алгоритма Neighbor Joining.

8.2 Анализ полученных результатов

Оценка популяции возбудителя коклюша проводится на основании данных о распространенности клинических изолятов определенных си-венс-типов, информации о дате и месте их выделения, а также на основании их группирования на филограмме. На основании филогенетического анализа определяется генетическая дивергенция анализируемых клинических изолятов. Наличие клинических изолятов группирующихся отдельно от ветви со сравниваемыми штаммами свидетельствует об их генетических отличиях.

9 Возможные проблемы при проведении молекулярно-генетического типирования штаммов *B. pertussis* на основании мультилокусного секвенирования генов

Проблемы	Возможные причины	Способы решения
<p>1.1) После проведения амплификации для накопления фрагмента гена, в геле отсутствует полоса нужной длины.</p> <p>1.2) В геле присутствует множество полос не соответствующих нужной длине.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - ДНК в образце разрушилась - наличие примесей в образцах 	<ul style="list-style-type: none"> - повторить выделение и очистку ДНК из образцов
<p>2) При первичном анализе нуклеотидные последовательности не выравниваются с нуклеотидной последовательностью гена типового штамма Tohama I и/или между собой.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - загрязнение образца неспецифическим фрагментами ДНК 	<ul style="list-style-type: none"> - повторить все этапы начиная с накопления фрагмента ДНК
<p>3) При сравнении нуклеотидных последовательностей с прямого и обратного праймеров имеются отличия в единичных нуклеотидах, что не позволяет построить консенсусную последовательность</p>	<ul style="list-style-type: none"> - ошибка полимеразы при секвенировании на одном из праймеров - ошибка программы при обработке первичных данных с ДНК-анализатора 	<ul style="list-style-type: none"> - анализ первичных данных с ДНК-анализатора, для определения на какой из нуклеотидных последовательностей имеется ошибка - повторное секвенирование пробы ДНК