

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель Министра –
Главный государственный
санитарный врач
Республики Беларусь

С.В. Нечай

«28» 07 2026 г.

Регистрационный № 012-1225

**МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ РЕЗИСТЕНТНОСТИ
Mycoplasma pneumoniae К МАКРОЛИДАМ**

инструкция по применению

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

АВТОРЫ: канд. мед. наук Шмелёва Н.П., канд. биол. наук Савинова О.В.,
Лапо Т.П., Аношко О.Н.

Минск, 2025

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) изложен метод определения резистентности *Mycoplasma pneumoniae* к макролидам на основе полимеразной цепной реакции (далее – ПЦР), который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на медицинскую профилактику заболеваний и патологических состояний, вызванных бактериями *Mycoplasma pneumoniae*.

Инструкция предназначена для научных работников, врачей-лаборантов и иных специалистов организаций здравоохранения, осуществляющих государственный санитарный надзор, а также врачей клинической лабораторной диагностики и иных врачей-специалистов, оказывающих медицинскую помощь пациентам с бактериальными пневмониями в стационарных и (или) амбулаторных условиях, и (или) условиях отделения дневного пребывания.

Показания к применению

1. Определение резистентности *Mycoplasma pneumoniae* к действию макролидов.
2. Инфекции верхних и нижних дыхательных путей (J15.7; J20.0), не имеющие терапевтического эффекта.

Противопоказания к применению: отсутствуют.

Перечень необходимых медицинских изделий, расходных материалов и пр.

1. Ламинарный бокс с внутренним УФ-облучателем.
2. Амплификатор с оптическим блоком, позволяющий проводить анализ кривых плавления.
3. Холодильник (от плюс 2°C до плюс 8°C) с морозильной камерой (от минус 16°C до минус 20°C).

4. Микроцентрифуга-вортекс для перемешивания и осаждения микропробирок с постоянной или регулируемой скоростью в диапазоне от 1000 до 3000 об/мин.

5. Штативы для микропробирок объемом 1,5 мл и 0,2 мл.

6. Набор электронных или механических дозаторов переменного объема от 5 мкл до 1000 мкл.

7. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с аэрозольным барьером от 5 мкл до 1000 мкл.

8. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся микропробирки объемом 1,5 мл и 0,2 мл с маркировкой «RNase-free, DNase-free».

9. Отдельный халат и одноразовые перчатки.

10. Спирт этиловый 70%.

11. Набор для выделения ДНК *Mycoplasma pneumoniae* из клинического материала.

12. Реактивы для проведения полимеразной цепной реакции: Taq-полимераза 5 ед/мкл с буфером 10ХКCl; 50 мМ MgCl₂; смесь 10 мМ дНТФ (дАТФ, дГТФ, дТТФ, дЦТФ); олигонуклеотидные последовательности; интеркалирующий краситель для ПЦР, специфичный к двухцепочечной ДНК; вода для ПЦР.

Используемые реактивы должны соответствовать техническим требованиям, предъявляемым к реагентам для проведения молекулярно-биологических исследований.

Технология использования метода

1. Выделение ДНК *Mycoplasma pneumoniae*

Материалом для исследования является ДНК *Mycoplasma pneumoniae* (далее – образец), выделенная из клинического материала (мазки из зева, мазки из носа, бронхо-альвеолярный лаваж, мокрота, промывные воды

бронхов). Выделение ДНК проводят общепринятым методом выделения нуклеиновых кислот для последующей постановки ПЦР в соответствии с инструкцией производителя. Допускается хранение выделенной ДНК при температуре от плюс 2°С до плюс 8°С в течение 1 суток, от минус 16°С до минус 20°С – до 6 месяцев, при минус 70°С – до 1 года. Многократное замораживание-оттаивание не допускается.

2. Амплификация выделенной ДНК *Mycoplasma pneumoniae*

2.1 Постановку ПЦР проводят в отдельных пробирках для позиций 2036/2064 и 2617 с парами праймеров:

F 2063/2064: 5'-GACACCCGTTAGGCGCAAC-3'

R 2063/2064: 5'-ATCAATATTAAGCTACAGTAAAGCT-3'

F 2617: 5'-CCGTCGTGAGACAGGTTGG-3'

R 2617: 5'-GAAGCAACACTCTTCAATCTTCCT-3'

2.2 В отдельной пробирке приготовить реакционную смесь для проведения (N+1) количества реакций в соответствии с таблицей 1, где N – число исследуемых образцов.

Таблица 1 – Состав реакционной смеси для постановки ПЦР с последующим анализом кривых плавления

Реагент	Концентрация исходных растворов	Объем в расчете на 1 реакцию (мкл)
ПЦР буфер KCl	10X	5
MgCl ₂	50 мМ	2
Смесь дНТФ	10 мМ	1
Прямой праймер (F)	10 пмоль/ мкл	1
Интеркалирующий краситель*	50X	1
Обратный праймер (R)	10 пмоль / мкл	1
Тақ-полимераза	5 ед/мкл	0,5
Вода для ПЦР	-	33,5
Общий объем, мкл		45

*Примечание: возможна коррекция состава реакционной смеси с учетом рекомендаций инструкции производителя.

2.3 Отобрать и промаркировать необходимое количество пробирок объемом 0,2 мл.

2.3 Внести по 45 мкл приготовленной реакционной смеси в промаркированные пробирки.

2.4 Добавить в пробирки с реакционной смесью по 5 мкл ДНК из исследуемых образцов в соответствии с маркировкой.

2.5 Пробирки закрыть, аккуратно перемешать на вортексе и осадить кратковременным центрифугированием.

2.6 Установить пробирки в ячейки реакционного блока амплификатора.

2.7 В соответствии с инструкцией к прибору запрограммировать амплификатор согласно таблице 2.

Таблица 2 – Температурно-временной режим амплификации

№ п/п	Температура, °С	Время	Измерение флуоресценции	Количество циклов
1	95	5 мин	-	1
2	95	10 с	В соответствии с типом красителя	45
	55	15 с		
	72	10 с		
3	95	30 с	-	1
4	От 55 до 95	0,5°С /5 с	В соответствии с типом красителя	1

3. Учет и интерпретация результатов

3.1 Анализ кривых плавления проводят в режиме «Melt Curve», учитывают температурные пики для каждого исследуемого образца ДНК.

3.2 Регистрируют температурные пики плавления продуктов ПЦР для позиций 2063/2064 и 2617.

3.3 Для позиций 2063/2064 возможны следующие температурные значения пиков плавления и их интерпретация:

82,5°С ± 0,5°С – образец ДНК *Mycoplasma pneumoniae* содержит замену, приводящую к устойчивости возбудителя к действию макролидов (резистентность есть);

80,0°C ± 0,5°C – образец ДНК *Mycoplasma pneumoniae* не содержит замен, приводящих к устойчивости возбудителя к действию макролидов (резистентности нет).

3.4 Для позиции 2617 возможны следующие температурные значения пиков плавления и их интерпретация:

80,0°C ± 0,5°C – образец ДНК *Mycoplasma pneumoniae* содержит замену, приводящую к устойчивости возбудителя к действию макролидов (резистентность есть);

78,0°C ± 0,5°C – образец ДНК *Mycoplasma pneumoniae* не содержит замены, приводящей к устойчивости возбудителя к действию макролидов (резистентности нет).

3.4 Наличие замены в одной из исследуемых позиций (2063/2064 или 2617) свидетельствует о резистентности *Mycoplasma pneumoniae* к действию макролидов.

4. Перечень возможных ошибок при выполнении исследования и пути их устранения

4.1 Появление нескольких пиков плавления может свидетельствовать о контаминации исследуемого образца, поверхностей ламинарного бокса или реактивов, используемых для приготовления реакционной смеси. Рекомендуется повторно провести выделение ДНК из исследуемых образцов, заменить компоненты ПЦР-смеси на новые и повторить исследование после проведения обработки рабочих поверхностей ламинарного бокса средствами, оказывающими разрушающее действие на нуклеиновые кислоты.

4.2 Очень широкий или размазанный пик может свидетельствовать о деградации праймеров или матрицы, неисправности термоблока прибора. Следует убедиться в правильности условий хранения реагентов, при необходимости провести калибровку прибора.

4.3 Полное отсутствие пика плавления может свидетельствовать об отсутствии или деградация матричной ДНК, ошибках при приготовлении реакционной смеси. Рекомендовано повторно провести исследование образца, начиная с этапа выделения ДНК.

Использование метода на основе ПЦР предполагает следование правилам организации и проведения исследований в ПЦР-лаборатории.

Для снижения риска контаминации продуктами ПЦР лабораторной зоны, оборудования и реагентов при утилизации пробирок, содержащих продукты ПЦР, запрещается открывание пробирок и разбрызгивание содержимого.

При каждой постановке реакции следует использовать отрицательный контрольный образец для подтверждения отсутствия контаминации реактивов или расходных материалов, в качестве которого может выступать вода для ПЦР, TE-буфер.