

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель Министра –
Главный государственный
санитарный врач



А.А. Тарасенко

2022 г.

Регистрационный № 036-0622

МЕТОД МОЛЕКУЛЯРНОГО ТИПИРОВАНИЯ ШТАММОВ
SALMONELLA ENTERICA НА ОСНОВЕ СЕКВЕНИРОВАНИЯ
ФРАГМЕНТОВ 7 ГЕНОВ «ДОМАШНЕГО ХОЗЯЙСТВА»

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: государственное учреждение
«Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и
микробиологии»

АВТОРЫ: академик НАН Беларуси, д-р мед. наук, профессор
Титов Л.П., Бакаева Т.Н.

Минск 2022

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель Министра –
Главный государственный
санитарный врач

_____ А.А. Тарасенко

26.08.2022.

Регистрационный № 036-0622

МЕТОД МОЛЕКУЛЯРНОГО ТИПИРОВАНИЯ ШТАММОВ
SALMONELLA ENTERICA НА ОСНОВЕ СЕКВЕНИРОВАНИЯ
ФРАГМЕНТОВ 7 ГЕНОВ «ДОМАШНЕГО ХОЗЯЙСТВА»

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: государственное учреждение
«Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и
микробиологии»

АВТОРЫ: академик НАН Беларуси, д-р мед. наук, профессор
Титов Л.П., Бакаева Т.Н.

Минск 2022

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) изложен метод молекулярного типирования штаммов *Salmonella enterica* на основе секвенирования последовательностей 7 генов «домашнего хозяйства». Метод может быть использован для совершенствования эпидемиологического слежения за возбудителем сальмонеллеза и установления генетических взаимосвязей штаммов *Salmonella*.

Мультилокусное сиквенс-типирование (МЛСТ) является ценным инструментом для анализа клональных отношений между штаммами сальмонелл, для долгосрочного эпидемиологического и популяционно-генетического анализа. Общедоступные базы данных и система онлайн-запросов обеспечивают высокую воспроизводимость результатов МЛСТ и возможность обмена между лабораториями. Кроме того, типирование по геномной последовательности ДНК на основе МЛСТ имеет большую дискриминационную возможность по сравнению с классическим серотипированием и позволяет установить генетические различия среди сальмонелл одного серотипа.

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

1. Показания к применению

Сальмонеллез (МКБ-10 - A02)

2. Противопоказания к применению: отсутствуют.

3. Перечень необходимых медицинских изделий, реагентов, расходных материалов и др.

Таблица 1–Изделия медицинской техники для проведения секвенирования

<i>Экстракция ДНК</i>
ПЦР-бокс
Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» (до 14 000g)
Термостат твердотельный для микропробирок на 1,5 мл и 0,5 мл (диапазон рабочих температур от +25°С до+99°С)
Микроцентрифуга-вортекс
Комплект пипеточных дозаторов (0,5-10 мкл; 20-200 мкл; 200-1000 мкл)
Продолжение таблицы 1
Холодильник, диапазон рабочих температур от +2°С до +4°С
Морозильная камера, диапазон рабочих температур от -16°С до -20°С
Бактерицидная УФ-лампа
<i>Проведение ПЦР-реакции</i>
ПЦР-бокс
Термоциклер для проведения ПЦР
Микроцентрифуга-вортекс
Бактерицидная УФ-лампа
Комплект пипеточных дозаторов (0,5-10 мкл; 20-200 мкл)
Холодильник, диапазон рабочих температур от +2°С до +4°С
Морозильная камера, диапазон рабочих температур от -16°С до -20°С
<i>Проведение электрофоретической детекции</i>
Микроцентрифуга-вортекс
Комплект пипеточных дозаторов (0,5-10 мкл; 20-200 мкл)
Холодильник, диапазон рабочих температур от +2°С до +4°С
Морозильная камера, диапазон рабочих температур от -16°С до -20°С
Система для проведения горизонтального гель-электрофореза
Источник постоянного тока для электрофореза
УФ-трансиллюминатор
Бактерицидная УФ-лампа
<i>Очистка продуктов реакции циклического секвенирования</i>
Комплект пипеточных дозаторов (0,5-10 мкл; 20-200 мкл)
Микроцентрифуга-вортекс
Морозильная камера, диапазон рабочих температур от -16°С до -20°С
Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» (до 14 000 g)
<i>Секвенирование</i>
Секвенатор ДНК

Таблица 2 –Реактивы для проведения секвенирования

<i>Выделение ДНК</i>
Набор реагентов для выделения ДНК из биологического материала
Набор реагентов для выделения ДНК из культур микроорганизмов
Набор реагентов для выделения ДНК из агарозного геля
<i>Проведение ПЦР-реакции</i>
Набор реагентов для проведения ПЦР
ДНК-полимераза с буфером
Раствор MgCl ₂ (50мМ)
Смесь дНТФ (10 мМ)
Олигонуклеотидные праймеры 10 пМ
Вода стерильная бидистиллированная свободная от нуклеаз
Набор реагентов для реакции циклического секвенирования
<i>Проведение электрофоретической детекции</i>
Продолжение таблицы 2
Агароза для электрофореза
Маркер молекулярного веса (от 100 п.о., 1000 п.о.)
ТАЕ-буфер
Бромистый этидий
<i>Очистка продуктов реакции циклического секвенирования</i>
Этанол медицинский 96,6%
Этанол медицинский 70%
Ацетат натрия (3М)
ЭДТА (125 mM)
Формаид
<i>Проведение секвенирования</i>
Набор реагентов в соответствии с инструкцией производителя секвенатора

4.Технология осуществления метода

Материалом для исследования являются ДНК сальмонелл, выделенных из чистых культур бактерий или биологического материала. Типирование изолятов сальмонелл проводится путем определения нуклеотидных последовательностей амплифицированных фрагментов ДНК генома *Salmonella enterica* и последующего сравнения с образцами международного банка GenBank методами биоинформационного анализа.

1) *Экстракция ДНК сальмонелл.* Выделение тотальной ДНК проводят с использованием коммерческого набора, предназначенного для выделения ДНК из биологического материала (фекалии, мазок на ПКФ т.д.) или из чистых культур микроорганизмов. Выделенные образцы ДНК хранят при -20°C не более 1 года. Допускается хранение биологического материала при -70°C не более 1 года для повторного выделения ДНК.

2) *ПЦР для амплификации генов «домашнего хозяйства» сальмонелл,* используемые для MLST: thrA (аспартокиназа гомосериндегидрогеназа), purE (фосфорибозиламиноимидазол карбоксилаза), sucA (альфа-кетоглутаратдегидрогеназа), hisD (гистидинолдегидрогеназа), aroC (хоризматсинтаза), hemD (косинтаза уропорфириногена III), dnaN (бета-субъединица ДНК-полимеразы III).

Последовательности праймеров представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Праймеры, используемые при ПЦР амплификации генов «домашнего хозяйства» сальмонелл

Наименование праймера	Последовательность праймера (5'-3')	Размер продукта реакции, п.н.
thrA-f	GTCACGGTGATCGATCCGGT	852
thrA-r	CACGATATTGATATTAGCCCG	
purE-f	GACACCTCAAAAGCAGCGT	510
purE-r	AGACGGCGATACCCAGCGG	
sucA-f	CGCGCTCAAACAGACCTAC	643
sucA-r	GACGTGGAAAATCGGCGCC	
hisD-f	GAAACGTTCCATTCCGCGC	894
hisD-r	GCGGATTCCGGCGACCAG	
aroC-f	CCTGGCACCTCGCGCTATAC	826
aroC-r	CCACACACGGATCGTGGCG	
hemD-f	GAAGCGTTAGTGAGCCGTCTGCG-	666
hemD-r	ATCAGCGACCTTAATATCTTGCCA	

Продолжение таблицы 3		
dnaN-f	ATGAAATTTACCGTTGAACGTGA	833
dnaN-r	AATTTCTCATTCGAGAGGATTGC	

Объем смеси для амплификации генов «домашнего хозяйства» составляет 25 мкл (таблица 4).

Таблица 4 – Компоненты реакционной смеси ПЦР

Компонент	Необходимое количество на одну ПЦР-реакцию
Вода для ПЦР	до 25 мкл
Буфер для ДНК-полимеразы (10х)	2,5 мкл
MgCl ₂ (50мМ)	1 мкл
Смесь дНТФ (10 мМ)	0,5 мкл
Прямой праймер (F) (10 мМ)	1 мкл
Обратный праймер(R) (10 мМ)	1 мкл
0,25 ДНК-полимераза (5ЕД/мкл)	0,2 мкл
Образец ДНК	1–3мкл

Амплификация проводится в автоматическом режиме по заданным программам, представленным в таблице 5

Таблица 5 – Режим амплификации

Гены	Шаг	Температура	Время
thrA, purE, sucA, hisD, aroC, dnaN	денатурация	94°C	5 мин
	35 циклов	94°C	40 с
		62°C	40 с
		72 °C	1 мин
	элонгация	72 °C	5 мин
hemD	денатурация	94°C	5 мин
	35 циклов	94°C	5 мин
		58°C	40 с
		72 °C	1 мин
	элонгация	72 °C	5 мин

Анализ продуктов амплификации осуществляют методом электрофореза в 1,5% агарозном геле с последующим окрашиванием бромистым этидием (0,5 мг/мл) и детекцией в ультрафиолетовом трансиллюминаторе (312 нм). При наличии в дорожках геля полосы, соответствующей длины, фрагмент вырезается стерильным скальпелем и помещается в стерильную пластиковую пробирку, маркируется в соответствии с номером пробы. Очистка продуктов амплификации осуществляется колоночным методом на коммерческих наборах в соответствии с инструкцией производителя.

3) *Реакция циклического секвенирования.* С подготовленными пробами выполняется секвенирующая ПЦР в соответствии с инструкцией к используемому набору. Для каждой пробы проводят 2 реакции — отдельно с прямого и обратного праймеров. Последовательности праймеров согласно таблице 6.

Таблица 6 – Праймеры, используемые в реакции циклического секвенирования генов «домашнего хозяйства» сальмонелл

Наименование праймера	Последовательность праймера (5'-3')
thrA-sF	ATCCCGGCCGATCACATGAT
thrA-R1	GTGCGCATACCGTCGCCGAC
purE-sF1	ACAGGAGTTTTAAGACGCATG
purE-sR1	GCAAACCTTGCTTCATAGCG
sucA-sF1	CCGAAGAGAAACGCTGGATC
sucA-sR	GGTTGTTGATAACGATACGTAC
hisD-sF	GTCGGTCTGTATATTCCCGG)
hisD-sR	GGTAATCGCATCCACCAAATC
aroC-sF	GGCGTGACGACCGGCAC
aroC-sR	AGCGCCATATGCGCCAC
hemD-sF	ATTCTGATCACCCGCCCCCTC
hemD-sR	ACGCGACGGTAATCCGGG
dnaN-sF	CCGATTCTCGGTAACCTGCT
dnaN-sR	ACGCGACGGTAATCCGGG

4) *Очистка продуктов реакции циклического секвенирования.*

Очистка продуктов реакции циклического секвенирования проводится методом переосаждения, который включает следующие этапы:

- приготовление осаждающей смеси (50 мкл 96,6% этанола, 2 мкл 3М ацетата натрия, 2 мкл 125 mM ЭДТА);
- внесение в осаждающую смесь 10 мкл полученного продукта реакции циклического секвенирования;
- интенсивное перемешивание содержимое пробирок и инкубация 10 минут при комнатной температуре;
- центрифугирование 15 минут при 13 000 об/мин.;
- плавно удаляется надосадочная жидкость, вносится 70 мкл 70% ледяного этанола; - инкубация 15-20 минут при температуре -20°C;
- центрифугирование 10 минут при 13 000 об/мин.;
- после удаления надосадочной жидкости открытые пробирки инкубируются при 70°C 3-4 минуты;
- после внесения 15 мкл формамида инкубация с закрытой крышкой при 70°C 1 минуту. Также очистка возможна с использованием коммерческих наборов в соответствии с инструкцией производителя.

5) *Секвенирование фрагментов.*

Электрофоретическое разделение продуктов реакции циклического секвенирования и распознавание последовательности ДНК проводится с помощью секвенатора в соответствии с инструкцией к прибору с использованием соответствующего программного обеспечения.

6) *Определение аллелей «генов домашнего хозяйства».* При получении нуклеотидных последовательностей высокого качества прочтения определяются аллели всех 7 генов путем сравнения с референтными последовательностями базы данных PubMLST.

7) *Определение сиквенс-типа.* После установления аллелей каждого из 7 генов для определенного изолята, с использованием базы данных PubMLST (<http://pubmlst.org/>) определяется СТ (аллельный профиль), соответствующий определенной комбинации семи аллелей. В случае отсутствия в базе определенных комбинаций аллелей, подается заявка на депонирование последовательностей ДНК нового СТ с выдачей номера нового СТ. Данные, полученные при МЛСТ-типировании могут анализироваться с помощью алгоритма eBURST (<https://enterobase.warwick.ac.uk/>). Изоляты и СТ сгруппированы в кластеры, называемые eBursGroop (eBg). Для большинства серотипов отмечена выраженная корреляция с генетической группой eBg, присвоенной в ходе кластерного анализа.

Перечень возможных осложнений или ошибок при выполнении и пути их устранения

Проблемы	Возможные причины	Способы устранения
Отсутствие специфических продуктов ПЦР-реакции либо присутствие множественных полос, несоответствующих нужной длине	Дегградация или низкая концентрация ДНК Наличие примесей в образцах	Повторить выделение и очистку ДНК из образцов
Невозможность прочтения сиквенсов на генетическом анализаторе	Смесь из нескольких ПЦР продуктов в реакции секвенирования Недостаточная очистка продуктов реакции секвенирования	Повторить процедуру выделения ПЦР продуктов и реакцию секвенирования Повторить реакцию секвенирования и провести тщательную очистку ее продуктов

Контроль клинической эффективности метода

Не требуется