

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель Министра здравоохранения —
Главный государственный санитарный врач
Республики Беларусь

А.А.Тарасенко

«28» января 2021 г.

Регистрационный № 006-1220

**МЕТОД ГЕНЕТИЧЕСКОГО ТИПИРОВАНИЯ
STAPHYLOCOCCUS SPP.
(инструкция по применению)**

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: учреждение образования
«Белорусский государственный медицинский университет»

АВТОРЫ: канд. мед. наук, доцент Слипень В.В.; канд. мед. наук, доцент
Гудкова Е.И.; канд. мед. наук, доцент Скороход Г.А.

Минск, 2020

НАЗНАЧЕНИЕ И ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

В настоящей инструкции по применению метода генотипирования *Staphylococcus spp.* (далее – инструкция) изложен метод, который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на профилактику стафилококковой инфекции и стафилококкового пищевого отравления. Использование описанного в инструкции метода позволяет определять генетические варианты стафилококков, относящихся к одному виду, оценивать сходство/различие стафилококков, выделяемых из разных источников (от пациентов, внешней среды), что позволит определять источники инфекции, пути и факторы передачи стафилококков, устанавливать или исключать связь между отдельными случаями стафилококковых заболеваний, дифференцировать эпидемические вспышки, обеспечивать мониторинг противоэпидемического режима, отслеживать пути распространения инфекции.

Инструкция предназначена для врачей лабораторной диагностики, иных врачей, оказывающих медицинскую помощь пациентам в стационарах и/или амбулаторных условиях, и/или в условиях отделения дневного пребывания, а также осуществляющих государственный санитарный надзор.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

1. Стафилококковая инфекция (коды по МКБ-10 - A05.0; A41.0; A41.1; A41.2; A49.0);
2. Стафилококковое пищевое отравление (код МКБ A05.0).

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ

Нет.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМЫХ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ, РЕАКТИВОВ

Проведение исследований с помощью метода, изложенного в

инструкции, требует наличия стандартного оборудования и расходных материалов для ПЦР. Для работы необходимы:

1. Стандартные культуры *S.aureus*.
2. Термоциклер для проведения ПЦР в реальном времени.
3. Центрифуга на 14000 об/мин.
4. Шейкер 250 - 3000 об/мин.
5. Весы аналитические с точностью 0,01- 0,1 мг.
6. Твердотельный термостат.
7. Автоклав.
8. Лабораторный пластик: пробирки пластмассовые микроцентрифужные объемом 1,5, 0,6, 0,2 мл, наконечники одноразовые пластиковые объемом 0,5 – 250 мкл, 200 – 1000 мкл с аэрозольным барьером и без него.
9. Ламинарный бокс с бактерицидной лампой.
10. Спирт этиловый 96% и 70%.
11. Автоматические пипетки переменного объема для выделения ДНК и приготовления реакционной смеси, электрофореза (объем дозаторов 0,5 – 10 мкл, 5 – 50 мкл, 20 – 200 мкл, 200 мкл – 1000 мкл).
12. Холодильник на 2–8 °С с морозильной камерой (-20°С).
14. Компьютер с программным обеспечением для регистрации и анализов результатов.
15. Олигонуклеотиды: праймеры и зонды, меченные флюоресцентной меткой (таблица 1), должны быть синтезированы в организациях, лицензированных для их производства, в соответствии с приведенным составом в таблице 1; должны храниться при низкой температуре (-20°С).
16. Набор реагентов для проведения ПЦР: 10хПЦР буфер (750 мМ Трис-НСl (рН 8.8 при 25°С), 200 мМ (NH₄)₂SO₄, 0,1% твин-20), 25 мМ MgCl₂, дНТФ (по 2,5 мМ дАТФ, дТТФ, дСТФ, дГТФ), раствор трегалозы 2,5 М, раствор бетаина 5М.

Таблица 1 – Зонды и праймеры для генетического типирования бактерий рода *Staphylococcus* (из расчета на одну реакцию)

№	Название олигонуклеотида	Кол-во, ОЕ ₂₆₀	Последовательность олигонуклеотидов, очищенных элеткрофорезом в полиакриламидном геле 5' → 3'
1.	ClfA-1	3	GGC TTC AGT GCT TGT AGG
2.	ClfA-2	3	TTT TCA GGG TCA ATA TAA GC

Продолжение таблицы 1

№	Название олигонуклеотида	Кол-во, ОЕ ₂₆₀	Последовательность олигонуклеотидов, очищенных элеткрофорезом в полиакриламидном геле, 5' → 3'
3.	spa-III-F	3	CAAGCACCAAAAGAGGAA
4.	spa-IV-R	3	CACCAGGTTTAACGACAT
5.	spa-1- F	3	CACCTGCTGCAAATGCTGCG
6.	spa-2- R	3	GGCTTGTGTGTCTTCCTC
7.	350-Gp-F	3	CAAATCATCATGCCCCTTATG
8.	350-GP-R	3	AGGAGGTGATCCAACCGCA
9.	383-nuc1	3	CGCTACTAGTTGCTTAGTGTT
10.	383-nuc2	3	CACGTCCATATTTATCAGTTC
11.	383-nuc3	3	CGCTACTAGTTGTTTAGTGTT
12.	527mecA-F	3	GGGATCATAGCGTCATTATTC
13.	527-mecAR	3	AACGATTGTGACACGATAGCC
14.	458-mupA-F	3	TATATTATGCGATGGAAGGTTGG
15.	458-mupB-R	3	AATAAAATCAGCTGGAAAGTGTTG
16.	881-cap 5-F	3	ATGACGATGAGGATAGCG
17.	881-cap 5-R	3	CTCGGATAACACCTGTTGC
18.	1148-cap 8 F	3	ATGACGATGAGGATAGCG
19.	1148-cap 8 R	3	CACCTAACATAAGGCAAG
20.	Pan-agr	3	ATG CAC ATG GTG CAC ATG C
21.	441- agr1	3	GTC ACA AGT ACT ATA AGC TGC GAT
22.	575-agr2	3	TAT TAC TAA TTG AAA AGT GGC CAT AGC
23.	323-agr3	3	GTA ATG TAA TAG CTT GTA TAA TAA TAC CCA G
24.	659-agr4	3	CGA TAA TGC CGT AAT ACC CG
25.	127- sea F	3	5'-CCTTTGGAAACGGTTAAAACG-3'
26.	127-sea R	3	5'-TCTGAACCTTCCCATCAAAAAC-3'
27.	477-seb F	3	5'-TCGCATCAAACGACAAACG-3'
28.	477- seb-R	3	5'-GCAGGTACTCTATAAGTGCCTGC-3'

29.	269-LUKDE-1	3	TGAAAAAGGTTCAAAGTTGATACGAG
30.	269-LUKDE-2	3	TGTATTTCGATAGCAAAAGCAGTGCA
31.	780-LUKM-1	3	TGGATGTTACCTATGCAACCTAC
32.	780-LUKM-2	3	GTTCGTTTCCATATAATGAATCACTAC
33.	209-HLA-1	3	CTGATTACTATCCAAGAAATTCGATTG
34.	209-HLA-2	3	CTTCCAGCCTACTTTTTTATCAGT
35.	309-HLB-1	3	GTGCACTTACTGACAATAGTGC
36.	309-HLB-2-2	3	GTTGATGAGTAGCTACCTTCAGT
37.	535-mpHLG-1	3	GTCA YAGAGTCCATAATGCATTTAA
38.	535-mpHLG-2	3	CACCAAATGTATAGCCTAAAGTG
39.	180-TSST-1	3	TTCACTATTTGTAAAAGTGT CAGACCCACT
№	Название олигонуклеотида	Кол-во, ОЕ260	Последовательность олигонуклеотидов, очищенных элеткрофорезом в полиакриламидном геле, 5' → 3'
40.	180-TSST-2	3	TACTAATGAATTTTTTTATCGTAAGCCCTT
41.	190-ermA 1	3	AAG CGG TAA ACC CCT CTG A
42.	190-ermA 2	3	TTC GCA AAT CCC TTC TCA AC
43.	299-ermC 1	3	AAT CGT CAA TTC CTG CAT GT
44.	299-ermC 2	3	TAA TCG TGG AAT ACG GGT TTG
45.	360-tetK 1	3	GTA GCG ACA ATA GGT AAT AGT
46.	360-tetK 2	3	GTA GTG ACA ATA AAC CTC CTA
47.	491aac(60)-F	3	GAAGTACGCAGAAGAGA
48.	491aac(60)-R	3	ACATGGCAAGCTCTAGGA
49.	242-aph(30)	3	AAATACCGCTGCGTA
50.	242-aph(30)	3	CATACTCTTCCGAGCAA
51.	606-dfrD-Fw	3	CCCTGCTATTAAAGCACC
52.	606-dfrD-Rv	3	CATGACCAGATAACTC
53.	405-dfrG Fw	3	TGCTGCGATGGATAAGAA
54.	405-dfrG-Rv	3	TGGGCAAATACCTCATTCC
55.	229-dfrK dfrK-Fw	3	CAAGAGATAAGGGGTTCAGC
56.	229-dfrK-Rv	3	ACAGATACTTCGTTCCACTC

17. Реагенты для выделения ДНК (степень чистоты – для молекулярной биологии): 5% и 10% Chelex-100, 3М ацетат натрия, 0,2% твин-20, ТЕ-буфер (50х, 100х).

18. Стандартные наборы для выделения геномной ДНК.

19. Одноразовые перчатки без талька.

20. Питательные среды для получения чистых культур стафилококка.

ТЕХНОЛОГИЯ ВЫПОЛНЕНИЯ МЕТОДА

Этапы метода

1 этап. Выделение ДНК бактерий рода *Staphylococcus* из биологического материала или из чистых культур.

2 этап. Постановка ПЦР для определения генетических различий бактерий рода *Staphylococcus*.

3 этап. Анализ результатов: определение генетических внутривидовых вариантов с целью установления сходства/различия стафилококков, выделенных из различных источников или из одного, но в разное время.

I. ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК ИЗ КУЛЬТУР *STAPHYLOCOCCUS SPP.*

На первом этапе проводят выделение ДНК из чистых культур стафилококков. Используют стерильную одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники), которые после применения помещают в контейнер с дезинфицирующим раствором на 1 час для обезвреживания.

Материал для исследования: чистые культуры стафилококков.

1.1. Выделение ДНК из бактериальной суспензии:

ДНК из бактериальной суспензии выделяют:

1.1.1. С использованием стандартного метода лизиса/сорбции/отмывания и коммерческих наборов для выделения геномной ДНК. Выделение осуществлять в соответствии с инструкциями по применению наборов.

1.1.2. С использованием метода молекулярных колоний–ПЦР.

Исследуемые штаммы *Staphylococcus spp.* засевают для получения отдельных колоний на чашках с желточно-солевым агаром (мясо-пептонным агаром). Чашки инкубируют в термостате при 37°C в течение 18-20 часов.

С помощью стерильной 1-мкл петли 2-3 одинаковые колонии (1/2 петли) переносят в 0,5-мл центрифужную пробирку с 150 мкл 5% Chelex-100 в 1хТАЕ буфере (либо в 150 мкл 1хТАЕ буфера) и суспендируют с помощью шейкера.

Пробирки инкубируют на водяной бане в течение 10 мин (либо в твердотельном термостате в течение 10 мин при 95°C), клеточный дебрис осаждают ультрацентрифугированием при 15000 об/мин – 10 мин.

Супернатант в объеме 40 мкл переносят в чистые микроцентрифужные пробирки. До проведения дальнейших исследований экстрагированную ДНК хранят при +4±2 °C не более 12 – 24 часов, либо месяца при минус 20°C. Для ПЦР используют 5 – 10 мкл супернатанта.

II. ПОСТАНОВКА ПЦР ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ РАЗЛИЧИЙ БАКТЕРИЙ РОДА *STAPHYLOCOCCUS*

Подвидовые генетические различия стафилококков могут быть связаны с присутствием/отсутствием детерминант вирулентности, устойчивости к противомикробным агентам, генетических кассет, включая SCCmec, несущую детерминанту устойчивости к метициллину и др. Для детекции этих различий проводят ПЦР с использованием специфических праймеров, после чего детекцию ампликонов проводят методом горизонтального электрофореза в агарозном геле.

2.1. Приготовление ПЦР-реакционной смеси

Для выявления генов вирулентности, устойчивости к противомикробным лекарственным средствам, а также вариантоспецифических генетических локусов методом ПЦР готовят реакционную смесь, состав которой приведён в таблице 2. Исследуемую экстрагированную ДНК в количестве 5-10 мкл вносят в 40 - 45 мкл ПЦР смеси.

2.2. Амплификация

2.3. Детекция продуктов амплификации

Детекцию продуктов амплификации проводят методом электрофореза в 1,5 % агарозном геле. Продукты амплификации объемом 10-15 мкл совместно с 2 мкл загрузочного красителя вносят в агарозный гель с этидием бромидом (0,5 мкг/мл). Параметры электрофореза 200 В, 100 мА, 1 час, либо

140В, 70 мА, 1,5 часа. В качестве маркеров размера ДНК используют ДНК лестницы – 50 п.о. либо 100 п.о. ДНК-лестницу загружают в одну из лунок в каждом ряду электрофоретического геля.

Таблица 2 – Состав реакционной смеси для моно-ПЦР

Реагент	Объем, мкл	Концентрация
Экстрагированная ДНК	10 (или 5 мкл)	-
10 x реакционный Taq буфер	5	1x
Праймер прямой (или несколько прямых праймеров) ¹	по 20 пкМ/реакцию	
Праймер обратный (или несколько обратных праймеров) ¹	по 20 пкМ/реакцию	
Раствор 10 x dNTP (200 мкМ каждый: dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	5	1x
MgCl ₂ (25 мМ)	3	1,5 мМ
Taq полимеразы (5 ед/мкл)	0,25	1,25 ед
Свободная от нуклеазы деионизованная вода	Add 50 мкл	

¹– последовательности нуклеотидов в используемых праймерах приведены в таблице 1

2.4. Типирование *Staphylococcus spp.* по генам *agr*

Стафилококки могут отличаться структурой локуса *agr* – дополнительного регулятора вирулентности.

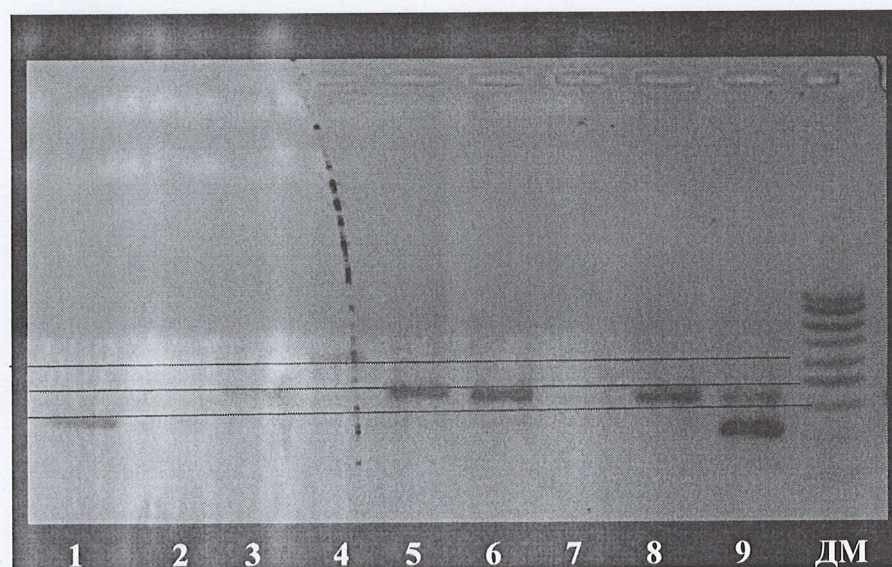
В стерильные пробирки типа эппендорф (объемом 0,5 мл) вносят по 5-10 мкл экстракта ДНК и 45- 40 мкл реакционной смеси, которая должна содержать ингредиенты таблицы 2 и праймеры, указанные в таблице 3, по 20 пкмоль каждого. Конечный объем ПЦР-смеси для проведения индивидуальных реакций амплификации составляет 50 мкл с учетом добавления матричной ДНК. Во время внесения экстракта ДНК осуществляют перемешивание ДНК и ПЦР-смеси пипетированием.

Реакционные смеси амплифицируют с использованием следующего режима: 95 °С – 10 мин; 20 циклов (95°С – 50 с; 60°С – 1 мин; 72°С – 1 мин), 20 циклов (95°С – 50 с; 55°С – 1 мин; 72°С – 1 мин); 72°С – 7 минут, 4°С →∞.

Таблица 3 – Состав праймеров для типирования по локусу *agr* с использованием мультипраймерной ПЦР и интерпретация результатов

П.п.	Название праймера	Состав	Размер ампликона, п.о.	Интерпретация
1.	Pan-agr	ATG CAC ATG GTG CAC ATG C	-	-
2.	441-agr1	GTC ACA AGT ACT ATA AGC TGC GAT	441	Тип 1
3.	575-agr2	TAT TAC TAA TTG AAA AGT GGC CAT AGC	575	Тип 2
4.	323-agr3	GTA ATG TAA TAGCTTGATAATAATACCCAG	323	Тип 3
5.	659-agr4	CGA TAA TGC CGT AAT ACC CG	659	Тип 4

В ходе электрофореза устанавливают размер ампликона (пример на рисунке 1), в зависимости от которого изолят *Staphylococcus spp.* относят к одному из *agr*-типов – тип 1, 2, 3, 4.



Трек 1, 2 – *agr* тип 3, трек 3, 5, 6, 8, 9 – *agr* тип 2, трек 4 – *agr* тип 4

Рисунок 1 – Результат определения типа локуса AGR (accessory gene regulatory) – системы регуляции вирулентности.

2.5. Типирование *Staphylococcus spp.* по генам, кодирующим факторы патогенности

Стафилококки могут отличаться друг от друга присутствием/отсутствием генов, кодирующих факторы вирулентности.

Для выявления генетических различий *Staphylococcus spp.* могут быть изучены детерминанты продукции токсинов *sea* и *seb* – эксфолиативного токсина А и В, лейкоцидинов – LUKDE, LUKM, гемолизинов α , β , γ – HLA, HLB, HLG, токсина синдрома токсического шока - TSST, фактора слипания – ClfA, капсульных антигенов 5 и 8 типов - *cap 5*, *cap 8*.

В стерильные пробирки типа эппендорф (объемом 0,5 мл) вносят по 5-10 мкл экстракта ДНК и 45- 40 мкл реакционной смеси, которая должна содержать ингредиенты таблицы 2 и праймеры, указанные в одной из таблиц 4-8, в количестве 20 пкмоль каждого. Конечный объем ПЦР-смеси для проведения индивидуальных реакций амплификации составляет 50 мкл с учетом добавления матричной ДНК. Во время внесения экстракта ДНК осуществляют перемешивание ДНК и ПЦР-смеси пипетированием.

Реакционные смеси амплифицируют в ПЦР-приборе с использованием следующего режима: 95 °С – 10 мин; 20 циклов (95°С – 50 с; 60 °С – 1 мин; 72°С – 1 мин), 20 циклов 20 циклов (95°С – 50 с; 55°С – 1 мин; 72°С – 1 мин), 72°С – 7 минут, 4°С → ∞.

Таблица 4 - Состав праймеров для типирования по генам продукции энтеротоксина А (*sea*) и В (*seb*) и интерпретация результатов

№	Название олигонуклеотида	Размер ампликона, п.о.	Последовательность олигонуклеотидов, очищенных элеткрофорезом в полиакриламидном геле 5' → 3'
1.	127- <i>sea</i> F	127	5'-CCTTTGGAAACGGTTAAAACG-3'
2.	127- <i>sea</i> R		5'-TCTGAACCTTCCCATCAAAAAC-3'
3.	477- <i>seb</i> F	477	5'-TCGCATCAAACCTGACAAACG-3'
4.	477- <i>seb</i> -R		5'-GCAGGTACTCTATAAGTGCCTGC-3'

В случае наличия детерминант продукции энтеротоксина А образуются ампликоны размером 127 п.о., в случае образования энтеротоксина В – 477 п.о.

Таблица 5 - Состав праймеров для типирования по генам продукции лейкоцидинов D-E (LUKDE) и M (LUKM)

№	Название олигонуклеотида	Размер ампликона, п.о.	Последовательность олигонуклеотидов, очищенных элеткрофорезом в полиакриламидном геле, 5' → 3'
1.	269-LUKDE-1	269	TGAAAAAGGTTCAAAGTTGATACGAG
2.	269-LUKDE-2		TGTATTCGATAGCAAAAGCAGTGCA
3.	780-LUKM-1	780	TGGATGTTACCTATGCAACCTAC
4.	780-LUKM-2		GTTCGTTTCCATATAATGAATCACTAC

В случае наличия детерминант продукции лейкоцидина Е образуются ампликоны размером 269 п.о., в случае образования лейкоцидина М – 780 п.о.

Таблица 6 – Состав праймеров для типирования по генам продукции гемолизинов α, β, γ и интерпретация результатов

№	Название олигонуклеотида	Размер ампликона, п.о.	Последовательность олигонуклеотидов, очищенных элеткрофорезом в полиакриламидном геле, 5' → 3'
1.	209-с-1	209	CTGATTACTATCCAAGAAATTTCGATTG
2.	209-HLA-2		CTTCCAGCCTACTTTTTTATCAGT
3.	309-HLB-1	309	GTGCACTTACTGACAATAGTGC
4.	309-HLB-2-2		GTTGATGAGTAGCTACCTTCAGT
5.	535-mpHLG-2	535	CACCAAATGTATAGCCTAAAGTG
6.	535-mpHLG-1		GTCA YAGAGTCCATAATGCATT TAA

В случае наличия детерминант продукции гемолизинов α, β, γ (HLA, HLB, mpHLG) образуются ампликоны размером 209, 309 и 535 п.о.

Таблица 7 - Состав праймеров для типирования по генам продукции фактора слипания (clf-A) и токсина синдрома токсического шока (TSST)

№	Название олигонуклеотида	Размер ампликона, п.о.	Последовательность олигонуклеотидов, очищенных элеткрофорезом в полиакриламидном геле, 5' → 3'
1.	1042-ClfA-1	3	GGC TTC AGT GCT TGT AGG
2.	1042-ClfA-2		TTT TCA GGG TCA ATA TAA GC
3.	180-TSST-1	180	TTCACTATTTGTAAAAGTGTGTCAGACCCACT
4.	180-TSST-2		TACTAATGAATTTTTTTTATCGTAAGCCCTT

В случае наличия детерминант продукции фактора слипания (clf-A) образуются ампликоны размером 1042 п.о., в случае образования токсина синдрома токсического шока - 180 п.о.

Таблица 8 - Состав праймеров для типирования по генам капсульных антигенов 5 и 8 типов - сар 5, сар 8

№	Название олигонуклеотида	Размер ампликона, п.о.	Последовательность олигонуклеотидов, очищенных элеткрофорезом в полиакриламидном геле, 5' → 3'
1.	881-сар 5-F	881	ATGACGATGAGGATAGCG
2.	881-сар 5-R		CTCGGATAACACCTGTTGC
3.	1148-сар 8 F	1148	ATGACGATGAGGATAGCG
4.	1148-сар 8 R		CACCTAACATAAGGCAAG

В случае наличия детерминант продукции капсулы 5 антигенного типа (сар5) образуются ампликоны размером 881 п.о., 8 антигенного типа – 1148 п.о.

2.6. Типирование *Staphylococcus spp.* по генам, обуславливающих устойчивость к антибиотикам

2.6.1. Типирование *Staphylococcus spp.* по генам устойчивости к метициллину, мупироцину

Метод мультипраймерной ПЦР позволяет одновременно осуществлять идентификацию: мес А гена (устойчивость к метициллину и всем бета-

лактамным антибиотикам (исключая цефалоспорины пятого поколения)) – по размеру образуемых ампликонов 527 п.о., *mup* А гена (устойчивость к мупироцину) – по размеру образуемых ампликонов 458 п.о., *nuc* (ген, кодирующий нуклеазу, специфичную *S. aureus*) – по размеру образуемых ампликонов 383 п.о., *gr* (фрагмент 16S рРНК грамположительных микроорганизмов) – по размеру образуемых ампликонов 350 п.о.

В стерильные пробирки типа эппендорф (объемом 0,5 мл) вносят по 5-10 мкл экстракта ДНК и 40-45 мкл реакционной смеси, которая должна содержать ингредиенты таблицы 2 и праймеры, указанные в таблице 9, по 20 пкмоль каждого. Конечный объем ПЦР-смеси для проведения индивидуальных реакций амплификации составляет 50 мкл с учетом добавления матричной ДНК. Во время внесения экстракта ДНК осуществляют перемешивание ДНК и ПЦР-смеси пипетированием.

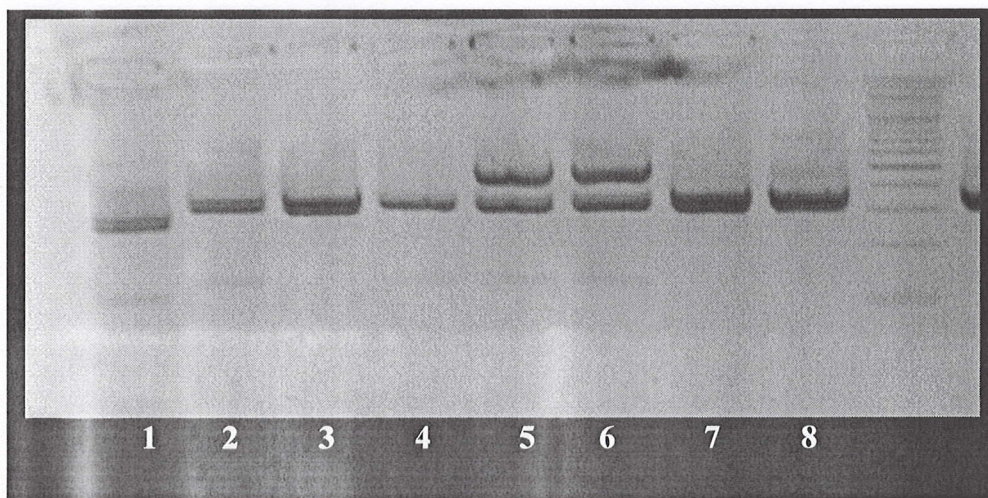
Таблица 9 - Состав праймеров для мультипраймерной ПЦР

Ген	Признак	Размер, п.о.	Ген	Праймер
gr	Специфичен для <i>Staphylococcus spp.</i>	350	pA	5' caa atc atc atg ccc ctt atg 3'
			pH	5' agg agg tga tcc aac cgc a 3'
nuc	Ген, кодирующий нуклеазу <i>S. aureus</i>	383	nuc 1	5' cgc tac tag ttg ctt agt gtt 3'
			nuc 2	5' cac gtc cat att tat cag ttc 3'
			nuc 3	5' cgc tac tag ttg ttt agt gtt 3'
mecA	Ген устойчивости к метициллину	527	mecA1	5' ggg atc ata gcg tca tta ttc 3'
			mecA2	5' aac gat tgt gac acg ata gcc 3'
mup	Ген устойчивости к мупироцину	458	mupA	5' tat att atg cga tgg aag gtt gg 3'
			mupB	5' aat aaa atc agc tgg aaa gtg ttg 3'

Реакционные смеси амплифицируют с использованием следующего режима: 95 °С – 10 мин; 40 циклов (95°С – 1 минута; 56 °С – 1 минута; 72°С – 1 минута); 72°С – 7 минут, 4°С → ∞.

Наличие продуктов амплификации ДНК выявляют электрофорезом в 1% агарозном геле с этидием бромидом (0.5 мкг/мл).

Пример получаемых результатов приведен на рисунке 2.



(трек 3- 7); 350 п.о. - принадлежность к *Staphylococcus spp.* (трек 1,2)

Рисунок 2 - Продукты амплификации 527 п.о., 383 п.о., 350 п.о.

подтверждают принадлежность к метициллин-резистентному стафилококку (трек 5, 6); 383 п.о., 350 п.о. – принадлежность к *S. aureus*, 350 п.о. – к другим видам стафилококков

2.6.2. Типирование *Staphylococcus spp.* по генам устойчивости к макролидам, тетрациклинам, аминогликозидам и триметоприму.

Для выявления генетических различий *Staphylococcus spp.* могут быть изучены детерминанты устойчивости к антибиотикам – эритромицину (*ermA* и *ermC*), тетрациклинам (*tetK*), аминогликозидам (*aac(6')*, *aph(3')*, триметоприму (*dfrD*, *dfrK*, *dfrM*).

В стерильные пробирки типа эппендорф (объемом 0,5 мл) вносят по 5-10 мкл экстракта ДНК и 40-45 мкл реакционной смеси, которая должна содержать ингредиенты таблицы 2 и праймеры, указанные в одной из таблиц 10–13, в количестве 20 пкмоль каждого. Конечный объем ПЦР-смеси для проведения индивидуальных реакций амплификации составляет 50 мкл с учетом добавления матричной ДНК. Во время внесения экстракта ДНК осуществляют перемешивание ДНК и ПЦР-смеси пипетированием.

Реакционные смеси амплифицируют с использованием следующего режима: 95 °С – 10 мин; 20 циклов (95°С – 50 с; 60 °С – 1 мин; 72°С – 1 мин), 20 циклов (95°С – 50 с; 55°С – 1 мин; 72°С – 1 мин); 72°С – 7 минут, 4°С → ∞.

Таблица 10 – Состав праймеров для типирования по генам устойчивости к эритромицину *ermA* и *ermC*, и интерпретация результатов

№	Название олигонуклеотида	Размер ампликона	Последовательность олигонуклеотидов, очищенных элеткрофорезом в полиакриламидном геле, 5' → 3'
5.	190- <i>ermA</i> 1	190	AAG CGG TAA ACC CCT CTG A
6.	190- <i>ermA</i> 2		TTC GCA AAT CCC TTC TCA AC
7.	299- <i>ermC</i> 1	299	AAT CGT CAA TTC CTG CAT GT
8.	299- <i>ermC</i> 2		TAA TCG TGG AAT ACG GGT TTG

В случае наличия детерминант устойчивости к эритромицину *ermA* и *ermC* образуются ампликоны размером 190 и 299 п.о. соответственно.

Таблица 11 – Состав праймеров для типирования по гену устойчивости к тетрациклинам *tetK*

№	Название олигонуклеотида	Размер ампликона	Последовательность олигонуклеотидов, очищенных элеткрофорезом в полиакриламидном геле, 5' → 3'
9.	360- <i>tetK</i> 1	3	GTA GCG ACA ATA GGT AAT AGT
10.	360- <i>tetK</i> 2	3	GTA GTG ACA ATA AAC CTC СТА

В случае наличия детерминант устойчивости к тетрациклинам (*tetK*) образуется ампликон размером 360 п.о.

Таблица 12 – Состав праймеров для типирования по генам устойчивости к аминогликозидам *aac(6')*, *aph(3')*, и интерпретация результатов

№	Название олигонуклеотида	Размер ампликона	Последовательность олигонуклеотидов, очищенных элеткрофорезом в полиакриламидном геле, 5' → 3'
	491 <i>aac(6')</i> -F	491	GAAGTACGCAGAAGAGA
	491 <i>aac(6')</i> -R		ACATGGCAAGCTCTAGGA
	242- <i>aph(3')</i>	242	AAATACCGCTGCGTA
	242- <i>aph(3')</i>		CATACTCTCCGAGCAA

В случае наличия детерминант устойчивости к аминогликозидам *aac(6')*, *aph(3')* образуются ампликоны размером 491 и 242 п.о. соответственно.

Таблица 13 – Состав праймеров для типирования по генам устойчивости к триметоприму dfrD, dfrK, dfrM

№	Название олигонуклеотида	Размер ампликона	Последовательность олигонуклеотидов, очищенных элеткрофорезом в полиакриламидном геле, 5' → 3'
	606-dfrD-Fw	3	CCCTGCTATTAAAGCACC
	606-dfrD-Rv	3	CATGACCAGATAACTC
	405-dfrG Fw	3	TGCTGCGATGGATAAGAA
	405-dfrG-Rv	3	TGGGCAAATACCTCATTC
	229-dfrK Fw	3	CAAGAGATAAGGGGTTCAGC
	229-dfrK-Rv	3	ACAGATACTTCGTTCCACTC

В случае наличия детерминант устойчивости к триметоприму dfrD, dfrK, dfrM образуются ампликоны размером 606, 405, 229 п.о.

III. АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ВНУТРИВИДОВОГО ТИПИРОВАНИЯ ВАРИАНТОВ *STAPHYLOCOCCUS SPP.*

Для оценки идентичности изолятов *Staphylococcus spp.* проводят сравнение штаммов по спектру выявленных и не выявленных генов, кодирующих факторы патогенности и устойчивости к антибиотикам, после чего делают заключение об идентичности изолятов стафилококков.

Изоляты стафилококков, относящихся к одному виду, идентичны в случае выполнения двух критериев:

- а) идентичности набора генетических детерминант, кодирующих факторы патогенности;
- б) идентичности набора генетических детерминант устойчивости к антибиотикам.

Изоляты стафилококков одного вида не идентичны в случае выполнения одного из критериев:

- а) различаются набором генетических детерминант, кодирующих факторы патогенности (хотя бы одним ген отсутствует/присутствует);

б) различаются набором генетических детерминант устойчивости к антибиотикам (хотя бы одним ген отсутствует/присутствует);

ВОЗМОЖНЫЕ ОШИБКИ В ПРОЦЕССЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

При проведении электрофореза в агарозном геле может отсутствовать ДНК.

Отсутствие ДНК в ходе выделения из чистых культур *стафилококков*, выявляемое в процессе постановки горизонтального электрофореза в агарозном геле, свидетельствует о нарушении техники выделения ДНК, либо неправильном приготовлении реакционной смеси. Необходимо повторно выделить ДНК, соблюдая все стадии описанной процедуры выделения, контролировать процедуру приготовления реакционных смесей. Отсутствие фрагментов ДНК при проведении электрофореза также может быть связано с отсутствием этидия бромида в составе приготовленного агарозного геля. В таком случае в процессе просматривания геля в трансиллюминаторе также не видны фрагменты стандартного маркера молекулярного веса ДНК. Для устранения этой проблемы необходимо дополнительно прокрасить гель в растворе этидия бромида (гель погружают в 1x TAE буфер (либо 1x TBE) с 0,5 мкг/мл этидия бромида на 60 минут).

УКАЗАНИЕ МЕР БЕЗОПАСНОСТИ

В процессе работы в молекулярно-биологической лаборатории необходимо помнить о технике безопасности работы с этидием бромида, УФ-светом, инфекционным материалом.

Этидия бромид. Канцерогенное соединение, связывающее ДНК и вызывающее мутации в ней. Необходимо соблюдать меры безопасности: 1) работать в перчатках; 2) при попадании на кожу или слизистые тщательно

промыть соответствующий участок водой; 3) реагенты, содержащие этидия бромид, перед утилизацией подвергать специальной обработке. Отработанные гели и буфер с этидием бромида из камеры помещают в пластиковую емкость на 5 литров с плотно закручивающейся крышкой. Добавляют 1 объем 0,5 М раствора калия перманганата и затем 1 объем 2,5 М соляной кислоты. Аккуратно перемешивают и оставляют при комнатной температуре на 4-6 часов. Добавляют 1 объем 2,5 М натрия гидроксида, аккуратно перемешивают. Сбрасывают нейтрализованные реактивы в канализацию.

УФ-свет. При работе с включенным трансиллюминатором пользуются защитным экраном или специальной защитной маской, так как ультрафиолетовый свет вызывает ожоги лица и слизистой глаз. Необходимо помнить, что УФ-свет вызывает мутации и разрушение исследуемой ДНК, поэтому длительная экспозиция ПЦР-продуктов в УФ-свете приводит к снижению интенсивности свечения. Если ПЦР-продукты подвергаются дальнейшим исследованиям (секвенированию, рестрикции, мутагенезу, клонированию) необходимо ограничить длительность УФ-облучения.

Инфекционный материал. Обезвреживание биоматериалов и реагентов проводят для каждой стадии отдельно, помещая одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники), колбы-ловушки вакуумных отсосов на 20-24 ч в специальные контейнеры, содержащие дезинфицирующий 10 % раствор хлорной извести или 5 % раствор хлорамина Б.