

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель Министра –
Главный государственный
санитарный врач
Республики Беларусь

_____ Н.П.Жукова

«_____» _____ 20____ г.

Регистрационный №

МЕТОД СЕРОГЕНОТИПИРОВАНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЯ ПНЕВМОКОККОВОЙ
ИНФЕКЦИИ НА ОСНОВЕ МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ПОЛИМЕРАЗНОЙ
ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ:

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

Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский
университет»

АВТОРЫ: А.В.Давыдов, член-корр. НАН Беларуси, д-р мед. наук, проф.
Л.П.Титов

Минск, 2017

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

ВПК – внутренний положительный контроль

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

мПЦР – мультиплексная ПЦР

ПИ – пневмококковая инфекция

ПЦР – полимеразная цепная реакция

СМЖ – спинномозговая жидкость

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) изложен метод серотипирования возбудителя пневмококковой инфекцией (*Streptococcus pneumoniae*) на основе мПЦР с учетом распространенности серотипов в регионе, используемый для установления принадлежности пневмококка к серологическим типам.

Инструкция предназначена для специалистов учреждений, осуществляющих государственный санитарный надзор и (или) комплекс медицинских услуг, направленных на диагностику заболеваний либо патологических состояний, связанных с пневмококковой инфекцией (врачей-бактериологов, врачей лабораторной диагностики, врачей-эпидемиологов и др.).

Метод, изложенный в настоящей инструкции, позволяет определить принадлежность пневмококка к серологическим типам на основе обнаружения специфичных фрагментов различных генов капсульного *cps* локуса.

1 Показания к применению:

1.1 Заболевания и патологические состояния, характерные для различных форм пневмококковой инфекции (менингит – G00.1, пневмония – J13, септицемия – A40.3, артрит и полиартрит – M00.1 или других – B95.3), для подтверждения диагноза и установления серотипа возбудителя.

1.2 Заболевания и патологические состояния, ассоциированные с пневмококком (острый средний отит – H66, H67.0, острый синусит – J01, хронический синусит – J32, острый бронхит – J20.2, затяжной бактериальный бронхит – J41-J42, обостренная хроническая обструктивная легочная болезнь – J44), для установления этиологии заболевания и серотипа возбудителя.

1.3 Бактерионосительство пневмококка, эпизоды пневмококковой инфекции в анамнезе для установления серотипа пневмококка, прогнозирования эффективности санации и вакцинации.

1.4 Скрининговые исследования на бактерионосительство пневмококка с последующим установлением серотипа возбудителя.

1.5 Мониторинг за циркуляцией серологических вариантов пневмококка на конкретных территориях, надзор за распространением

невакцинных серотипов.

1.6 Идентификация чистых культур пневмококка в сложных (спорных) случаях.

2 Противопоказания для применения:

Отсутствуют.

3 Перечень необходимых медицинских изделий, реактивов, расходных материалов и т.д.

3.1 Перечень необходимых медицинских изделий:

- 3.1.1 ПЦР-бокс с УФ-лампой.
- 3.1.2 Амплификатор (термоциклер).
- 3.1.3 Миницентрифуга-вортекс.
- 3.1.4 Твердотельный термостат.
- 3.1.5 Комплект пипеточных дозаторов (0,5-10 мкл; 20-100 мкл; 50-200 мкл; 200-1000 мкл) для ПЦР.
- 3.1.6 Пипеточный дозатор для гель-электрофореза (2-20 мкл).
- 3.1.7 Холодильник (2-8 °С) с морозильной камерой (-20 °С).
- 3.1.8 Весы лабораторные (0,1-10 г).
- 3.1.9 Водяная баня или СВЧ-печь.
- 3.1.10 Камера для горизонтального электрофореза.
- 3.1.11 Набор пластиковых кювет для геля.
- 3.1.12 Набор гребенок.
- 3.1.13 Набор планшетов для смешивания продукта ПЦР-реакции с загрузочным буфером.

3.1.14 Стеклопосуда для приготовления агарозного геля.

3.1.15 Трансиллюминатор.

3.2 Перечень необходимых реактивов для проведения ПЦР:

- 3.2.1 Буфер для ДНК-полимеразы (10х).
- 3.2.2 ДНК-полимераза (5 ЕД/мкл).
- 3.2.3 Раствор MgCl₂ (25 мМ).
- 3.2.4 Смесь дезоксирибонуклеотидтрифосфатов дНТФ (10 мМ).

3.2.5 Вода для ПЦР (стерильная бидистиллированная вода, свободная от ДНКазы и ингибиторов ПЦР).

3.2.6 Праймеры (таблица 2).

3.2.7 Минеральное масло для ПЦР.

3.3 Перечень необходимых реактивов для проведения электрофоретического разделения продуктов амплификации:

3.3.1 Агароза.

3.3.2 ТАЕ-буфер, 50х.

3.3.3 Загрузочный буфер для гель-электрофореза с красителем(ями) (6х).

3.3.4 Маркер молекулярного веса ДНК (100-1000 п.н.).

3.3.5 Раствор бромида этидия (10 мг/мл).

3.3.6 Дистиллированная вода.

3.4 Перечень необходимых расходных материалов:

3.4.1 Халаты (отдельные для каждого этапа работы).

3.4.2 Нитриловые неопудренные перчатки (отдельные для каждого этапа работы).

3.4.3 Наконечники для дозаторов с фильтром объемом 10, 100, 200, 1000 мкл.

3.4.4 Пробирки или планшет для ПЦР, соответствующие типу используемого амплификатора (термоциклера).

3.4.5 Штативы для пробирок (планшетов).

Качество используемых реагентов должно соответствовать техническим требованиям, предъявляемым к реагентам для проведения молекулярно-генетических исследований. ДНК-полимераза должна быть оснащена технологией горячего старта, иметь достаточно высокую чувствительность (обнаруживать бактериальную ДНК в количестве 1 пкг) и специфичность – подходить для мПЦР (12 праймеров – 6 мишеней в формате одной пробирки). Агароза должна подходить для аналитического электрофореза с возможностью качественного разделения фрагментов двухцепочечной ДНК, размером 100-1000 п.н.

4 Описание технологии используемого метода

Этап I. Экстракция ДНК из исследуемого материала

Экстракция ДНК из чистых культур изолятов бактерий

Наиболее простым, быстрым и наименее затратным методом экстракции ДНК из чистых культур изолятов бактерий является метод кипячения, позволяющий получить ДНК удовлетворительного качества. Также возможно применение любых других методов, позволяющих получить более очищенную ДНК. Перед применением метода, изложенного в настоящей инструкции, для серогенотипирования чистых культур бактерий необходимо выполнить идентификацию исследуемой культуры и предварительно подтвердить ее принадлежность к виду *Streptococcus pneumoniae*.

Для экстракции ДНК 18-24 часовую культуру необходимо суспензировать в 300 мкл физиологического раствора до получения мутной суспензии, сопоставимой со стандартом 3,0 по МакФарланду. Затем пробирки инкубируют при 70 °С в течение 15 минут, центрифугируют при 12000 оборотов в минуту в течение 2 минут, после чего удаляется надосадочная жидкость, а осадок ресуспендируют в 300 мкл воды для ПЦР. Далее пробирки инкубируют при 100 °С в течение 10 минут, после чего центрифугируют при 12000 оборотов в минуту 4 минуты. Затем надосадочная жидкость, содержащая ДНК, переносится в отдельные пробирки с последующим хранением не более 3 месяцев в морозильной камере (-20 °С).

Экстракция ДНК из образцов биологического материала

Образцы биологического материала могут представлять собой цельную кровь, плазму, сыворотку крови, СМЖ, плевральную жидкость, жидкость среднего уха, гной, мокроту, мазки из носоглотки, секционный материал (ткани легких, мозговых оболочек и др.). Экстракцию ДНК из данных образцов можно выполнять различными методами с использованием коммерческих систем в соответствии с инструкцией производителя, но обеспечивающих получение ДНК высокой чистоты с выходом не менее 70% (например, сорбентный метод с использованием центрифужных силика-колонок или жидкого сорбента).

Перед применением метода, изложенного в настоящей инструкции, для серогенотипирования пневмококка напрямую в клинических образцах необходимо выполнить молекулярно-генетическое подтверждение наличия ДНК пневмококка в образце с использованием специфичных генетических мишеней (ген аутолизина *lytA*, либо более специфичные), или с использованием коммерческих систем.

Этап II. Последовательная постановка мультиплексных ПЦР-реакций для серогенотипирования пневмококка

Метод, изложенный в настоящей инструкции, для серогенотипирования пневмококка предполагает последовательную постановку мультиплексных ПЦР-реакций (от одной до восьми реакций) до момента получения положительного результата – выявления принадлежности штамма к одному из серотипов (или их комбинации). Только в редких случаях может иметься необходимость постановки всех восьми ПЦР-реакций даже после выявления какого-либо серотипа – обоснованное предположение о ко-колонизации несколькими серотипами (что необходимо в исследованиях на носительство пневмококка).

В ПЦР-боксе готовится реакционная смесь в соответствии с таблицей 1 для постановки одной конкретной реакции из схемы (таблица 2). Для исследования более одного образца готовится общая реакционная пре-смесь, в которую входят все компоненты смеси (кроме образца ДНК) в количестве, соответствующем числу исследуемых образцов, одному отрицательному контролю (выделенная из воды ДНК), пяти положительным контролям (соответствующим определяемым в данной реакции серотипам) – в случае использования выделенной из клинических образцов ДНК и 1-2 дополнительным реакциям. Перед приготовлением смеси необходимо перемешать на вортексе и центрифугировать все используемые реактивы.

Таблица 1 – Компоненты реакционной смеси ПЦР

Компонент ¹	Необходимое количество на одну ПЦР-реакцию	Концентрация (количество) в ПЦР-реакции
Вода для ПЦР	до 25 мкл	–
Буфер для ДНК-полимеразы (10х)	2,5 мкл	1х
Раствор MgCl ₂ (25 мМ)	3 мкл	3мМ
Смесь дНТФ (10 мМ)	0,5 мкл	0,2 мМ
Праймеры	в соответствии с таблицей 2	
ДНК-полимераза (5ЕД/мкл)	0,2 мкл	1 ЕД
Образец ДНК	2–5 ² мкл	1 пкг – 10 нг

1 – компоненты вносятся в порядке, указанном в данной таблице.

2 – рекомендованное количество образца ДНК составляет 2 мкл при выделении из чистых культур бактерий и 5 мкл при выделении из образцов биологического материала.

Таблица 2 – Последовательность постановки ПЦР-реакций, определяемые в них серотипы, используемые последовательности праймеров, рекомендованные концентрации праймеров в реакционной смеси и размер продуктов реакции

Определяемые серотипы	Последовательность прямого и обратного праймеров (5`–3`)	Концентрация праймеров в реакционной смеси (мкМ)	Размер продукта (п.н.)
Реакция 1			
cpsA	GCAGTACAGCAGTTTGTGGACTGACC GAATATTTTCATTATCAGTCCCAGTC	0,1	160
14	GAAATGTTACTTGGCGCAGGTGTCAGAATT GCCAATACTTCTTAGTCTCTCAGATGAAT	0,3	189
6A/6B/6C/6D ¹	AATTTGTATTTTATTCATGCSTATATCTGG TTAGCGGAGATAATTTAAAATGATGACTA	0,3	250
23F	GTAACAGTTGCTGTAGAGGGAATTGGCTTTTC CACAACACCTAACACTCGATGGSTATATGATTC	0,5	384
19A	GAGAGATTCATAATCTTGCACTTAGCCA CATAATAGCTACAAATGACTCATCGCC	0,3	566
9V/9A	GGGTCAAAGTCAGACAGTGAATCTTAA CCATGAATGAAATCAACATTGTCAGTAGC	0,5	816
Реакция для 6-й серогруппы			
cpsA	GCAGTACAGCAGTTTGTGGACTGACC GAATATTTTCATTATCAGTCCCAGTC	0,1	160
6A/6B/6C/6D	AATTTGTATTTTATTCATGCSTATATCTGG TTAGCGGAGATAATTTAAAATGATGACTA	0,3	250

Определяемые серотипы	Последовательность прямого и обратного праймеров (5`-3`)	Концентрация праймеров в реакционной смеси (мкМ)	Размер продукта (п.н.)
6C/6D	CATTTTAGTGAAGTTGGCGGTGGAGTT AGCTTCGAAGCCCATACTCTTCAATTA	0,5	727
Реакция 2			
cpsA	GCAGTACAGCAGTTTGTGGACTGACC GAATATTTTCATTATCAGTCCCAGTC	0,1	160
19F	GTTAAGATTGCTGATCGATTAATTGATATCC GTAATATGCTTTTAGGGCGTTTATGGCGATAG	0,5	304
3	ATGGTGTGATTTCTCCTAGATTGGAAAGTAG CTTCTCCAATTGCTTACCAAGTGCAATAACG	0,3	371
15B/15C	TTGGAATTTTTTAATTAGTGGCTTACCTA CATCCGCTTATTAATTGAAGTAATCTGAACC	0,3	496
18C/18F/18B/ 18A	CTTAATAGCTCTCATTATCTTTTTTTAAGCC TTATCTGTA AACCATATCAGCATCTGAAAC	0,3	573
17F	TTCGTGATGATAATTCCAATGATCAAACAAGAG GATGTAACAAATTTGTAGCGACTAAGGTCTGC	0,5	693
Реакция для 18-й серогруппы			
cpsA	GCAGTACAGCAGTTTGTGGACTGACC GAATATTTTCATTATCAGTCCCAGTC	0,1	160
18A	CTTACAGAGTCAACGGGGCTCCATAA TACCAGAATGCGGCATTTAAACTAAAGTGA	0,4	338
18F	GTACCAGCTAGGATACTGGCCTATAGATAGTG TCTACSTTTCTATCCACAAAGTCACACC	0,4	577
18C/18B	CAGTTGGAGAAAGTCCGCTTAAAACGAT AGTCATAATGCAGTAATAGGTTAGGCAGCA	0,4	1055
Реакция 3			
cpsA	GCAGTACAGCAGTTTGTGGACTGACC GAATATTTTCATTATCAGTCCCAGTC	0,1	160
1	CTCTATAGAATGGAGTATATAAACTATGGTTA CCAAAGAAAATACTAACATTATCACAATATTGGC	0,3	280
5	ATACCTACACAACCTTCTGATTATGCSTTTGTG GCTCGATAAACATAATCAATATTTGAAAAAGTATG	0,3	362
9N/9L	GAACCTGAATAAGTCAGATTTAATCAGC ACCAAGATCTGACGGGCTAATCAAT	0,5	516
7F/7A	TCCAAACTATTACAGTGGGAATTACGG ATAGGAATTGAGATTGCCAAAGCGAC	0,4	599
16F	GAATTTTTCAGGCGTGGGTGTTAAAAG CAGCATATAGCACCGCTAAGCAAATA	0,4	717
Реакция 4			
cpsA	GCAGTACAGCAGTTTGTGGACTGACC GAATATTTTCATTATCAGTCCCAGTC	0,1	160
7C/7B/40	CTATCTCAGTCATCTATTGTTAAAGTTTACGACGGGA GAACATAGATGTTGAGACATCTTTTGTAATTC	0,3	260
12F/12A/12B/ 44/46	GCAACAAACGGCGTGAAAGTAGTTG CAAGATGAATATCACTACCAATAACAAAAC	0,5	376

Определяемые серотипы	Последовательность прямого и обратного праймеров (5`-3`)	Концентрация праймеров в реакционной смеси (мкМ)	Размер продукта (п.н.)
11A/11D	GGACATGTTTCAGGTGATTTCCCAATATAGTG GATTATGAGTGTAATTTATTCSCAACTTCTCCC	0,3	463
10A	GGTGTAGATTTACCATTAGTGTTCGGCAGAC GAATTTCTTCTTTAAGATTCGGATATTTCTC	0,5	628
23A	TATTCTAGCAAGTGACGAAGATGCG CCAACATGCTTAAAAACGCTGCTTTAC	0,5	722
Реакция 5			
cpsA	GCAGTACAGCAGTTTGTGGACTGACC GAATATTTTCATTATCAGTCCCAGTC	0,1	160
21	СТАТGGTTATTTCAACTCAATCGTCACC GGCAAACCTCAGACATAGTATAGCATAG	0,2	192
33F/33A/37	GAAGGCAATCAATGTGATTGTGTTCGCG CTTCAAAATGAAGATTATAGTACCSTTCTAC	0,3	338
15A/15F	ATTAGTACAGCTGCTGGAATATCTCTTC GATCTAGTGAACGTACTATTCCAAAC	0,3	434
35F/47F-f	GAACATAGTCGCTATTGTATTTTATTTAAAGCAA GACTAGGAGCATTATTCCTAGAGCGAGTAAACC	0,3	517
13	ТАСТАAGGTAATCTCTGGAAATCGAAAGG CTCATGCATTTTATTAACCGCTTTTTGTTC	0,4	655
Реакция 6			
cpsA	GCAGTACAGCAGTTTGTGGACTGACC GAATATTTTCATTATCAGTCCCAGTC	0,1	160
8	GAAGAAACGAAACTGTCAGAGCATTTACAT СТАТАGATACTAGTAGAGCTGTTCTAGTCT	0,2	201
2	TATCCCAGTTCAATATTTCTCCACTACACC ACACAAAATATAGGCAGAGAGAGACTACT	0,3	290
4	CTGTTACTTGTCTGGACTCTCGATAATTGG GCCCACTCCTGTAAAATCCTACCCGCATTG	0,3	430
20	GAGCAAGAGTTTTTCACCTGACAGCGAGAAG СТАААТTCCTGТААТТАGCTAAAACSTTTATC	0,3	514
22F/22A	GAGTATAGCCAGATTATGGCAGTTTTATTGTC CTCCAGCACTTGCCTGGAAACAACAGACAAC	0,5	643
Реакция 7			
39	TCATTGTATTAACCSTATGCTTTATTGGTG GAGTATCTCCATTGTATTGAAATCTACCAA	0,2	98
cpsA	GCAGTACAGCAGTTTGTGGACTGACC GAATATTTTCATTATCAGTCCCAGTC	0,1	160
23B	CCACAATTAGCGCTATATTCATTCAATCG GTCCACGCTGAATAAAATGAAGCTCCG	0,2	199
35A/35C/42	ATTACGACTCCTTATGTGACGCGCATA CCAATCCCAAGATATATGCAACTAGGTT	0,3	280
38/25F/25A	CGTTCTTTTATCTCACTGTATAGTATCTTTATG ATGTTTGAATTAAGCTAACGTAACAATCC	0,3	574
35B	GATAAGTCTGTTGTGGAGACTTAAAAAGAATG CTTCCAGATAATTACAGGTATTCCTGAAGCAAG	0,5	677

Определяемые серотипы	Последовательность прямого и обратного праймеров (5`-3`)	Концентрация праймеров в реакционной смеси (мкМ)	Размер продукта (п.н.)
Реакция 8			
24F/24A/24B	GCTCCCTGCTATTGTAATCTTTAAAGAG GTGTCTTTTATTGACTTTATCATAGGTCGG	0,2	99
cpsA	GCAGTACAGCAGTTTGTGGACTGACC GAATATTTTCATTATCAGTCCCAGTC	0,1	160
10F/10C/33C	GGAGTTTATCGGTAGTGCTCATTTTAGCA СТААСАААТТСГСААСАСГАГГСААСА	0,3	248
34	GCTTTTGTAAGAGGAGATTATTTTCACCCAAC СААТССГАСТААГТСТСГАТAAAAAACTTTAC	0,3	408
19F_var	GACAATTCTGGTTGACTTGTTGATTTTG СТАССАААТАССТСАССАГСТТСС	0,2	585
31	GGAAGTTTTCAAGGATATGATAGTGGTGGTGC ССГААТААТАТАТТСААТАТАТТССТАСТС	0,5	701

1 – серотипы, ко-детектируемые с использованием праймеров, перечислены в порядке снижения их встречаемости.

Подготовленная реакционная пре-смесь перемешивается на вортексе, центрифугируется и разливается в отдельные пробирки в необходимом количестве (20-23 мкл).

В каждую пробирку с пре-смесью вносят исследуемую ДНК, перемешивают на вортексе и центрифугируют.

В случае, если амплификатор не оснащен технологией подогрева крышек пробирок, аккуратно вносят 1 каплю минерального масла для ПЦР поверх реакционной смеси.

Проводят амплификацию при следующих условиях:

95 °C 3:00
94 °C 0:30 }
54 °C 0:45 } x35
72 °C 0:60 }
72 °C 10:00
4 °C ∞

Этап III. Электрофорез продуктов ПЦР-реакции в агарозном геле

Для приготовления 2%-агарозного геля 2 г агарозы растворяют в 98 г 1x TAE-буфера. Нагревают смесь на водяной бане или в СВЧ-печи, периодически перемешивая до полного растворения кристаллов агарозы. Затем массу раствора доводят до 100 г путем добавления кипящей дистиллированной воды. После остывания до 60 °С в раствор добавляют 2,5 мкл раствора бромида этидия (10 мг/мл) и аккуратно перемешивают.

Расплавленную агарозу заливают в кювету с установленной гребенкой и выдерживают при комнатной температуре до полного застывания геля (30-60 минут в зависимости от толщины геля и температуры помещения). Полученный гель помещают в камеру для горизонтального электрофореза, заполненную 1x TAE-буфером.

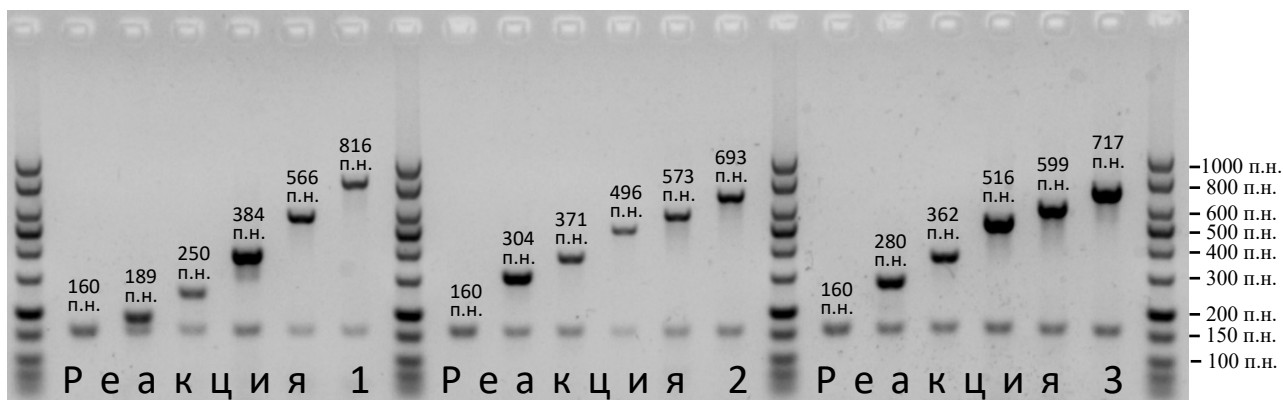
В лунки геля вносят 2-10 мкл (по 1-2 мкл на каждый мм ширины лунки) продукта ПЦР-реакции, который предварительно в лунке планшетов смешивают в пропорции 5:1 с загрузочным буфером для гель-электрофореза (6x), содержащим краситель(и) для удобства визуального наблюдения за процессом электрофореза.

Для оценки размера продуктов реакции в центральные лунки 1-2 лунки (в зависимости от количества проб в одном геле) вносят маркер молекулярного веса ДНК, содержащий фрагменты двухцепочечной ДНК – 100 п.н., 200 п.н., 300 п.н., 400 п.н., 500 п.н., 600 п.н., 800 п.н., 1000 п.н.

Электрофорез проводят при напряжении 7 В/см в течении 80 минут (гель 6 см) – 110 минут (гель 12 см).

Для визуализации продуктов реакции используют трансиллюминатор или систему гель-документирования.

Учет проводят по появлению полос специфического размера на расстоянии, соответствующем длине пробега синтезируемого фрагмента ДНК (рисунок 1).



Реакция 1 (ВПК *cpsA*, серотипы 14-й, 6A/6B/6C/6D, 23F, 19A, 9V/9A), реакция 2 (ВПК *cpsA*, серотипы 19F, 3-й, 15B/15C, 18C/18F/18B/18A, 17F), реакция 3 (ВПК *cpsA*, серотипы 1-й, 5-й, 9N/9L, 7F/7A, 16F).

Рисунок 1 – Электрофореграмма продуктов ПЦР-реакций №1-3

Этап IV. Анализ и интерпретация результатов

Анализ результатов начинают с учета ВПК – наличия фрагмента 160 п.н., соответствующего гену регуляции синтеза капсулы пневмококка (*cpsA*). **Положительный результат** (наличие полосы удовлетворительной яркости) свидетельствует об успешном прохождении ПЦР-реакции, наличии ДНК матрицы в достаточном количестве, а также в какой-то степени (из-за невысокой специфичности мишени) свидетельствует о принадлежности исследуемого штамма к виду *Streptococcus pneumoniae*. **Отрицательный** (отсутствие полосы) и **сомнительный результаты** (полоса низкой яркости) свидетельствуют о наличии недостаточного количества ДНК матрицы, либо неуспешном прохождении ПЦР-реакции (ввиду ошибок в постановке или наличии ингибиторов ПЦР, например, ДНК в высокой концентрации), либо о принадлежности исследуемого штамма к другому виду, нежели чем *Streptococcus pneumoniae*. В редких случаях штаммы пневмококка серотипов 25, 38, 14 и 35A могут давать отрицательный результат на наличие гена *cpsA*, однако демонстрировать положительный результат на определенный серотип. Поэтому, в случае, если все иные причины исключены, возможно исследование таких образцов во всех реакциях схемы. Однако, стоит иметь ввиду, что до настоящего времени подобных штаммов не было выявлено на территории Беларуси.

При учете **отрицательного контроля** должно наблюдаться полное отсутствие каких-либо видимых полос. Наличие различимой полосы, размером 160 п.н., соответствующей гену регуляции синтеза капсулы пневмококка (*cpsA*), или полос, соответствующих продуктам других серотипов, свидетельствует о кросс-контаминации образцов ДНК в процессе экстракции, либо о контаминации помещений, оборудования, реактивов ампликонами (продуктами амплификации). Наличие различных полос других размеров свидетельствует о наличии контаминации ДНК иного происхождения (другие виды бактерий, человеческая ДНК и др.).

Установление принадлежности исследуемого штамма к серологическому типу выполняется на основании визуализации полос приемлемой яркости (сопоставимой яркости или более ярких, чем полоса гена регуляции синтеза капсулы *cpsA*), соответствующих по размеру ожидаемым продуктам реакции (таблица 2). Появление полос более низкой яркости, чем полоса гена регуляции синтеза капсулы *cpsA*, расценивается как сомнительный результат и свидетельствует чаще всего об образовании неспецифического продукта реакции. Образование неспецифических продуктов было отмечено для некоторых штаммов пневмококка в реакции 2 (≈ 660 п.н. соответствует по размеру продукту серотипа 17F), а также некоторых близкородственных штаммов в реакции 2 (≈ 507 п.н. соответствует по размеру продукту серотипов 18C/18F/18B/18A) и реакции 8 (≈ 192 п.н. соответствует по размеру продукту серотипов 10F/10C/33C). Заключение о серотиповой принадлежности таких штаммов в случае получения описанных результатов следует выполнять только после постановки всех восьми ПЦР-реакций схемы и выполнения повторной идентификации исследуемого штамма (или обнаружения его ДНК в клинических образцах). Образование различных неспецифических продуктов разного размера отмечено также при выполнении серогенотипирования проб ДНК, полученных из образцов клинического материала (вероятно, ввиду наличия человеческой ДНК). В этом случае учет результатов необходимо выполнять при прямом визуальном сравнении с результатами положительных контролей серотипов,

определяемых в данной реакции. С контрольной целью может использоваться ДНК, экстрагированная из чистых культур штаммов разных серотипов – набора контрольных штаммов или клинических штаммов с установленными серотипами.

Следует учитывать, что, хотя праймеры и разрабатывались с целью обеспечения высокого уровня специфичности при обнаружении серотипов пневмококка, из-за высокой гомологии генов-мишеней некоторые праймеры не способны обнаруживать отдельные серотипы, а ко-детектируют только комбинации серотипов (например, 9V/9A – в пределах одной серогруппы, или 12F/12A/12B/44/46 – в пределах нескольких разных серогрупп). По этой причине, в наименовании праймера более часто встречающийся серотип расположен на первом месте, а затем расположены значительно реже встречающиеся серотипы. В связи с этим, при анализе результатов генотипирования применяется допущение о том, что полученный результат свидетельствует об обнаружении серотипа, встречающегося значительно чаще (т.е. который в наименовании праймеров указан первым). Однако, общепринятой формой записи результатов является указание всех ко-детектируемых серотипов.

Перечень возможных ошибок при выполнении и пути их устранения

В таблице 3 представлены наиболее часто возникающие ошибки при применении метода, изложенного в настоящей инструкции, их возможные причины и пути устранения.

Таблица 3 – Возможные ошибки или осложнения и пути их устранения

Проблема	Возможная причина	Пути устранения
Отсутствие специфических продуктов ПЦР-реакций	Низкая концентрация ДНК	Использовать методы экстракции ДНК, обеспечивающие достаточный выход (не менее 70% для клинических образцов)
	Дегградация ДНК из-за несоблюдения условий, сроков хранения, использовании неподходящих материалов	Осуществить повторное выделение ДНК; соблюдать сроки и условия хранения ДНК; удостовериться в соответствии используемых материалов цели применения

Проблема	Возможная причина	Пути устранения
	Несоблюдение концентраций компонентов реакций	Перед приготовлением смесей перемешать на вортексе и центрифугировать все используемые реагенты; центрифугировать пре-смесь перед распределением ее по пробиркам; исключить ошибки приготовления реакционной смеси
	Порча реагентов из-за несоблюдения условий, сроков хранения; превышения числа регламентированных циклов замораживания–оттаивания	Использование качественных, свежих реагентов; соблюдение сроков и условий хранения; распределение реагентов по отдельным аликвотам
	Присутствие ингибиторов ПЦР	Осуществить экстракцию ДНК методом, обеспечивающим получение более очищенной ДНК; удостовериться в соответствии используемых реагентов цели применения
Наличие неспецифических продуктов ПЦР-реакций	Использование ДНК, экстрагированной из клинических образцов; Исследование ДНК возбудителей других видов	см. этап 4 технологии выполнения метода, изложенного в настоящей инструкции
Наличие специфических продуктов в отрицательном контроле	Кросс-контаминация; контаминация продуктами амплификации (ампликонами)	Разделение функциональных рабочих зон; Соблюдение поточности и направления движения анализируемых образцов; Использование отдельных лабораторных халатов в каждой рабочей зоне; Использование одноразовых перчаток без талька и отдельных в каждой рабочей зоне; Использование наконечников для дозаторов с фильтрами, защищающими от контаминации; Использование одноразовых пластиковых пробирок, посуды, наконечников; Химическая и УФ дезинфекция всех поверхностей рабочих зон; Использование положительного и отрицательного контролей