

Наборы реагентов для обнаружения ДНК стафилококков и стрептококков в клинических образцах методом ПЦР

Назначение

Наборы реагентов предназначены для качественного определения (выявления) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) возбудителей стафилококковых и стрептококковых инфекций (в том числе латентных) в клинических образцах различного происхождения.

Транспортировка, условия хранения и срок годности

Наборы выдерживают транспортировку в течение семи суток в термосе со льдом или в термоконтейнере с хладагентами, а также в течение четырёх суток при температуре окружающей среды (в том числе при доставке экспресс-почтой).

После получения все компоненты наборов следует хранить при соответствующей температуре в условиях, предохраняющих от перекрестного загрязнения. При соблюдении температурного режима хранения срок годности составляет не менее 12 месяцев с момента внутри-лабораторной проверки (указывается на упаковке, по согласованию с заказчиком).

Непосредственно перед поставкой наборы проверяются в лаборатории на работоспособность и отсутствие посторонних загрязнений.

Комплектация

Один набор включает все необходимые реагенты для постановки 100 реакций в 25 мкл реакционной смеси по одному (любому) возбудителю, включая постановку положительных и отрицательных контролей. В состав набора также входят все необходимые реагенты для последующего анализа продуктов амплификации в агарозных (или полиакриламидных) гелях.

Реагенты для пробоподготовки (выделения ДНК), а также реагенты для приготовления агарозных (или полиакриламидных) гелей в комплект наборов не входят.

Базовая комплектация одного набора и условия хранения каждого компонента указаны ниже.

Состав и условия хранения компонентов наборов

Реагент	Условия хранения	Количество
Реакционные компоненты (хранить в зоне для постановки ПЦР)		
Деионизованная вода (Deionized water)	При комнатной температуре	1 пробирка (из расчёта 2 мл на 100 реакций)
10X ПЦР-буфер (10X PCR Buffer)	-20°C	1 пробирка на 2 набора (500 мкл, на 200 реакций)
Taq-полимераза (Taq-polymerase)	-20°C	1 пробирка (из расчёта 25 мкл на 100 реакций)
Смарт Taq-полимераза (Smart Taq-polymerase)	-20°C	1 пробирка (из расчёта 20 мкл на 100 реакций)
Смарт 10X ПЦР-буфер (Smart 10X PCR Buffer)	-20°C	1 пробирка на 1 набор (250 мкл, на 100 реакций)
12,5X Смесь праймеров (12,5X Set of primers)	-20°C	1 пробирка на 1 набор на 1 локус (200 мкл, на 100 реакций)
Вазелиновое масло (Paraffinic Oil)	При комнатной температуре	1 флакон, при необходимости (из расчёта 2 мл на 100 реакций)
Реакционные компоненты (хранить в зоне для обработки клинического материала)		
Положительный контрольный образец ДНК (Control DNA)	-20°C (+4°C)	1 пробирка (из расчёта 10 мкл на 100 реакций)
Пост-реакционные компоненты (хранить в электрофоретической зоне)		
6X Буфер для нанесения на гель (6X Loading Solution)	-20°C (+4°C)	1 пробирка (из расчёта 500 мкл на 1 набор)
Высокомолекулярный стандарт ДНК (DNA Marker)	-20°C (+4°C)	1 пробирка (из расчёта 15 постановок на 1 набор)

Характеристика отдельных компонентов наборов

- **Деионизованная вода.** Получена на установке «Супер-Кью» (“Millipore”, США). Вода реagentного качества (тип I согласно ASTM, NCCLS, ISO и USP, соответствует требованиям ГОСТ 11 029.003-80). Вода с сопротивлением 18,02 МОм*см (при 25°C) и содержанием общего органического углерода (*total organic carbons, TOC*) менее 20 мкг/л. Очищена от взвешенных частиц, микроорганизмов, органических веществ и некоторых неорганических загрязнителей. Все остальные компоненты наборов приготовлены с использованием воды этого типа.

- **10X ПЦР-буфер. Универсальный десятикратный буфер для всех локусов, уже содержит смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов.** Состав: 166mM (NH₄)₂SO₄; 670mM Tris-HCl (pH 8.8 при 25°C); 0.1% Tween-20; 20mM MgCl₂; 2mM каждый dNTP. Раствор стабилен на протяжении не менее 12 месяцев при хранении при -20°C.

Дополнительная информация.

При длительном хранении и большом числе циклов замораживания-оттаивания 10X ПЦР-буфера возможно выпадение нерастворимого осадка белого цвета. Это обусловлено тем, что в присутствии Трис-НСI при определенных условиях dGTP (дезоксигуанозинтрифосфат) при замораживании выпадает в осадок. Это достаточно сложным образом зависит от концентрации dGTP, способа его получения, солевого состава буфера, микропримесей металлов, pH раствора. В этом случае 10X ПЦР-буфер сохраняет работоспособность, но перед использованием его следует тщательно перемешать и быстро отобрать нужный объем для ПЦР. **Не фильтровать!**

- **Taq-полимераза.** Поставляется в виде раствора фермента с концентрацией 5 ед./мкл в буфере следующего состава: 20mM Tris-HCl (pH 8,0); 100mM KCl; 0,1mM EDTA; 1mM DTT; 50% глицерин, 0,5% Nonidet P-40; 0,5% Tween-20. Фермент устойчив на протяжении не менее 12 месяцев при хранении при -20°C. Термостабильный рекомбинантный фермент ДНК-полимераза с молекулярной массой 94 кДа. Выделен из рекомбинантного штамма *E. coli*, несущего ген полимеразы *Thermus aquaticus YTI*. В присутствии ионов [Mg⁺⁺] фермент катализирует полимеризацию нуклеотидов в дуплексную ДНК в 5'→3' направлении. Фермент обладает 5'→3' экзонуклеазной активностью и аденилтрансферазной активностью. Трансферазная активность приводит к добавлению единичного А (аденилата) на 3'-конце синтезируемого двухцепочечного продукта. Одна единица активности *Taq-полимеразы* соответствует количеству фермента, необходимого для включения 10 нмоль dNTP в кислотно-нерастворимую фракцию за 30 минут при +74°C. Неспецифические эндо- и экзонуклеазные активности **не обнаруживаются** после инкубации в течение двух и одного часова (соответственно) 1 мкг ДНК фага λ и 0,22 мкг ДНК фага λ, гидролизованной рестриктазой *EcoR I*, при 72°C в присутствии 15-20 единиц активности *Taq* ДНК-полимеразы.

Дополнительная информация.

Фермент сохраняет активность на протяжении не менее 65 циклов амплификации (94°C 1 мин., 56°C 1 мин., 72°C 1 мин.). Позволяет успешно амплифицировать фрагменты ДНК размером до 10 тысяч п.н. Продукты ПЦР можно использовать для А/Т клонирования.

Химическая характеристика: Deoxynucleosidetriphosphate: DNA Deoxynucleosidyltransferase E.C. 2.7.7.7.

- **Смарт Taq-полимераза.** Поставляется в виде раствора фермента с концентрацией 5 ед./мкл. Фермент устойчив на протяжении не менее 12 месяцев при хранении при -20°C. *Смарт Taq-полимераза* представляет собой смесь *Taq-полимеразы* и двух клонов специфических моноклональных антител. Основные характеристики фермента соответствуют характеристикам, приведённым выше для *Taq-полимеразы*. Поскольку активность фермента исходно заблокирована моноклональными антителами, то это позволяет осуществлять ПЦР автоматически в режиме «горячего старта»: в условиях приготовления реакционной смеси (при +4°C или при комнатной температуре) ДНК-полимераза не обладает активностью. Диссоциация комплекса *фермент-антитела* (активация ДНК-полимеразы) происходит в первом цикле ПЦР (при температуре выше 70°C). *Смарт Taq-полимераза* демонстрирует более высокую специфичность по сравнению со стандартной *Taq-полимеразой*. *Смарт Taq-полимераза* эффективна при работе с «проблемными» образцами ДНК (деградированный материал, микроколичества), а также в мультиплексных ПЦР.
- **Смарт 10X ПЦР-буфер. Универсальный десятикратный буфер для всех локусов, уже содержит смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов и Смарт Taq-полимеразу.** Состав: 166mM (NH₄)₂SO₄; 670mM Tris-HCl (pH 8.8 при 25°C); 0.1% Tween-20; 20mM MgCl₂; 2mM каждый dNTP; 0,5 ед./мкл *Смарт Taq-полимеразы*; стабилизатор. Раствор стабилен на протяжении не менее 12 месяцев при хранении при -20°C. При использовании *Смарт 10X ПЦР-буфера* все реакции автоматически начинаются в режиме

«горячего старта». *Стабилизатор* обеспечивает воспроизводимость результатов после большого количества циклов замораживания-оттаивания (более 100) без снижения активности *Смарт Taq-полимеразы*.

Возможна комплектация всех наборов исключительно в формате «Смарт»: *Смарт 10X ПЦР-буфером* и/или *Смарт Taq-полимеразой* (по согласованию с заказчиком, оговаривается дополнительно).

- **12,5X Смесь праймеров.** Для каждого локуса (возбудителя) оптимальные рабочие концентрации праймеров подобраны индивидуально и могут быть изменены производителем без уведомления пользователей. Растворы стабильны на протяжении не менее 12 месяцев при хранении при -20°C. Работоспособность каждой пары праймеров проверяется в лаборатории на различных разведениях контрольных ДНК. В реакционную смесь следует вносить по **2,0 мкл** поставляемых растворов (при конечном объеме реакционной смеси 25 мкл).
- **Вазелиновое масло (Oleum Vaselini, P.71.273.2).** Используется только при работе с амплификаторами без нагреваемой крышки. *Хранить в защищенном от света месте, не подвергать воздействию ультрафиолетового излучения.*
- **Положительные контрольные образцы ДНК.** Поставляются в виде водных растворов высокомолекулярной очищенной геномной бактериальной ДНК с концентрацией не менее 10 нг/мкл. Раствор стабилен на протяжении не менее 12 месяцев при хранении при -20°C. Допустимо хранение при +4°C при регулярном использовании. **Хранить в зоне для обработки клинического материала, отдельно от остальных компонентов наборов.** Положительные контроли ДНК следует использовать при стартовых постановках ПЦР для подтверждения работоспособности наборов после транспортировки, а также для постановки «положительных контролей амплификации». В реакционную смесь следует вносить по **1,0 мкл** поставляемых растворов (при конечном объеме реакционной смеси 25 мкл).
- **Высокомолекулярные стандарты ДНК** (нелокусные маркеры молекулярного веса). Поставляются в буфере следующего состава: 8,33 mM Трис-НСl (рН 7,8), 0,83 mM ЭДТА, 1X буфер для нанесения на гель. Концентрация 100-170 нг/мкл. **Хранить в электрофоретической зоне** (при регулярном использовании при +4°C, более длительное хранение при -20°C). Готовы для использования: после полного размораживания и перемешивания в лунку геля наносится по **1,5-2,0 мкл** (агароза) или 0,5-1 мкл (ПАГ) поставляемых растворов. Ниже приведен полный перечень доступных поставляемых маркеров. Подчеркнуты фрагменты, которые обычно не видны в агарозных гелях. **Жирным шрифтом** выделены фрагменты, визуальнo более интенсивные.

Высокомолекулярные стандарты ДНК	Общее число фрагментов ДНК	Длины фрагментов ДНК, в парах нуклеотидов	Использование в ПАГ (*)
100 bp DNA Ladder	10	1000; 900; 800; 700; 600; 500 ; 400; 300; 200; 100	-
50 – 1000 bp DNA Ladder	11	1000; 900; 800; 700; 600; 500; 400; 300; 200; 100; 50	+
50 – 500 bp DNA Ladder	10	500; 450; 400; 350; 300; 250; 200; 150; 100; 50	+
pUC19 DNA / MspI	13	501; 489; 404; 331; 242; 190; 147; 111; 110; 67 ; 34; 34; 26	+

(*) Все перечисленные высокомолекулярные стандарты пригодны для использования в агарозных гелях. При использовании вышперечисленных маркеров в неденатурирующих ПАГ (29:1 или 19:1, различной процентности) следует учитывать, что в ПАГ подвижность отдельных фрагментов ДНК может являться аномальной. Как следствие, это может привести к некорректному определению размеров амплифицированных фрагментов.

- **6X Буфер для нанесения на гель.** Используется для нанесения образцов после ПЦР на гель. Состав: 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0,03% бромфеноловый синий (*bromophenol blue*), 0,03% ксиленианол (*xylene cyanol FF*), 65% глицерин, 60 mM ЭДТА.

Хранить в электрофоретической зоне при +4°C при регулярном использовании. Более длительное хранение осуществляется при -20°C.

Проведение ПЦР

10X ПЦР-буферы, 12,5X смеси праймеров и образцы исследуемой ДНК перед каждым использованием следует полностью разморозить при комнатной температуре. Затем перемешать содержимое пробирок, встряхнув на Вортексе в течение нескольких секунд. Осадить содержимое всех используемых пробирок на дно (центрифугированием в течение нескольких секунд).

Для постановки ПЦР для одного образца ДНК по одному (любому) локусу в амплификационную пробирку вносят следующие реагенты в указанном порядке:

Реагент	При использовании 10X ПЦР-буфера и Taq-полимеразы	При использовании 10X ПЦР-буфера и Смарт Taq-полимеразы	При использовании Смарт 10X ПЦР-буфера
Деионизованная вода	19,3 мкл	19,4 мкл	19,5 мкл
10X ПЦР-буфер	2,5 мкл	2,5 мкл	2,5 мкл
12,5X смесь праймеров	2 мкл	2 мкл	2 мкл
Полимераза	0,2 мкл	0,1 мкл	-
Исследуемый образец ДНК (10-100 нг/мкл, *)	1 мкл	1 мкл	1 мкл
<i>Суммарный объем</i>	<i>25 мкл</i>	<i>25 мкл</i>	<i>25 мкл</i>

(*) При работе с низкими концентрациями ДНК (<10 нг/мкл) следует увеличить вносимый в реакционную смесь объем исследуемого образца за счёт соответствующего уменьшения объема деионизованной воды.

Внимание!

Количество анализируемой ДНК должно быть не менее 5,0 нг на 25 мкл реакционной смеси. При использовании меньшего количества ДНК производитель не гарантирует адекватную наработку специфических продуктов реакции при 30 циклах ПЦР. При работе с низкими концентрациями стартовой ДНК число циклов ПЦР следует увеличить до 35-40.

Для получения воспроизводимых результатов необходимо строгое соблюдение объемов добавляемых компонентов. Поэтому для более точного соблюдения концентрационных условий и однородности всех проб рекомендуется смешивать в отдельной стерильной пробирке все компоненты для ПЦР (за исключением, естественно, образцов ДНК) из расчёта:

(объём компонента для 1 образца) * (число исследуемых образцов + 3)

После тщательного перемешивания такая смесь разливается по амплификационным пробиркам, после чего в них добавляют исследуемые образцы ДНК.

Помимо исследуемых образцов, в каждом раунде ПЦР осуществляется также постановка «положительного» (К+) и «отрицательного» (К-) *контролей амплификации*. Последний необходим для контроля как возможного загрязнения компонентов наборов чужеродной ДНК, так и соблюдения «чистоты» условий в конкретном раунде пробоподготовки. В пробирку «отрицательного контроля» вместо исследуемого образца ДНК добавляют такой же объём деионизованной воды (**1 мкл**). В пробирку «положительного контроля» добавляют **1 мкл** поставляемой соответствующей контрольной ДНК.

При использовании амплификаторов без нагреваемой крышки во все пробирки добавляют по одной капле (примерно 20 мкл) минерального или вазелинового масла для предотвращения испарения реакционной смеси. После добавления всех компонентов пробирку следует сразу закрыть.

Пробирки откручивают в течение нескольких секунд на Вортексе для осаждения на дно капель на стенках и удаления пузырьков воздуха между реакционной смесью и маслом.

Помещают пробирки в амплификатор и проводят ПЦР по соответствующим программам. Рекомендуется начинать амплификацию не позднее, чем через 30 минут после добавления образцов ДНК в реакционную смесь.

При использовании *Smart Taq*-полимеразы вместо стандартной *Taq*-полимеразы условия ПЦР не меняются.

Все указанные в настоящей «Инструкции» программы ПЦР для отдельных локусов обеспечивают устойчивые воспроизводимые результаты (электрофоретические аллельные полосы удовлетворительной интенсивности без переработки неспецифических продуктов реакции) при использовании прибора *MC-2* («Терцик», «ДНК-Технология», Россия) в комбинации с тонкостенными пробирками.

Устойчивые воспроизводимые результаты с использованием этих же программ ПЦР были получены также на следующих приборах: *PHC-2* (“Techne”, Великобритания), *PolyChain* (“Polygen”, Австрия), *PTC-100* (“MJ Research Inc.”, Великобритания), *Omn-E*, *TouchDown* (“Hybaid”, Великобритания), *9600 GenAmp System* (“Perkin-Elmer”, США), *T1 Thermocycler* (“Biometra GmbH”, Германия), *DNA Engine Dyad®*, *T100™ Thermal Cycler* (“Bio-Rad Laboratories”, США), *Циклотемн-2...5* (СТМ, Россия), *БИС М-111* («БИС-Н», Россия).

При использовании других, не перечисленных выше, моделей термоциклеров или несоответствующих ПЦР-пробирок может возникнуть необходимость в коррекции условий ПЦР.

Условия амплификации

	Первая денатурация	Число циклов	Цикл	Последний синтез
<i>Staphylococcus aureus</i>	95°C, 2 мин	30	94°C, 30 сек	72°C, 5 мин
<i>Staphylococcus epidermidis</i>			58°C, 30 сек	
			72°C, 30 сек	
			94°C, 30 сек	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>			30-35	
	72°C, 30 сек			
<i>Streptococcus pyogenes</i>	35	94°C, 30 сек		
		55°C, 30 сек		
		72°C, 30 сек		

После завершения реакции все пробирки следует собрать в специальный штатив и перенести в электрофоретическую зону. Образцы можно сразу же анализировать методом электрофореза или хранить при 2-8°C несколько недель, а при -20°C – несколько месяцев.

Регистрация результатов

Амплифицированные фрагменты ДНК можно анализировать в агарозных или в полиакриламидных гелях (ПАГ). Визуализация фрагментов ДНК может осуществляться различными методами: гибридизация по Саузерну, окрашивание бромистым этидием или другими интеркалирующими красителями (например, SYBR Green I, любые гели), окрашивание гелей нитратом серебра (только ПАГ). Различные модификации методов электрофореза как в агарозных, так и в полиакриламидных гелях подробно описаны во многих источниках, отдельные рекомендуемые методики приведены на нашем сайте.

Перед нанесением на гель анализируемые образцы смешиваются с *бХ буфером для нанесения на гель* (поставляется в комплекте) в объемном соотношении 5:1. Можно сразу по окончании ПЦР добавить во все пробирки по 5-6 мкл этого буфера. Присутствие красителей в буфере облегчает нанесение образцов на гель и позволяет в процессе электрофореза контролировать, в какой части геля находятся целевые фрагменты ДНК.

В зависимости от количественного выхода продуктов ПЦР и метода визуализации фрагментов ДНК в гелях, для одного нанесения следует брать 1-5 (ПАГ) или 4-8 (агароза) мкл амплифицированного образца. Следует учитывать, что избыточное количество продукта ПЦР, наносимое на дорожку геля (*перегруз*), приводит к такому эффекту, как увеличение подвижности целевых фрагментов ДНК в геле.

Как минимум одну дорожку в геле используют для нанесения соответствующего *нелокусного высокомолекулярного стандарта ДНК* (поставляется в комплекте, следует использовать по **1,5-2,0 мкл** для агарозных гелей).

Электрофорез проводят при напряженности поля около 10 В/см (агарозные гели) или 25 В/см (ПАГ), помещая гель стартовыми лунками к катоду (минус, черный разъем). Напряженность поля

рассчитывается как выходное напряжение источника питания (измеренное в вольтах), делённое на расстояние между электродами камеры (измеренное в сантиметрах). Расстояние между электродами для горизонтального электрофореза определяется по прямой проекции на плоскость, без учета геометрии камеры.

Реальные значения максимального напряжения (соответственно, минимального времени электрофореза) сильно зависят от моделей источников питания и камер, процентности геля, типа, кратности и свежести используемого буфера. Основным критерием завышенных значений напряжения (мощности) является перегрев буфера в камере свыше 50°C, а также сильное искривление фронта лидирующего красителя (эффект *улыбки*).

По окончании электрофореза окрашивают гель и документируют полученные результаты. Агарозные и неденатурирующие ПАГ можно окрашивать в растворе бромистого этидия (рабочая концентрация раствора 0,5 мкг/мл, окрашивание в течение 20-40 мин) с последующей промывкой в дистиллированной воде и просмотром в ультрафиолетовом свете на трансиллюминаторе (длина волны 254 или 302 нм). Неденатурирующие и денатурирующие ПАГ можно также окрашивать нитратом серебра. Полученные результаты документируют фотографированием (видеосъемкой, сканированием) гелей с использованием при необходимости оранжевого или интерференционного (594 нм) светофильтра или в виде высушенных гелей (в случае окрашивания ПАГ серебром).

Учёт результатов

Визуализация каких-либо полос размером более **70 п.н.** на дорожках «*отрицательного контроля ПЦР*» свидетельствует о загрязнении реакционной смеси чужеродной ДНК (контаминации). Результаты анализа в таких случаях не подлежат дальнейшему учёту для всех образцов.

Визуализация **одной** отчетливой полосы соответствующего размера (см. таблицу ниже) на дорожках «*положительного контроля ПЦР*» свидетельствует об успешном прохождении реакции. Результаты анализа для исследуемых образцов в таких случаях могут быть успешно учтены.

	Размер амплифицируемых фрагментов ДНК, пар нуклеотидов	Примечания
<i>Staphylococcus aureus</i>	547 – 875 (650 п.н. для текущей поставки)	Размер амплифицируемых фрагментов варьирует в указанном диапазоне для разных штаммов
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	124	штамм В1767 из коллекции ВКПМ
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	682	
<i>Streptococcus pyogenes</i>	220	

В исследуемых образцах допустима визуализация дополнительных «минорных» полос выше или ниже референтной полосы «*положительного контроля*». Однако визуализация в исследуемом образце двух и более полос одинаковой интенсивности свидетельствует либо о загрязнении образца чужеродной ДНК (возможно и смешанное происхождение образцов), либо о неспецифических условиях амплификации. В таких случаях результаты анализа не подлежат учёту.

Список литературы

- 1) Черкасский Б.Л. Инфекционные и паразитарные болезни человека: Справочник эпидемиолога. — М.: Изд-во «Медицинская газета», 1994. — 624 с.
- 2) Hookey J.V., Richardson J.F., Cookson B.D. (1998) Molecular typing of *Staphylococcus aureus* based on PCR restriction fragment length polymorphism and DNA sequence analysis of the coagulase gene. — J. Clin. Microbiol., 36 (4), 1083–1089.
- 3) Martineau F., Picard F.J., Roy P.H., Ouellette M., Bergeron M.G. (1996) Species-specific and ubiquitous DNA-based assays for rapid identification of *Staphylococcus epidermidis*. — J. Clin. Microbiol., 34 (12), 2888–2893.
- 4) du Plessis M., Smith A.M., Klugman K.P. (1998) Rapid Detection of Penicillin-Resistant *Streptococcus pneumoniae* in Cerebrospinal Fluid by a Seminested-PCR Strategy. — J. Clin. Microbiol., 36 (2), 453–457.
- 5) Takahashi T., Satoh I., Kikuchi N. (1999) Phylogenetic relationships of 38 taxa of the genus *Staphylococcus* based on 16S rRNA gene sequence analysis. — Int. J. Syst. Bacteriol., 49 Pt 2, 725-728. PMID: 10319495.
- 6) Tyler S.D., Johnson W.M., Huang J.C., Ashton F.E., Wang G., Low D.E., Rozee K.R. (1992) Streptococcal erythrogenic toxin genes: detection by polymerase chain reaction and association with disease in strains isolated in Canada from 1940 to 1991. — J. Clin. Microbiol., 30 (12), 3127–3131.

Техническое содействие / информация

Благодарим Вас за то, что Вы предпочли нашу “in-house-made” продукцию и будем рады продолжить сотрудничество. Адресуйте все вопросы, предложения, а также возможные рекламации:

Ефремов Илья Алексеевич – кандидат биологических наук

Моб. тел. +7-903-786-4-789

Факс: +7(495) 310-96-97

Электронная почта info@tapotili.ru

Интернет: www.tapotili.ru

Стафилококковая инфекция

Род *Staphylococcus* насчитывает более 40 видов, из которых коагулазоположительный *S. aureus* имеет наибольшее клиническое значение. Дифференциальная видовая диагностика методом ПЦР позволяет определять большинство значимых видов, в том числе: *S. aureus*, *S. saprophyticus*, *S. capitis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. sciuri*, *S. schleiferi*, *S. epidermidis*, *S. warneri*.

Золотистый стафилококк (*Staphylococcus aureus*)

Коагулаза продуцируется всеми штаммами *S. aureus*, и продукция этого белка является принципиальным клинико-микробиологическим критерием для идентификации *S. aureus*. Устойчивые к метициллину штаммы *S. aureus* (*MRSA*), в том числе эпидемические (Epidemic methicillin-resistant *S. aureus*, *EMRSA*), являются значимым болезнетворным агентом во всем мире. К настоящему времени описано более 16 штаммов *EMRSA*, причем в отдельных странах по распространенности преобладают различные штаммы. Так, в Великобритании по данным на 1996 г., доля штаммов *EMRSA-3*, *15* и *16* составила около 50% от всех фаготипированных изолятов *S. aureus*.

В данном молекулярно-диагностическом наборе используется детекция коагулазоположительных штаммов *S. aureus* методом ПЦР, основанная на амплификации полиморфного участка (3'-повторяющиеся элементы), находящегося в кодирующей части гена коагулазы (позиции 1513-2188).

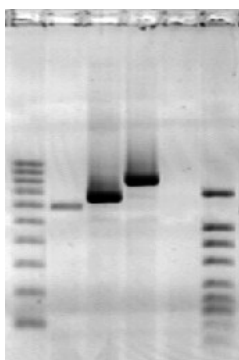
Видоспецифичность метода проверена на 85 штаммах *S. aureus*, включая *EMRSA-1...-16* и устойчивые к метициллину штаммы (methicillin-sensitive *S. aureus*, *MSSA*, 10 штаммов).

Видоспецифичность подтверждена негативными результатами при амплификации ДНК коагулазонегативных стафилококков: *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus*.

При амплификации ДНК штамма *EMRSA-16* выявляется фрагмент длиной 547 п.н. По причине вариабельности амплифицируемого фрагмента гена коагулазы, специфические продукты ПЦР для разных изолятов *S. aureus* находятся в дискретном диапазоне длин: **547±15, 603±20, 660±20, 875±10 п.н.**

В ходе дополнительного анализа возможна частичная дифференциация штаммов *MRSA* и *MSSA* (в том числе выявление штаммов *EMRSA-3*, *-15*, *-16*) с использованием рестриктазного анализа продуктов ПЦР.

Пример электрофоретической детекции различных изолятов *S. aureus* с использованием данного молекулярно-диагностического набора приведен на рисунке ниже.



Фрагмент окрашенного бромистым этидием 2%-го агарозного геля.

Дорожка 1 – высокомолекулярный стандарт 100 bp DNA Ladder.

Дорожка 2 – положительный контроль ПЦР, выявлен фрагмент размером 603 п.н.

Дорожка 3 – исследуемый образец ДНК, положительный результат, выявлен фрагмент размером 660 п.н.

Дорожка 4 – исследуемый образец ДНК, положительный результат, выявлен фрагмент размером 875 п.н.

Дорожка 5 – отрицательный контроль ПЦР.

Дорожка 6 – высокомолекулярный стандарт *pBlueScript DNA***MspI*.

Эпидермальный стафилококк (*Staphylococcus epidermidis*)

S. epidermidis, аэробный грам-положительный коагулазонегативный стафилококк, является вторым по важности этиологическим агентом стафилококковых инфекций человека. В ряде исследований продемонстрирована успешная идентификация ДНК *S. epidermidis* из различных клинических образцов методом ПЦР, и этот метод диагностики в настоящее время можно рекомендовать в качестве быстрого и эффективного теста для рутинного использования.

В данном молекулярно-диагностическом наборе используется детекция *S. epidermidis* методом ПЦР, основанная на амплификации видоспецифического участка ДНК длиной 705 п.н. Видоспецифичность метода проверена на 79 штаммах *S. epidermidis*, подтверждена отрицательными результатами при амплификации ДНК *S. capitis*.

Стрептококковая инфекция

Род *Streptococcus* насчитывает более 50 видов, которые имеют различное клиническое значение и таксономически могут быть подразделены в 6 кластеров: (1) pyogenic-группа, включающая *S. agalactiae*, *S. canis*, *S. dysgalactiae*, *S. equi*, *S. iniae*, *S. porcinus*, *S. pyogenes*; (2) bovis-группа, включающая *S. bovis*, *S. equinus*, *S. alactolyticus*; (3) salivarius-группа, включающая *S. salivarius*, *S. thermophilus*, *S. vestibularis*; (4) mutans-группа, включающая *S. cricetus*, *S. downei*, *S. mutans*, *S. sobrinus*; (5) anginosus-группа (milleri-группа), включающая *S. anginosus*, *S. constellatus*, *S. intermedius*; (6) mitis-группа, включающая *S. mitis*, *S. oralis*, *S. pneumoniae*, *S. sanguis*, *S. parasanguis*, *S. gordonii*.

Дифференциальная видовая диагностика методом ПЦР позволяет определять следующие виды: *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *S. iniae*.

Пневмококк (*Streptococcus pneumoniae*)

К настоящему времени пневмококки являются наиболее распространенным безветренным агентом всех острых пневмоний бактериальной этиологии, и выявление *S. pneumoniae* происходит в 30-40% случаев инфекции нижних дыхательных путей. *S. pneumoniae* является вторым по распространенности этиологическим агентом бактериальных менингитов и преобладающим в случаях синуситов и отитов. Начиная с 1940-х годов, клинические изоляты *S. pneumoniae* демонстрируют высокую степень устойчивости к антибиотикам, в том числе к пенициллину, рекомендуемому для лечения предположительных пневмококковых инфекций.

Во множестве исследований продемонстрирована успешная ПЦР-идентификация ДНК *S. pneumoniae* из различных клинических образцов, в том числе в препаратах спинно-мозговой жидкости. Данный метод диагностики в настоящее время можно рекомендовать в качестве быстрого и эффективного теста для рутинного использования, опережающего такие традиционные методы как культурально-биохимические и иммунологические.

Данный молекулярно-диагностический метод детекции *S. pneumoniae* основан на амплификации видоспецифического консервативного участка длиной 682 п.н., кодирующего транспептидазу и находящегося в гене пенициллин-связывающего белка (penicillin-binding protein 2B gene, *pbp2B*). Видоспецифичность метода проверена на 35 изолятах *S. pneumoniae*, включая штаммы 11 различных серотипов, а также устойчивые к пенициллину (penicillin-resistant *S. pneumoniae*, PRSP) и чувствительные (penicillin-sensitive *S. pneumoniae*, PSSP) штаммы. Видоспецифичность подтверждена негативными результатами при амплификации ДНК следующих видов: коагулазонегативные стафилококки, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus faecium*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus milleri*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus bovis*, виридная группа *Streptococcus mitior*, *Haemophilus influenzae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Listeria monocytogenes*, *Cryptococcus neoformans*, *Moraxella catarrhalis*, *Neisseria meningitidis*.

В ходе дополнительного анализа возможна дифференциация штаммов PRSP и PSSP (гнездовая ПЦР).

Гемолитический стрептококк (*Streptococcus pyogenes*)

В-гемолитические, грамположительные кокки группы А, растущие цепочками. Осуществляют молочнокислое ферментативное брожение. При скарлатине токсигенный стрептококк размножается в носоглотке, вызывая местные воспалительные изменения. Продуцируемые им экзотоксины вызывают симптомы общей интоксикации и кожную сыпь. При атипичной форме болезни (стертая скарлатина) все симптомы выражены рудиментарно, а некоторые вообще отсутствуют, поэтому возникают затруднения при дифференцировании от кори, краснухи, лекарственной сыпи, скарлатиноподобной формы псевдотуберкулеза. Наблюдаются случаи стафилококковой инфекции со скарлатиноподобным

синдромом. Распространяясь в организме, стрептококк способен вызвать мастоидит, перитонит, послеродовой сепсис, рожистое воспаление. Рецидивирующий стрептококковый фарингит нередко осложняется ревматизмом, что сопровождается появлением в крови антител (в высоком титре) к стрептококковым антигенам. Из ткани сердца, поражаемого при ревматизме, возбудителя выделить не удается; в основе поражения, по-видимому, лежит иммунная реакция.

Данный молекулярно-диагностический метод детекции *S. pyogenes* основан на амплификации видоспецифичного участка, находящегося в гене, кодирующем стрептолизин О (streptolysin O, slo). Видоспецифичность метода (100%-ная детекция) проверена на 152 штаммах *S. pyogenes*, включая М- и Т- штаммы. Видоспецифичность подтверждена негативными результатами при амплификации ДНК различных штаммов стрептококков не группы А и пневмолизин-продуцирующих штаммов *Streptococcus pneumoniae*.

В ходе дополнительного анализа возможно подтверждение видоспецифичности с использованием рестриктазного анализа продуктов ПЦР.