

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от _____ 20 г. № _____

ИНСТРУКЦИЯ
ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ
СПЕЦИФИЧЕСКИХ УЧАСТКОВ ДНК ЭНТЕРОГЕМОМОРРАГИЧЕСКИХ
***ESCHERICHIA COLI O157* МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ**
«ТЭК-О157»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор предназначен для выявления специфических участков ДНК энтерогеморрагических *Escherichia coli* в бактериальных культурах и клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с электрофоретической детекцией продуктов амплификации в агарозном геле.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

Набор содержит компоненты, необходимые для проведения ПЦР, в результате которой происходит амплификация фрагментов генов интимина (*eaeA*), шига-токсина 1 (*stxI*), шига-токсина 2 (*stx2*), гена *rfb*, контролирующего синтез первичных боковых цепей ЛПС (определяют серогруппу O157). Получаемая в результате ПЦР комбинация из этих фрагментов позволяет выявлять и дифференцировать различные токсин-продуцирующие штаммы энтерогеморрагических *E. coli*.

В качестве внутреннего контроля используется дополнительная пара праймеров на консервативную область гена *16S rRNA*. Это позволяет учесть возможное ингибирование реакции и исключить ложно-отрицательный результат.

2.1. Аналитические и диагностические характеристики набора

Чувствительность – не менее 99% :тест-система должна выявлять в ПЦР *E.coli* серотипа O157, обладающие генами *eae*, *stxI*, *stxII*, *rfb* в концентрации не менее 5×10^4 м.к./мл.

Специфичность – не менее 95%: смесь – Мульти O157 должна обеспечивать специфическую амплификацию фрагментов ДНК размером 1250, 690, 480, 400, 330 п.н. Тест-система не должна давать положительных результатов с ДНК *E. coli* других серотипов.

2.2. Принцип действия

В основе метода лежит полимеразная цепная реакция с использованием специфических олигонуклеотидных праймеров. Детекция продуктов амплификации осуществляется электрофорезом в агарозном геле.

2.3. Состав набора (на 100 реакций)

- ПЦР-буфер	- 2 пробирки по 1,2 мл
-Taq-POL (Taq I –полимераза)	- 40 мкл
- смесь Мульти O157	- 500 мкл
- dNTP (смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов)	- 50 мкл
- dH ₂ O (деионизованная вода)	- 400 мкл
- мин. масло (минеральное масло)	- 2,0 мл
- O157+ (положительный контроль)	- 100 мкл

3. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- ПЦР-бокс или отдельный стол снабженный УФ-лампой
- Твердотельный термостат или водяная баня
- Два набора автоматических пипеток переменного объема
- Одноразовые наконечники для автоматических пипеток
- Пробирки для микропроб объемом 1,5 мл
- Пробирки для ПЦР на 0,5 мл или 0,2 мл
- Вортекс-центрифуга

- Центрифуга настольная
- Термоциклер
- Охладитель проб
- Электрофорезная камера
- Источник УФ
- Весы лабораторные 2 класса точности
- Холодильник бытовой с морозильной камерой
- Отдельный халат и одноразовые перчатки
- Вода дистиллированная
- Набор для выделения ДНК (см.п.4.1.1)
- Мертиолят натрия для обеззараживания проб
- Реагенты для электрофореза (см.п.4.3)

4 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

4.1. Приготовление образцов для анализа в ПЦР. Бактериальные клетки суспендировать в 100 мкл стерильной дистиллированной воды до концентрации 10^7 - 10^9 кл/мл в пробирках 1,5 мл типа «Эппендорф». Центрифугировать 5 минут при 2000-3000 g (4000-6000 об/мин.).

Подготовка проб биологического материала и обеззараживание проводится в соответствии с МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

К исследуемым образцам добавляют мертиолят натрия, проверенный на бактерицидное действие, до конечной концентрации 1:10000 (0,01 %) с последующим прогреванием их при 56 °С в течение 30 мин. Затем к 100 мкл образцов, обработанных мертиолятом натрия и разлитых в микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл добавляют лизирующий буфер на основе 6М гуанидинизотиоцината в объеме, указанном в инструкции к набору для выделения ДНК, и инкубируют 15 мин при температуре 65 °С. После выполнения данного этапа материал считается обеззараженным.

4.1.1. Выделение ДНК

Для приготовления образцов из клинического материала использовать коммерческие наборы для выделения ДНК из клинического материала, например, «ДНК-сорб-В» (ООО «ИнтерЛабСервис», Москва), «ДНК-экспресс» (НПФ «Литех», Москва), следуя указаниям инструкции изготовителя.

4.2 Проведение ПЦР

1. Перед проведением ПЦР-анализа внести в одну или обе (в зависимости от объема исследования) пробирки «ПЦР-буфер» по 20 мкл фермента TaqI-полимеразы из пробирки «Taq-POL». Полученной смеси «ПЦР-буфер+» в каждой пробирке достаточно для проведения ПЦР-анализа 50 образцов. Смесь ПЦР-буфера с TaqI-полимеразой «ПЦР-буфер+» можно хранить при температуре + 4 °С не более 6 мес. Отдельные компоненты «ПЦР-буфер» и «Taq-POL» можно хранить при минус 20 °С в течение 1 года.

2. Перенести содержимое пробирки «dNTP» в пробирку «смесь Мульти O157» . Полученную смесь «Мульти O157 с dNTP», рассчитанную на 100 реакций, можно хранить при температуре + 4 °С в течение 6 мес.

3. Включить охладитель проб (для охлаждения штативов с пробирками можно использовать ледяные блоки).

4. В охлажденный штатив расставить ряд пробирок для ПЦР (0,5 мл). Количество пробирок должно соответствовать количеству анализируемых образцов с учетом двух дополнительных пробирок, предназначенных для отрицательного и положительного контролей.

5. Внести на дно каждой пробирки по 20 мкл смеси «ПЦР-буфер+» (ПЦР-буфер с Taq I – полимеразой, п.1).

6. Добавить во все пробирки по 5 мкл раствора «смесь Мульти O157 с dNTP» (п.2).

7. Добавить во все пробирки по одной капле (~20 мкл) минерального масла. Если используется термоциклер с подогреваемой крышкой, то минеральное масло не добавлять.

8. В пробирку для отрицательного контроля внести 5 мкл деионизированной воды - «dH₂O».

9. В пробирки для исследуемых образцов внести по 5 мкл лизатов клеток или 5 мкл образцов, выделенных из клинических проб.

10. В пробирку для положительного контроля внести 5 мкл раствора «O157+»

11. Все пробирки встряхнуть на вортексе, жидкость осадить на дно пробирок кратковременным откручиванием на вортекс-центрифуге. Пробирки поместить в блок термоциклера после прогрева прибора в режиме паузы при 95°C (режим горячего старта).

12. Провести реакцию амплификации по программе: 1-й цикл: 95°C - 5 мин, 58°C - 1 мин, 73°C - 1 мин; далее 30-40 циклов: 94°C – 30 сек, 60°C – 30 сек, 72°C – 30 сек; в конце: 1 цикл: 72°C - 3 мин, 10°C – охлаждение (хранение). При тестировании лизатов клеток достаточно 30 циклов реакции.

13. После окончания реакции амплификации пробирки отправить в комнату для анализа продуктов ПЦР. Пробы после амплификации можно хранить в течение нескольких дней при 4-8 °С и несколько месяцев при минус 20 °С.

4.3 Анализ продуктов ПЦР

4.3.1 Приготовление агарозных гелей для электрофореза

Трис-боратный буфер (ТБЕ) для электрофореза: готовится концентрированный (пятикратный) буфер 5×ТБЕ (54 г Трис-осн., 27 г борной кислоты, 20 мл 0,5 М ЭДТА, рН 8,0 растворяется в 1 л дистиллированной воды), который разводится перед проведением анализа (к 200,0 мл 5×ТБЕ добавить 800,0 мл дистиллированной воды). Буфер для нанесения образцов (десятикратный): 0,025 г бромфенолового синего; 4 мл глицерина; 5 мл 0,5 М ЭДТА, рН 8,0; довести до 10 мл дистиллированной водой.

Раствор 1,5 % агарозы: взвесить 1,5 г агарозы, растворить в 100 мл ТБЕ буфера, поставить в кипящую водяную баню и выдержать 30 минут до полного растворения агарозы. Для приготовления агарозы можно использовать СВЧ-печь. Раствор охладить до 45-50 °С и залить необходимый гель (длина рабочей зоны геля должна быть не менее 8 см). Агарозные гели можно приготовить за время проведения реакции ПЦР.

4.3.2 Электрофорез в агарозном геле

Детекция продуктов амплификации осуществляется электрофорезом в агарозном геле.

15-20 мкл реакционной смеси (ПЦР-продукт) из каждой пробирки смешать с 2 мкл буфера для нанесения образцов, внести в лунки агарозного геля и провести электрофорез при 10 в/см в течение 30-60 минут, бромфеноловый краситель должен пройти до нижней границы геля. Гель окрасить в водном растворе бромистого этидия (5 мкг/мл) в течение 30 минут, с последующей 20 минутной отмывкой в дистиллированной воде.

Внимание! Бромид этидия – канцерогенное соединение; работать только в перчатках, избегать попадания на кожу и слизистые, при попадании на кожу или слизистые тщательно промыть соответствующий участок водой.

Документация результатов проводится визуально при просмотре геля на УФ-трансиллюминаторе с длиной волны 254-360 нм и фотографировании гелей с использованием оранжевого светофильтра.

5 УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результат ПЦР-анализа учитывается по наличию или отсутствию на электрофореграмме специфических красно-оранжевых флюоресцирующих полос амплифицированной ДНК..

Положительный контрольный образец ДНК. Сигнал от положительного контроля виден как пять фрагментов следующих размеров: 1250 п.н. (ген *16S rRNA*), 690 п.н. - (*eae*-ген), 480 п.н. - (*stxII*-ген), 400 п.н. - (*rfb*-ген), 330 п.н. - (*stxI*-ген) (рис. 1).

Отрицательный контрольный образец: в амплификате отрицательного контрольного образца не должно наблюдаться красно-оранжевых флюоресцирующих полос, соответствующих ампликонам положительного контроля. Наличие таких полос свидетельствует о контаминации используемого набора реагентов. В этом случае необходимо повторное исследование. При проведении ПЦР более 35 циклов возможно появление фрагмента 1250 п.н. гена *16S rRNA* (следствие использования рекомбинантной Taq I –полимеразы).

Анализируемые образцы.

- при наличии в пробе анализируемого образца ДНК, не менее, чем из **1000 м.к.** возбудителя геморрагического колита в геле должны наблюдаться четыре красно-оранжевые флюоресцирующие полосы специфических фрагментов ДНК размером 690 п.н. - (ген *eae*), 480 п.н. - (ген *stx2*), 400 п.н. - (ген *rfb*) и 330 п.н. - (ген *stx1*), а также флюоресцирующая полоса, соответствующая фрагменту 1250 п.н. гена *16S rRNA* (внутренний контроль) (рис. 1);

- при отсутствии в пробе анализируемого образца ДНК шига-токсин содержащих *E.coli* серогруппы O157 и наличии ДНК бактерий других видов в геле должна наблюдаться только одна флюоресцирующая полоса, соответствующая фрагменту 1250 п.н. гена *16S rRNA* (внутренний контроль);

- отсутствие флюоресцирующей полосы, соответствующей фрагменту 1250 п.н. гена *16S rRNA*, говорит об ингибировании реакции и необходимости повторного исследования или об отсутствии в данной пробе какой-либо бактериальной ДНК.

6 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Организация работ на этапах приема, разбора и первичной обработки материала, подготовки проб и выделения нуклеиновых кислот, а также обеззараживания проб проводится в соответствии с требованиями СП 1.3.1285-03 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)», МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности». Работа на остальных этапах ПЦР-анализа проводится как с обеззараженным материалом.

7 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

Набор реагентов до начала использования хранят при температуре -18°C , после вскрытия и начала использования – хранят при температуре $2-8^{\circ}\text{C}$ в течение 6 месяцев.

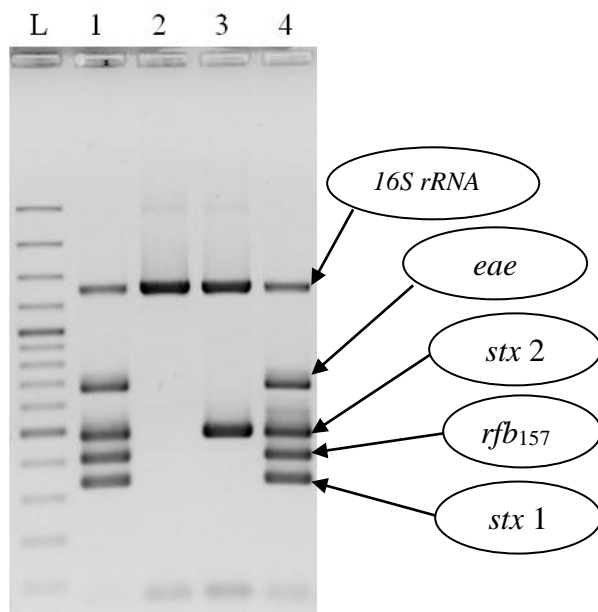


Рис. 1. Пример проведения ПЦР с праймерами «Мульти-O157»

1, 4 - *E.coli* O157:H7 (Stx1⁺ Stx2⁺)

2 - *E.coli* O104:H12

3 - *E.coli* O104:H4 (Stx2⁺)

L – маркеры молекулярной массы

По вопросам, касающимся качества «ТЭК-O157» в течение срока годности следует обращаться в адрес предприятия-изготовителя: 142279 Оболенск, Московская обл., Серпуховский р-н, ФГУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», тел. 8(4967)36-00-79.