

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель Министра –
Главный государственный санитарный
врач Республики Беларусь
Н.П.Жукова
«20» июня 2019 г.
Регистрационный № 004-0619

МЕТОД ГЕНОТИПИРОВАНИЯ *CHLAMYDIA TRACHOMATIS*

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический
центр эпидемиологии и микробиологии»

АВТОРЫ: канд. биол. наук Рубаник Л.В., д-р. мед. наук, профессор
Полещук Н.Н., Капустина Ю.М.

Минск, 2019

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель министра —
Главный государственный
санитарный врач
Республики Беларусь

_____ Н. П. Жукова
20.06.2019
Регистрационный № 007-0619

МЕТОД ГЕНОТИПИРОВАНИЯ *CHLAMYDIA TRACHOMATIS*

инструкция по применению

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

АВТОРЫ: канд. биол. наук Л. В. Рубаник, д-р мед. наук, проф. Н. Н. Полещук,
Ю. М. Капустина

Минск 2019

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен метод генотипирования *Chlamydia trachomatis*, который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на диагностику и медицинскую профилактику заболеваний, вызываемых данным микроорганизмом.

Инструкция предназначена для врачей-микробиологов, врачей-эпидемиологов, врачей лабораторной диагностики и иных врачей-специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам в стационарных и/или амбулаторных условиях, и/или условиях отделения дневного пребывания.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ

Изделия медицинской техники:

- термоциклер для ПЦР;
- бокс ламинарный с бактерицидной лампой;
- холодильник (от 2 до 8 °С) с морозильной камерой (от -16 до -20 °С);
- термостат твердотельный для микропробирок на 1,5 и 0,5 мл;
- микроцентрифуга для пробирок типа «эппендорф» до 13 000 об/мин;
- вортекс-шейкер;
- дозаторы пипеточные механические переменного объема, комплект (1–10; 2–20; 20–200; 200–1000 мкл);
- источник постоянного тока для электрофореза;
- камера для горизонтального электрофореза;
- трансиллюминатор ультрафиолетовый для просмотра гелей.

Изделия медицинского назначения:

- среда транспортная для мазков-соскобов из урогенитального тракта;
- зонд гинекологический одноразовый или цитощетка;
- пробирки пластиковые типа «эппендорф» (0,5 и 1,5 мл);
- наконечники полимерные для дозаторов пипеточных;
- штативы для пробирок;
- набор реагентов для выделения ДНК из клинического материала (соскоба слизистых оболочек урогенитального тракта человека);
- набор реагентов для обнаружения ДНК *C. trachomatis*.

Реактивы:

- ПЦР смесь, содержащая буфер для Таq-полимеразы, Таq-полимеразу, MgCl₂ и смесь дНТФ;
- олигонуклеотидные праймеры (концентрация 25 пМ);
- стерильная бидистиллированная свободная от нуклеаз вода;
- агароза;
- маркер молекулярного веса (от 50 до 1500 п.о.);
- ТАЕ-буфер;
- бромистый этидий.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Патологические состояния, вызываемые *C. trachomatis* (МКБ-10 – А56, А74).

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Получение, транспортировка и хранение биологического материала

Материалом для исследования является соскоб эпителиальных клеток из цервикального канала, уретры, влагалища. Для взятия соскоба используется зонд гинекологический одноразовый или цитощетка.

Материал помещают в стерильную пробирку объемом 1,5 мл, содержащую 500 мкл коммерческой транспортной среды, маркируют и доставляют в лабораторию в плотно закрытой пробирке. Условия транспортировки и хранения: при комнатной температуре от 18 до 25 °С до 48 ч; при температуре от 2 до 8 °С до 7 сут; для более длительного хранения (до 1 года) образцы необходимо заморозить при температуре -20 °С и ниже. Не допускается повторное замораживание-оттаивание образцов.

Выделение ДНК из биологического материала (мазка-соскоба из урогенитального тракта)

Тотальную ДНК выделяют стандартным методом с использованием коммерческих наборов, предназначенных для выделения ДНК и зарегистрированных в Республике Беларусь в установленном порядке. Выделенные образцы ДНК хранят при -20 °С не более 1 года. Не допускается повторное замораживание-оттаивание образцов.

Детекция ДНК *C. trachomatis* с помощью ПЦР в режиме реального времени

Для выявления ДНК *C. trachomatis* используют коммерческие тест-системы ПЦР с детекцией флуоресцентного сигнала продуктов реакции в режиме реального времени.

Определение принадлежности изолята к геногруппе *C. trachomatis*

В случае обнаружения ДНК *C. trachomatis* на следующем этапе определяют принадлежность изолята возбудителя к геногруппе. Для этого осуществляют 3 параллельных ПЦР с использованием группоспецифических праймеров к участкам гена *ompA* *C. trachomatis*, представленных в таблице 1.

Таблица 1. — Группоспецифические праймеры *C. trachomatis*

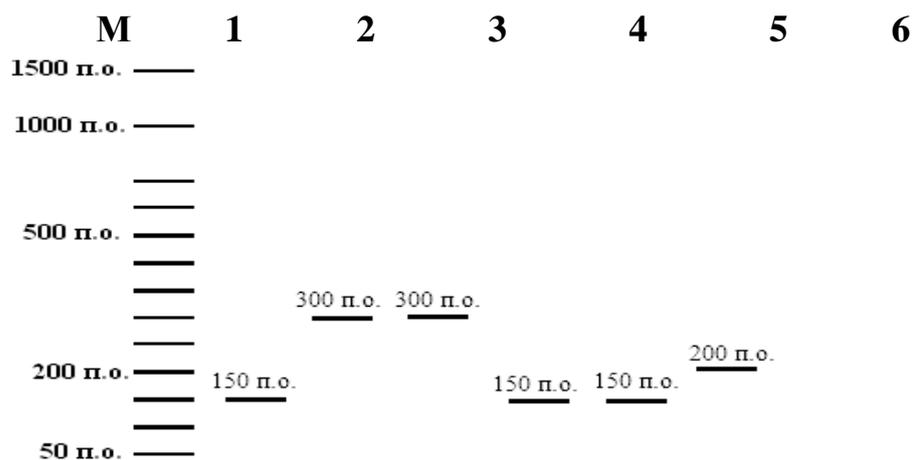
Группа	Последовательность, 5'-3'
В	F-5'-GCTTAGATCAATCTGTTGTTGA-3' R-5'-TCTAGGCTTATGGATAGTAAAC-3'
С	F-5'-AACTTAGTTGGATTATTCGGAA-3' R-5'-TCTGTATAAAGCTCAACCA-3'
Промежуточная	F- 5'-CTGTGGTGGAACTGTATACA-3' R- 5'-TGCCACTCATGGTAATCAA-3'

Объем реакционной смеси 25 мкл включает: 25 пмоль раствора прямого праймера, 25 пмоль раствора обратного праймера, 12,5 мкл готовой смеси для ПЦР, бидистиллированная вода до объема 20 мкл, 5 мкл выделенной ДНК исследуемого образца. Амплификацию осуществляют в автоматическом режиме по заданным программам, представленным в таблице 2.

Таблица 2. — Условия амплификации группоспецифических фрагментов гена *ompA* *S. trachomatis*

Группа	Условия амплификации		
	Температура	Время	Количество циклов
В	95 °С	5 мин	1
	95 °С	30 с	35
	57 °С	30 с	
	72 °С	30 с	
	72 °С	5 мин	1
С	95 °С	5 мин	1
	95 °С	30 с	35
	51 °С	30 с	
	72 °С	30 с	
	72 °С	5 мин	1
Промежуточная	95 °С	5 мин	1
	95 °С	30 с	35
	53 °С	30 с	
	72 °С	30 с	
	72 °С	5 мин	1

Продукты амплификации исследуют методом электрофореза в 1,5 % агарозном геле с последующим окрашиванием бромистым этидием (0,5 мг/мл) и детекцией в ультрафиолетовом трансиллюминаторе (312 нм). Принадлежность исследуемой пробы к группе В устанавливается в случае визуализации продукта амплификации в агарозном геле на уровне 200 п.о. маркера молекулярной массы; к группе С — на уровне 150 п.о.; к промежуточной группе — на уровне 300 п.о. (рисунок 1).



линии 1, 4, 5 — группа С; линии 2, 3 — промежуточная группа; линия 6 — группа В; М — маркер молекулярной массы (50–2500 п.о.)

Рисунок 1. — Схема учета реакции амплификации с группоспецифическими праймерами к участкам гена *ompA* *C. trachomatis*

Определение генотипа *C. trachomatis*

Установив принадлежность изолята к группе *C. trachomatis*, определяют его генотип. Для этого при помощи ПЦР осуществляют внутригрупповое типирование с использованием типоспецифических праймеров, представленных в таблице 3.

Таблица 3. — Типоспецифические праймеры *C. trachomatis*

Группа	Генотип	Последовательность, 5'-3'
В	Е	F-5'-ACACAGATACTGCCTTCTCTTG-3' R-5'-CTTGCTTGCCACTCATGGTAAT-3'
	В	F-5'-AGCCGAGACTATCTTTGATGTT-3' R-5'-TCTGCGCTAGTTTTACATCG-3'
	D/Da	F-5'-GTGCAGCTCCATCCACTCT-3' R-5'-ACGCTCCACGCAAAAGTAGT-3'
С	С	F-5'-AAGGAAGTGTGGTCTCTGCCG-3' R-5'-AATTATACAATTATAGAACC-3'
	Ј	F-5'-ATCTTTTTTCCTAACACTGCT-3' R-5'-TTTAGGTTTAGATTGAGCAT-3'
	Ja	F-5'-TACTGTCAGCGATGTAGCAG-3' R-5'-TCCCAGATATTTAATGCCAT-3'
	Н	F-5'-ATCTTCTGATTTTAATACAGC-3' R-5'-ACTTTAGGTTTAGATTGAGCA-3'
	А	F-5'-AACACAATCTTCTGGCTTTGAT-3' R-5'-TGATTCAAAGCAGTGTTAGGA-3'

Продолжение таблицы 3

	К	F–5'-TGTTCCCTAACACTGCTTTGGA-3' R–5'-AGGTTTAGATTGAGCATATTGG-3'
Промежуточная	F	F–5'-ACGAAACCTGCTGCAGATA-3' R–5'-TTGCCACTCATGGTAATCA-3'
	G	F–5'-AGTGTAGTCGCAGCTAAC-3' R–5'-ACTGTAACCTGCGTATTTG-3'

Объем реакционной смеси 25 мкл: 25 пмоль раствора прямого праймера, 25 пмоль раствора обратного праймера, 12,5 мкл готовой смеси для ПЦР, бидистиллированная вода до объема 20 мкл, 5 мкл исследуемого образца. Амплификацию осуществляют в автоматическом режиме по заданным программам, представленным в таблицах 4–6.

Таблица 4. — Условия амплификации типоспецифических фрагментов гена *otrA* *S. trachomatis*, относящихся к группе В

Группа	Генотип	Условия амплификации		
		Температура	Время	Количество циклов
В	Е	95 °С	5 мин	1
		95 °С	30 с	35
		62 °С	30 с	
		72 °С	30 с	
		72 °С	5 мин	1
	В	95 °С	5 мин	1
		95 °С	30 с	35
		61 °С	30 с	
		72 °С	30 с	
		72 °С	5 мин	1
	D/Da	95 °С	5 мин	1
		95 °С	30 с	35
		57 °С	30 с	
		72 °С	30 с	
		72 °С	5 мин	1

Таблица 5. — Условия амплификации типоспецифических фрагментов гена *otrA* *S. trachomatis*, относящихся к промежуточной группе

Группа	Генотип	Условия амплификации		
		Температура	Время	Количество циклов
Промежуточная	F	95 °С	5 мин	1
		95 °С	30 с	35
		53 °С	30 с	

Продолжение таблицы 5

		72 °С	30 с	
		72 °С	5 мин	1
	G	95 °С	5 мин	1
		95 °С	30 с	35
		53 °С	30 с	
		72 °С	30 с	
		72 °С	5 мин	1

Таблица 6. — Условия амплификации типоспецифических фрагментов гена *otrA* *C. trachomatis*, относящихся к группе С

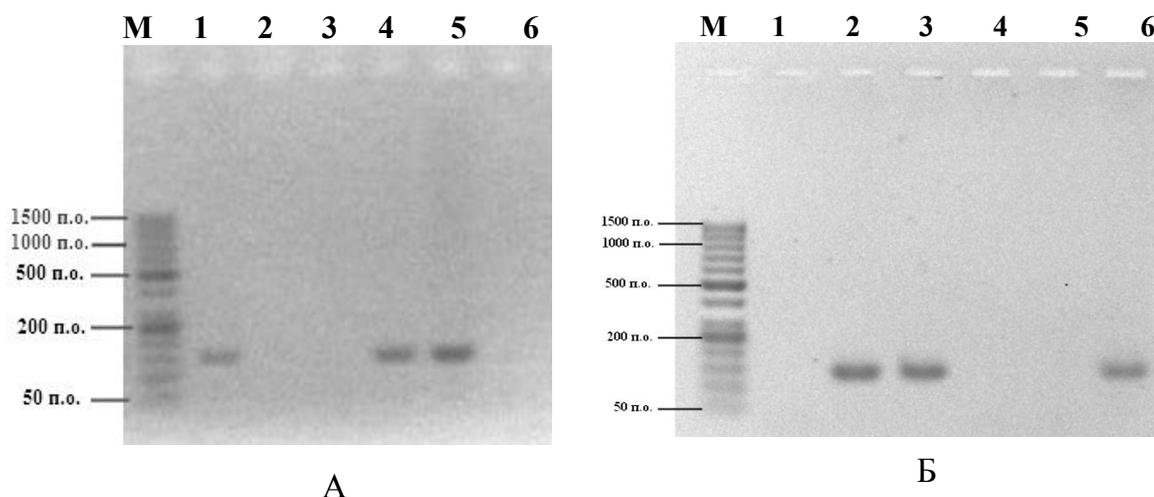
Группа	Генотип	Условия амплификации		
		Температура	Время	Количество циклов
С	С	95 °С	5 мин	1
		95 °С	30 с	35
		49 °С	30 с	
		72 °С	30 с	
		72 °С	5 мин	1
	J	95 °С	5 мин	1
		95 °С	30 с	35
		51 °С	30 с	
		72 °С	30 с	
		72 °С	5 мин	1
	Ja	95 °С	5 мин	1
		95 °С	30 с	35
		53 °С	30 с	
		72 °С	30 с	
		72 °С	5 мин	1
	H	95 °С	5 мин	1
		95 °С	30 с	35
		51 °С	30 с	
		72 °С	30 с	
		72 °С	5 мин	1
	A	95 °С	5 мин	1
		95 °С	30 с	35
		57 °С	30 с	
		72 °С	30 с	
72 °С		5 мин	1	
K	95 °С	5 мин	1	
	95 °С	30 с	35	
	57 °С	30 с		

Продолжение таблицы 6

		72 °С	30 с	
		72 °С	5 мин	1

Продукты амплификации исследуют методом электрофореза в 1,5 % агарозном геле с последующим окрашиванием бромистым этидием (0,5 мг/мл) и детекцией в ультрафиолетовом трансиллюминаторе (312 нм). Результаты интерпретируют путем соответствия размера амплифицированного фрагмента, характерного для каждого генотипа *C. trachomatis*, маркеру молекулярной массы.

Пример идентификации генотипа(ов) изолятов *C. trachomatis*, относящихся к геногруппе С, представлен на рисунке 2.



(А) линии 1, 4, 5 — генотип J (152 п.о.); (Б) линии 2, 3, 6 — генотип К (145 п.о.); М — маркер молекулярной массы (50–2500 п.о.)

Рисунок 2. — Электрофореграмма продуктов амплификации с типоспецифическими праймерами к гену *ompA* *C. trachomatis*. Во всех случаях установлен моногенотипный вариант инфицирования

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Проблема	Возможная причина	Пути устранения
Все реакции отрицательны, включая положительный контроль	Пропущен компонент реакции; использован неподходящий режим амплификации; непригоден реагент (реагенты)	Повторить процедуру амплификации с соблюдением условий и контролем реагентов. Использовать качественные, свежие реагенты, соблюдать сроки и условия хранения;

		распределять реагенты по отдельным аликвотам
Нет ампликона в положительном контроле, но реакция положительна с исследуемыми пробами	ДНК контрольного образца деградировала или не была добавлена	Использовать только свежие образцы биологического материала для выделения ДНК. Использовать пробы ДНК сразу после выделения
Ампликон в пробе отрицательного контроля	Вода или реагенты контаминированы амплифицированной ДНК	Повторить процедуру амплификации с контролем реагентов