

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель Министра

И.Г.Лосицкий

« 27 » июля 20 18 г.

Регистрационный № 035-0418



**МЕТОД ВЫЯВЛЕНИЯ ГЕНОВ, ОТВЕЧАЮЩИХ ЗА  
РЕЗИСТЕНТНОСТЬ К АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМ  
ЛЕКАРСТВЕННЫМ СРЕДСТВАМ**

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. Лосицкий  
27.04.2018  
Регистрационный № 035-0418

**МЕТОД ВЫЯВЛЕНИЯ ГЕНОВ, ОТВЕЧАЮЩИХ  
ЗА РЕЗИСТЕНТНОСТЬ К АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМ  
ЛЕКАРСТВЕННЫМ СРЕДСТВАМ**

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 генетических маркеров резистентности к антибактериальным лекарственным средствам групп тетрациклинов, макролидов, фторхинолонов, β-лактамов и метронидазолов с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР), который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на лечение заболеваний, вызванных соответствующими микроорганизмами.

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**

Бактериальные, вирусные и другие инфекционные агенты (B95-B98).

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

B95.0 Стрептококки группы А как причина болезней, классифицированных в других рубриках.

B95.1 Стрептококки группы В как причина болезней, классифицированных в других рубриках.

B95.2 Стрептококки группы D и энтерококки как причина болезней, классифицированных в других рубриках.

B95.3 *Streptococcus pneumoniae* как причина болезней, классифицированных в других рубриках.

B95.4 Другие стрептококки как причина болезней, классифицированных в других рубриках.

B95.5 Неуточненные стрептококки как причина болезней, классифицированных в других рубриках.

B95.6 *Staphylococcus aureus* как причина болезней, классифицированных в других рубриках.

B95.7 Другие стафилококки как причина болезней, классифицированных в других рубриках.

B95.8 Неуточненные стафилококки как причина болезней, классифицированных в других рубриках.

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

B96.0 *Mycoplasma pneumoniae* как причина болезней, классифицированных в других рубриках.

В96.1 *Klebsiella pneumoniae* как причина болезней, классифицированных в других рубриках.

В96.2 *Escherichia coli* как причина болезней, классифицированных в других рубриках.

В96.3 *Haemophilus influenzae* как причина болезней, классифицированных в других рубриках.

В96.4 *Proteus (mirabilis) (morganii)* как причина болезней, классифицированных в других рубриках.

В96.5 *Pseudomonas (aeruginosa)* как причина болезней, классифицированных в других рубриках.

В96.6 *Bacillus fragilis* как причина болезней, классифицированных в других рубриках.

В96.7 *Clostridium perfringens* как причина болезней, классифицированных в других рубриках.

В96.8 Другие уточненные бактериальные агенты как причина болезней, классифицированных в других рубриках.

В98 Другие уточненные инфекционные агенты как причина болезней, классифицированных в других рубриках.

## **ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ**

Отсутствуют.

## **ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА**

### *Этап I. Диагностический*

Для выявления ДНК микроорганизмов в исследуемом биологическом материале применяется метод ПЦР с использованием зарегистрированных на территории Республики Беларусь тест-систем в соответствии с инструкцией производителя.

В случае обнаружения в исследуемом биологическом материале ДНК микроорганизмов определяют наличие генов устойчивости выявленной патогенной флоры к антибактериальным лекарственным средствам.

### *Этап II. Аналитический*

Для выявления генов, отвечающих за резистентность обнаруженных микроорганизмов к антибактериальным лекарственным средствам (тетрациклины, макролиды, фторхинолоны,  $\beta$ -лактамы, метронидазол), 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.

1 мкл TaqMan-зонда.

1 мкл специфического (однокопийный ген человека HPRT1) прямого праймера.

1 мкл специфического (однокопийный ген человека HPRT1) обратного праймера.

1 мкл TaqMan-зонда (однокопийный ген человека HPRT1).

14 мкл мастер-микс для Taq-ПЦР.

Нуклеотидные последовательности праймеров и зондов:

tet –f – ААТТАСТГТТССГГСТТА (прямой праймер)

tet –r – GCTTGTATGCCTTCCTTTGC (обратный праймер)

tet –p – АТСТАТТАТСТГГААТГГАГТГАААТГСАА (TaqMan-зонд)

erm – f – TCAGTTACTGCTATAGAAATTGATGGAG (прямой праймер)

erm – r – АТАСАГАГТСТАСАСТТГГСТТАГГ (обратный праймер)

erm – p – АГТГАСТАААГААГССГТАААССССТСТГА (TaqMan-зонд)

qnr –f – TCGCCGGGTGCTСТАТГСААТ (прямой праймер)

qnr –r – СГГГСТТССГТГТАССТСАТС (обратный праймер)

qnr – p – GTCGТАГАТССАССГТСС (TaqMan-зонд)

bla –f – СААССТССГТССГГААССАТ (прямой праймер)

bla –r – АССАССГААССАССАТТТ (обратный праймер)

bla – p – ТТТСТТГСТСССГТСТГСТГГ (TaqMan-зонд)

nim –f – АТГТТСАГАААТГССГССГААССГ (прямой праймер)

nim –r – GCTTCCTTGCCTGTCATGTGCTC (обратный праймер)

nim – p – TGGACTAAAGCAACGAGAGAGGTGGATC (TaqMan-зонд)

HPRT1 – f – АГССГТААССАТГССАТТТ (прямой праймер)

HPRT1 – r – САСАТГТГААТТТССГСТТГ (обратный праймер)

HPRT1 – p – ROX-GAAGGAАСТАГССГААААССА (TaqMan-зонд)

Амплификация выполняется по следующей программе:

95 °С – 5 мин – 1 цикл

95 °С – 20 с	} 40 циклов
60 °С – 20 с	
72 °С – 25 с	

Детекцию флуоресценции производят последовательно по следующим каналам: FAM/Green — для генов резистентности к антибактериальным лекарственным средствам; ROX/Orange — для house-keeping гена HPRT1. Наличие (или отсутствие) пересечения кривых флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией определяет наличие (или отсутствие) одного (или нескольких) указанных генов резистентности.

### *Этап III. Принятие управленческого решения*

При пересечении кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией по каналу для *tet*-гена делают заключение о наличии у выявленных возбудителей устойчивости к антибактериальным лекарственным средствам группы тетрациклинов. При пересечении кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией по каналу для *erm*-гена делают заключение о наличии у возбудителей устойчивости к антибактериальным лекарственным средствам группы макролидов. При пересечении кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией по каналу для *qnr*-гена делают

заключение о наличии у возбудителей устойчивости к антибактериальным лекарственным средствам группы фторхинолонов. При пересечении кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией по каналу для *bla*-гена делают заключение о наличии у возбудителей устойчивости к антибактериальным лекарственным средствам группы  $\beta$ -лактамов. Пересечение кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией по каналу для *nit*-гена свидетельствует о наличии у возбудителей устойчивости к антибактериальным лекарственным средствам группы метронидазолов.

### **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.