

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель Министра –
Главный государственный
санитарный врач Республики Беларусь
С.В.Нечай

«*10*» _____ 2025 г.

Регистрационный № *003-0625*



МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЕНОВ БЕТА-ЛАКТАМАЗ

РАСШИРЕННОГО СПЕКТРА

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: государственное учреждение
«Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного
здоровья»

АВТОРЫ: академик НАН Беларуси, д-р мед. наук, профессор Титов Л.П.,
канд. биол. наук Янович О.О., Трусевич М.О.

Минск, 2025

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) изложен метод определения генов бета-лактамаз расширенного спектра с помощью ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени», который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на диагностику заболеваний и патологических состояний, вызванных грамотрицательными бактериями с устойчивостью к антибиотикам.

Инструкция предназначена для врачей лабораторной диагностики, врачей-эпидемиологов, врачей-инфекционистов, иных врачей-специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам с заболеваниями и патологическими состояниями, вызванными грамотрицательными бактериями с устойчивостью к антибиотикам, в стационарных и/или амбулаторных условиях и/или в отделениях дневного пребывания.

1. Показания к применению

Заболевания, вызванные грамотрицательными бактериями с множественной резистентностью к антибиотикам (МКБ10 - В96 Другие уточненные бактериальные агенты как причина болезней, классифицированных в других рубриках).

2. Противопоказания к применению: отсутствуют.

3. Перечень необходимых изделий медицинского назначения, расходных материалов и др.

ПЦР-бокс;

микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» (10000-15000xg);

микроцентрифуга-вортекс;

термоциклер для проведения ПЦР в режиме реального времени;

дозаторов пипеточных комплект (0,5-10 мкл; 20-200 мкл);

холодильник, диапазон рабочих температур от +2 до +4°C;

камера морозильная, диапазон рабочих температур от -16 до -25°C;
УФ-лампа бактерицидная;
смесь готовая для ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени;

праймеры олигонуклеотидные 10 пМ/мкл;

зонды флуоресцентно-меченые 10 пМ/мкл;

вода стерильная бидистиллированная свободная от нуклеаз;

пробирки пластиковые типа «Эппендорф» (0,2 мл и 1,5 мл);

наконечники полимерные с фильтром объемом 10, 200, 1000 мкл;

халаты;

перчатки резиновые;

штативы для пробирок.

4. Технология осуществления метода

1) Выделение ДНК

Материалом для исследования является ДНК грамотрицательных бактерий, выделенная из чистых бактериальных культур. ДНК выделяют стандартным методом с использованием коммерческих наборов в соответствии с инструкцией по применению производителя набора. Выделенные образцы ДНК хранят при -16°C...-24°C не более года. Не допускается повторное замораживание-оттаивание образцов.

2) ПЦР в режиме реального времени для выявления генов бета-лактамаз расширенного спектра группы СТХ-М

Выявление генов группы СТХ-М проводят в мультиплексной ПЦР в режиме реального времени с специфическими праймерами и зондами (см. таблицу 1).

Готовят реакционную смесь с учетом количества исследуемых образцов и двух контролей (положительного и отрицательного) (см. таблицу 2). Приготовленную реакционную смесь разливают в

соответствующее количество пробирок для ПЦР по 19 мкл. Затем вносят по 1 мкл исследуемой ДНК.

Таблица 1 – Последовательность праймеров для детекции генов группы СТХ-М

Мишень	Последовательность, 5' - 3'
Группы СТХ-М	F-ATGTGCAGYACCAGTAARGTKATGGC R-ATCACKCGGRTCGCCIGGRAT JOE-CCCGACAGCTGGGAGACGAAACGT-Tamra (СТХ-М-1) Vy5-CAGGTGCTTATCGCT CTCGCTCTGTT-BHQ-2 (СТХ-М-2) ROX-CTGGATCGCACTGAACCTACGCTGA-BHQ-2 (СТХ-М-9)

Таблица 2 – Состав реакционной смеси для детекции генов группы СТХ-М

Реактивы	Объем на одну реакцию (мкл)
Готовая смесь для ПЦР	10
Праймер прямой	1
Праймер обратный	1
Меченный зонд СТХ-М-1	0,2
Меченный зонд СТХ-М-2	0,2
Меченный зонд СТХ-М-9	0,2
Вода	6,4

Пробирки с реакционной смесью размещают в приборе для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени» и программируют его для выполнения программы и регистрации флуоресцентного сигнала (см. таблицу 3).

Таблица 3 – Условия амплификации для детекции генов группы СТХ-М

Ген	Шаг	Температура	Время
СТХ-М	денатурация 30 циклов	95°C	10 мин.
		95°C	8 сек.
		60°C	60 сек.

Анализ результатов проводят с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме

«реального времени». Графики накопления флуоресцентного сигнала анализируют по следующим каналам:

по каналу для флуорофора JOE регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагментов гена СТХ-М-1;

по каналу для флуорофора Ву5 регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагментов гена СТХ-М-2;

по каналу для флуорофора ROX регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагментов гена СТХ-М-9.

Результат реакции оценивают как положительный, если значение порогового цикла (Ct) на соответствующем канале ниже или равно 30. Результат реакции оценивают как отрицательный, если значения порогового цикла (Ct) отсутствуют или превышают 30.

Результат анализа недействительный, если значение Ct для отрицательного образца превышает граничное значение или для положительного образца отсутствуют значения порогового цикла Ct. В этом случае повторно проводят ПЦР-исследование.

3) ПЦР в режиме реального времени для выявления генов бета-лактамаз TEM и SHV

Выявление генов TEM и SHV проводят в мультиплексной ПЦР в режиме реального времени с специфическими праймерами и зондами (см. таблицу 4).

Готовят реакционную смесь с учетом количества исследуемых образцов и двух контролей (положительного и отрицательного) (см. таблицу 5). Приготовленную реакционную смесь разливают в

соответствующее количество пробирок для ПЦР по 19 мкл. Затем вносят по 1 мкл исследуемой ДНК.

Таблица 4 – Последовательность праймеров для детекции генов TEM и SHV

Мишень	Последовательность, 5' - 3'
TEM	F-GCATCTTACGGATGGCATGA R-GTCCTCCGATCGTTGTCAGAA Fam-CAGTGCTGCCATAACCATGAGTGA-BHQ-1
SHV	F-TCCCATGATGAGCACCTTTAAA R-TCCTGCTGGCGATAGTGGAT By5-TGCCGGTGACGAACAGCTGGAG-BHQ-2

Таблица 5 – Состав реакционной смеси для детекции генов TEM и SHV

Реактивы	Объём на одну реакцию (мкл)
Готовая смесь для ПЦР	10
Праймер прямой TEM	0,5
Праймер обратный TEM	0,5
Праймер прямой SHV	0,5
Праймер обратный SHV	0,5
Меченный зонд TEM	0,2
Меченный зонд SHV	0,2
Вода	6,6

Пробирки с реакционной смесью размещают в приборе для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени» и программируют его для выполнения программы и регистрации флуоресцентного сигнала (см. таблицу 6).

Таблица 6 – Условия амплификации для детекции генов TEM и SHV

Ген	Шаг	Температура	Время
TEM, SHV	денатурация	95°C	15 мин.
	30 циклов	95°C	15 сек.
		58°C	20 сек.

Анализ результатов проводят с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме

«реального времени». Графики накопления флуоресцентного сигнала анализируют по следующим каналам:

по каналу для флуорофора FAM регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагментов гена TEM;

по каналу для флуорофора Vy5 регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагментов гена SHV.

Результат реакции оценивают как положительный, если значение порогового цикла (Ct) на соответствующем канале ниже или равно 30. Результат реакции оценивают как отрицательный, если значения порогового цикла (Ct) отсутствуют или превышают 30.

Результат анализа недействительный, если значение Ct для отрицательного образца превышает граничное значение или для положительного образца отсутствуют значения порогового цикла Ct. В этом случае повторно проводят ПЦР-исследование.

5. Возможные ошибки при использовании метода и пути их устранения

Использование метода ПЦР подразумевает строгое следование всем правилам организации и проведения исследований в ПЦР-лаборатории.

Возможны следующие ошибки:

отсутствие кривой флуоресценции в пробе положительного контроля или ее наличие в пробе отрицательного контроля свидетельствует о невозможности учета результатов реакции;

отсутствие кривой флуоресценции в положительном контроле указывает на возможную деградацию ДНК, внесение в реакционную смесь ингибиторов реакции;

наличие кривой флуоресценции в отрицательном контроле свидетельствует о контаминации проб.

Пути устранения ошибок:

провести исследование повторно начиная с этапа экстракции ДНК;

соблюдать последовательность операций при выполнении исследований, соблюдать объемы реактивов;

точно следовать инструкциям по эксплуатации приборов.

Сотрудники, проводящие исследования, должны соблюдать методические указания и санитарные правила в отношении безопасности работы в ПЦР-лаборатории.