

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ



Заместитель Министра –
Главный государственный
санитарный врач Республики Беларусь

А.А. Тарасенко

06 2022 г.

Регистрационный № 035-0422

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЕНОВ СЕРИНОВЫХ КАРБАПЕНЕМАЗ

инструкция по применению

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

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

Минск, 2022

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель Министра –
Главный государственный
санитарный врач Республики Беларусь
_____ А.А. Тарасенко
10.06.2022
Регистрационный №035-0422

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЕНОВ СЕРИНОВЫХ КАРБАПЕНЕМАЗ

инструкция по применению

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

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

Минск, 2022

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) изложен метод определения генов сериновых карбапенемаз с помощью ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени», который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на определение антибиотикорезистентности (к карбапенемам) у бактерий, вызвавших развитие инфекционного процесса.

Инструкция предназначена для врачей лабораторной диагностики, врачей-эпидемиологов, врачей-инфекционистов при назначении антибиотиков группы карбапенемов.

1. Показания к применению

Инфекционные заболевания, вызванные грамотрицательными бактериями с множественной резистентностью к антибиотикам (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *Acinetobacter spp.* и др.).

2. Противопоказания к применению: отсутствуют.

3. Перечень необходимых изделий медицинской изделий, расходных материалов и др.

ПЦР-бокс

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

Микроцентрифуга-вортекс

Термоциклер для проведения ПЦР в режиме реального времени

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

Холодильник, диапазон рабочих температур от +2 до +4°C

Морозильная камера, диапазон рабочих температур от -16 до -18°C

Бактерицидная УФ-лампа

10x ПЦР-буферный раствор

Тaq-полимераза 5 ед/мкл

Хлорид магния 50 mM

Смесь дНТФ 10 мМ

Олигонуклеотидные праймеры 10 пМ/мкл

Флуоресцентно-меченые зонды 10 пМ/мкл

Вода стерильная бидистиллированная свободная от нуклеаз

Пробирки пластиковые типа «Эппендорф» (0,5 мл и 1,5 мл)

Наконечники полимерные с фильтром объемом 10, 200, 1000 мкл

Халаты

Резиновые перчатки

Штативы для пробирок.

Качество используемых реактивов должно соответствовать техническим требованиям, предъявляемым к реагентам для проведения молекулярно-биологических исследований.

4. Технология осуществления метода

1) Материалом для исследования являются пробы ДНК, полученные из образцов чистой бактериальной культуры, общепринятым методом.

2) Приготовление реакционной смеси

Перед приготовлением смеси необходимо перемешать на вортексе и центрифугировать все используемые реактивы.

Рассчитать количество каждого реагента, требующееся для приготовления реакционной смеси используя таблицу 1. В отдельной пробирке подготовить реакционную смесь.

Отобрать необходимое количество пробирок для амплификации исследуемых и контрольных проб. Для каждого детектируемого гена готовится отдельная реакционная смесь с соответствующими праймерами и зондами (таблица 2).

Приготовленную реакционную смесь разлить в пробирки по 15 мкл. Добавить по 5 мкл ДНК-образца, положительного и отрицательного контроля в соответствующие пробирки.

Таблица 1 - Реакционная смесь для проведения ПЦР

Реагенты	Объём на одну реакцию (мкл)	Объём на N реакций (мкл)
ПЦР-буферный раствор	2	2*(N+ПК+ОК)
MgCl ₂	1	1*(N+ПК+ОК)
дНТФ	0,4	0,4*(N+ПК+ОК)
Тақ-полимераза	0,18	0,18*(N+ПК+ОК)
Праймер прямой	1	1*(N+ПК+ОК)
Праймер обратный	1	1*(N+ПК+ОК)
Меченный зонд	1	1*(N+ПК+ОК)
Вода	8,42	8,42*(N+ПК+ОК)

где, N- количество проб

ПК – положительный контроль

ОК – отрицательный контроль

Таблица 2 – Последовательность праймеров для детекции генов сериновых карбапенемаз

Мишень	Последовательность, 5' - 3'
КРС	F – 5' - CCTTCATGCGCTCTATCG - 3' R – 5' - TTTGTAAGCTTTCCGTCACG - 3' FAM-CGCCATCCCAGGCGATGCGGCG -BHQ1
ОХА-48 родственные гены	5'-СТТАААСГГГСГААССААГС-3' 5'-ГТТКАТССТТААССАСГССС-3' FAM-ТТССААТАГСТТГАТСГСССТСГАТТ-ВНҚ1
ОХА23 родственные гены	5'-ССТСАГГТГТГСТГГТТАТТСА-3' 5'-СТССААТССГАТСАГГГСАТ-3' FAM-ССГСГАААТАСАГААТАТГТГССАГСС-ВНҚ1
ОХА24/40 родственные гены	5'-ССАГАААГААГТАААГСГГГТТА-3' 5'-АГГТААТСГГТТАТГТГАААГГТ-3' JOE-АГГТСГАТААТТТТГГТТАГТТГГССССС-ВНҚ1

3) Проведение амплификации с детекцией в режиме реального времени

Запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» для выполнения программы и регистрации флуоресцентного сигнала по условиям, представленным в таблице 3.

Таблица 3 – Условия амплификации для детекции генов сериновых карбапенемаз

Ген	Шаг	Температура	Время
КРС	денатурация 40 циклов	95°C	2 мин.
		95°C	15 сек.
		58°C	30 сек.
		72°C	15 сек.
	элонгация	72°C	1 мин.
ОХА-48 родственные гены	денатурация 40 циклов	95°C	10
		95°C	мин.
		52°C	5 сек.
		72°C	20 сек. 1 мин.
ОХА23-, ОХА24/40- родственные гены	денатурация 40 циклов	95°C	5 мин.
		94°C	15 сек.
		60 °C	15 сек.

5. Анализ и интерпретация результатов

Анализ результатов проводят с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». Анализируют графики накопления флуоресцентного сигнала по следующим каналам:

- по каналу для флуорофора FAM регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагментов генов карбапенемаз группы КРС, ОХА-48, ОХА-23.

- по каналу для флуорофора JOE регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагментов генов карбапенемаз группы ОХА-24/40.

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с пороговой линией, установленной на уровне экспоненциального подъема сигнала, что определяет значения порогового цикла C_t для каждой пробы.

Образец считается положительным, если сигнал продуцируется на соответствующем канале и значение C_t ниже 35.

Образец считается отрицательным, если для данной пробы значение порогового цикла C_t более 35 или кривая флуоресценции не пересекает пороговую линию.

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

6. Перечень ошибок при выполнении 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.

7. Контроль клинической эффективности метода

Не требуется.