

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель Министра
И.Г.Лосицкий
_____ 2018 г.
Регистрационный № 034-0418



**МЕТОД ВЫЯВЛЕНИЯ УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫХ
МИКРООРГАНИЗМОВ СЕМЕЙСТВА *ENTEROBACTERIACEAE*,
РОДОВ *STREPTOCOCCUS*, *STAPHYLOCOCCUS*, *ENTEROCOCCUS*,
PSEUDOMONAS И ИХ ПОВИДОВАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ**
инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: Государственное учреждение
образования «Белорусская медицинская академия последипломного
образования»

АВТОРЫ: д-р.мед.наук, доцент Костюк С.А., Полуян О.С., канд. биол.
наук Руденкова Т.В., Глинкина Т.В.

Минск, 2018

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель министра

_____ И. Г. Лосяцкий
27.04.2018
Регистрационный № 034-0418

**МЕТОД ВЫЯВЛЕНИЯ УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫХ
МИКРООРГАНИЗМОВ СЕМЕЙСТВА *ENTEROBACTERIACEAE*, РОДОВ
STREPTOCOCCUS, *STAPHYLOCOCCUS*, *ENTEROCOCCUS*, *PSEUDOMONAS*
И ИХ ПОВИДОВАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: ГУО «Белорусская медицинская академия
последипломного образования»

АВТОРЫ: д-р мед. наук, доц. С. А. Костюк, О. С. Полуян, канд. биол. наук
Т. В. Руденкова, Т. В. Глинкина

Минск 2018

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен метод определения возбудителей семейства *Enterobacteriaceae*, родов *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Pseudomonas* и их повидовая диагностика с использованием метода полимеразной цепной реакции (ПЦР). Предложенный метод может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на диагностику заболеваний, вызванных условно-патогенными возбудителями.

Инструкция предназначена для врачей лабораторной диагностики, врачей-бактериологов, врачей-акушеров-гинекологов, врачей-урологов, врачей-дерматовенерологов и иных врачей организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам с заболеваниями, вызванными условно-патогенными возбудителями, в стационарных и (или) амбулаторных условиях.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

Набор реагентов для выделения ДНК из биологического материала. Амплификатор, высокоскоростная центрифуга, олигонуклеотидные праймеры.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

N30 Цистит.

N34 Уретрит и уретральный синдром.

N41 Воспалительные болезни предстательной железы.

N45 Орхит и эпидидимит.

N76 Другие воспалительные болезни влагалища и вульвы.

N76.0 Острый вагинит.

N76.1 Подострый и хронический вагинит.

N76.2 Острый вульвит.

N76.3 Подострый и хронический вульвит.

N76.4 Абсцесс вульвы.

N76.5 Изъязвление влагалища.

N76.6 Изъязвление вульвы.

T76.8 Другие уточненные воспалительные болезни влагалища и вульвы.

B95 Стрепто- и стафилококки как причина болезней, классифицированных в других рубриках.

B96 Другие уточненные бактериальные агенты как причина болезней, классифицированных в других рубриках.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Этап I. Получение биологического материала

В качестве биологического материала используется соскоб эпителиальных клеток из уrogenитального тракта.

Взятие биологического материала производится в соответствии с инструкцией по применению «Метод определения профиля серотипа и уровня

нормализованной экспрессии гена *St604* белка теплового шока *Chlamydia trachomatis*», утвержденной Министерством здравоохранения Республики Беларусь от 01.12.2017 (регистрационный № 100-1117).

Этап II. Аналитический

Для качественного выявления ДНК возбудителей семейства *Enterobacteriaceae*, родов *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Pseudomonas* используют молекулярно-генетический анализ (ПЦР) в режиме реального времени с последующим изучением кривых накопления флуоресцентного сигнала.

Состав амплификационной смеси:

5 мкл выделенной ДНК.

1 мкл специфического прямого праймера.

1 мкл специфического обратного праймера.

10 мкл 50X SYBR Green I.

10 мкл мастер-микс для ПЦР.

Нуклеотидные последовательности праймеров:

EB – f – CATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGC (прямой праймер)

EB – r – CTCTACGAGACTCAAGCTTGC (обратный праймер)

St spp – f – AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC (прямой праймер)

St spp – r – AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC (обратный праймер)

Str spp – f – AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC (прямой праймер)

Str spp – r – AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC (обратный праймер)

Ent spp – f – ATTТААСССАТГТТАГАТГС (прямой праймер)

Ent spp – r – CGTCCSTTTCTGGTAAAGT (обратный праймер)

P spp – f – CCACAAGCCCGGCCAGGAGC (прямой праймер)

P spp – r – GAGAAGAGCGGGTCGATGAAGCC (обратный праймер)

Амплификация выполняется по следующей программе:

50 °C – 3 мин

95 °C – 3 мин

95 °C – 40 с

56 °C – 30 с

72 °C – 30 с

72 °C – 10 с

72-97 °C – 5 с плавление с шагом 1 °C

} 35 циклов

Детекцию флуоресценции производят по каналу FAM/Green. При анализе кривых плавления в случае выявления в образце ДНК возбудителей семейства *Enterobacteriaceae* и/или родов *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Pseudomonas* наблюдается один пик (соответствующий плавлению специфического продукта) при температуре 82 °C. Отрицательные в отношении указанных возбудителей пробы имеют слабые, затухающие стохастические колебания во всем диапазоне температур.

Этап III. Дифференциально-диагностический

При выявлении ДНК возбудителей семейства *Enterobacteriaceae* применяют метод ПЦР для повидовой диагностики представителей семейства

Enterobacteriaceae: Escherichia coli, Enterobacter species, Klebsiella species, Serratia species., Proteus species.

При выявлении ДНК возбудителей рода *Streptococcus* используют ПЦР для повидовой диагностики представителей рода *Streptococcus: Streptococcus pyogenes, Streptococcus pneumoniae, Streptococcus agalactiae.*

При выявлении ДНК возбудителей рода *Staphylococcus* проводят ПЦР для повидовой диагностики представителей рода *Staphylococcus: Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis.*

При выявлении ДНК возбудителей рода *Enterococcus* применяют ПЦР для повидовой диагностики представителей рода *Enterococcus: Enterococcus faecalis, Enterococcus faecium.*

При выявлении ДНК возбудителей рода *Pseudomonas* проводят ПЦР для повидовой диагностики представителей рода *Pseudomonas: Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas sepaia.*

Состав амплификационной смеси:

5 мкл выделенной ДНК.

1 мкл специфического прямого праймера.

1 мкл специфического обратного праймера.

10 мкл 50X SYBR Green I.

10 мкл мастер-микс для ПЦР.

Нуклеотидные последовательности праймеров:

Ecol – f – TATTCGCGATGCTTGTTTTT (прямой праймер)

Ecol – r – ATTATCTCACCAGCAAACCTGGCGG (обратный праймер)

Entb – f – GGTGAAGGATTTAACCGTGAACCTT (прямой праймер)

Entb – r – GCGCCTCGTTATCATCCAAA (обратный праймер)

Klebs – f – GTAATAAGCGTCTGGTGAGCCAGAAAACGCTC (прямой праймер)

Klebs – r – TCACTTACGGTGAFFTARACCACTATAAGCTTCG (обратный праймер)

Serr – f – ATAATCTGGAAGATGACGAG (прямой праймер)

Serr – r – ATAATCTGGAAGATGACGAG (обратный праймер)

Prot – f – GGTGAGATTTGTATTAATGG (прямой праймер)

Prot – r – ATAATCTGGAAGATGACGAG (обратный праймер)

Strpyog – f – GCACTCGCTACTATTTCTTACCTCAA (прямой праймер)

Strpyog – r – GTCACAATGTCTTGGAAACCAGTAAT (обратный праймер)

Strpn – f – ACGCAATCTAGCAGATGAAGCA (прямой праймер)

Strpn – r – TCGTGCGTTTTAATTCAGCT (обратный праймер)

Strag – f – GGGAACAGATTATGAAAAACCG (прямой праймер)

Strag – r – AAGGCTTCTACACGACTACCAA (обратный праймер)

Staur – f – CACGACATCATTGATAAATCFCTTGAAATGTTG (прямой праймер)

Staur – r – TCACCTGGGATATCAAAGTCCGTTACATGTTGT (обратный праймер)

Staer – f – CCTATAAGACTGGGATAACTTCGGG (прямой праймер)

Staer – r – CTTTGAGTTTCAACCTTGCGGTTCG (обратный праймер)

Entfs– f – CGCTTCTTTCCCTCCCGAGT (прямой праймер)
Entfs– r – GCCATGCGGCATAAACTG (обратный праймер)
Entfm– f – TCAAACSTATCCGACTTGCTTCCAGTTATGCCTT (прямой праймер)
Entfm– r – AATTGCCAAGCAGCTCCTTGTTGACCTGTATA (обратный праймер)
Psaer – f – CATCAGGCTCTTGATCAGCAACGGATACTGATA (прямой праймер)
Psaer – r – GCAAATCACTCTTTTGACTGATGAACAAAGCCC (обратный праймер)
Pssep – f – CCATGAACGTCTGACTAGCTCTT (прямой праймер)
Pssep – r – GTCATCCGTAGACGATGTC (обратный праймер)

Аmplификация выполняется по следующей программе:

50 °C – 3 мин

95 °C – 3 мин

95 °C – 40 с

56 °C – 30 с

72 °C – 30 с

72 °C – 10 с

72-97 °C – 5 с плавление с шагом 1 °C

} 35 циклов

Детекцию флуоресценции производят по каналу FAM/Green.

Наличие (или отсутствие) пересечения кривых флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией определяет наличие (или отсутствие) возбудителей представителей семейства *Enterobacteriaceae* (*Escherichia coli*, *Enterobacter spp.*, *Klebsiella spp.*, *Serratia spp.*, *Proteus spp.*), родов *Streptococcus* (*Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae*), *Staphylococcus* (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*), *Enterococcus* (*Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*), *Pseudomonas* (*Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas septicola*).

Этап IV. Принятие управленческого решения

При анализе кривых плавления для повидовой диагностики представителей семейства *Enterobacteriaceae* (*Escherichia coli*, *Enterobacter spp.*, *Klebsiella spp.*, *Serratia spp.*, *Proteus spp.*), а также родов *Streptococcus* (*Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae*), *Staphylococcus* (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*), *Enterococcus* (*Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*), *Pseudomonas* (*Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas septicola*) в случае выявления пика при температуре 82 °C, соответствующего плавлению специфического продукта амплификации, делают заключение о наличии в исследуемом образце ДНК указанных микроорганизмов. Наличие в исследуемом образце затухающих стохастических колебаний во всем диапазоне температур свидетельствует об отсутствии в исследуемом образце ДНК указанных микроорганизмов.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Возможные ошибки могут быть связаны с неправильной интерпретацией данных лабораторных исследований, а также нарушением требований этапов хранения и транспортировки биологического материала.