

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель Министра

здравоохранения –

Главный государственный

санитарный врач

Республики Беларусь



С.В. Нечай

«09» 2026 г.

Регистрационный № 037-1224

МЕТОД МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ СЕМЕЙСТВА *CHLAMYDIACEAE*

инструкция по применению

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

АВТОРЫ: д-р мед. наук, профессор Полещук Н.Н., канд. биол. наук
Асташонок А.Н., канд. мед. наук Шмелева Н.П., Сивец Н.В.,
Виноградова А.В., Аношко О.Н., Лапо Т.П.

Минск, 2024

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) изложен метод молекулярно-генетической идентификации микроорганизмов семейства *Chlamydiaceae*, который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на медицинскую профилактику заболеваний, вызванных данными возбудителями.

Метод, изложенный в настоящей инструкции, предназначен для врачей-лаборантов, врачей клинической лабораторной диагностики и иных врачей-специалистов организаций здравоохранения III-IV уровня, а также для учреждений, осуществляющих государственный санитарный надзор и др.

Показания к применению

1. Пневмония, вызванная другими инфекционными возбудителями, не классифицированная в других рубриках (J16).
2. Острый бронхолит неуточненный (J21.9).
3. Бронхопневмония неуточненная (J18.0).

Противопоказания для применения: отсутствуют.

Перечень необходимых изделий медицинской техники, изделий медицинского назначения, реактивов

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. Термостат твердотельный с диапазоном рабочих температур от плюс 10°C до плюс 100°C.
6. Штативы для микропробирок объемом 0,2 мл и 1,5 мл.
7. Набор электронных или механических дозаторов переменного объема от 5 мкл до 1000 мкл.
8. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с аэрозольным барьером от 5 мкл до 1000 мкл.
9. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся микропробирки объемом 0,2 мл и 1,5 мл.
10. Транспортная среда с муколитиком.
11. Спирт этиловый 70%.
12. Набор для выделения ДНК из клинического материала.
13. Реактивы для проведения полимеразной цепной реакции: (Taq-полимераза 5 ед/мкл с буфером 10X KCl; 4 mM MgCl₂; смесь 10 mM дНТФ (дАТФ, дГТФ, дТТФ, дЦТФ); олигонуклеотидные последовательности и зонды; интеркалирующий краситель для ПЦР, специфичный к двухцепочечной ДНК; вода для ПЦР).

Технология использования метода

1. Выделение ДНК из биологического материала

В качестве биологического материала используют: мазки из носа, мокроту, бронхоальвеолярный лаваж. Выделение тотальной ДНК проводят с использованием наборов, зарегистрированных в Республике Беларусь в установленном порядке. Допускается хранение ДНК при температуре от плюс 2°C до плюс 8°C в течение 1 суток, от минус 16°C до минус 20°C – до 6 месяцев, при минус 70°C – до 1 года. Многократное замораживание-оттаивание не допускается.

2. Амплификация ДНК для детекции микроорганизмов семейства *Chlamydiaceae*

2.1 Постановку ПЦР проводят в пробирках с парами праймеров и специфическим зондом:

panChl6F: 5'-CCGCCAACAACCTGGGACT-3'

panChl6R: 5'-GGAGTTAGCCGGTGCTTCTTTAC-3'

panCh16S: 5'-FAM-CTACGGGAGGCTGCAGTCGAGAATC-BHQ1-3'

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	2,5
MgCl ₂	2,5 мМ	1,25
Смесь дНТФ	10 мМ	0,5
Прямой праймер (F)	10 мкМ	0,35
Обратный праймер (R)	10 мкМ	0,39
Зонд	15 мкМ	0,77
Тақ-полимераза	5 ед/мкл	0,2
Вода для ПЦР	-	14,04
Общий объем, мкл	30	

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

2.4 Внести приготовленную реакционную смесь в промаркированные пробирки.

2.5 Добавить в пробирки с реакционной смесью по 10 мкл ДНК из исследуемых образцов в соответствии с маркировкой.

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

2.7 Установить пробирки в ячейки блока амплификатора.

2.8 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	3 мин	-	1
2	95	15 с	В соответствии с типом красителя	50
	95	15 с		
3	95	15 с		

2.8 Для определения значения порогового цикла амплификации (Ct) пороговую линию установить на уровне, соответствующем 10-20% от максимального уровня флуоресценции.

3. Амплификация ДНК для идентификации хламидияподобных микроорганизмов (*S. negevensis*, *W. chondrophila*, *P. acanthamoebae*)

3.1 Для идентификации микроорганизмов семейства *Chlamydiaceae* проводят ПЦР с парами праймеров и зондами согласно таблице 3.

Таблица 3 – Последовательность праймеров и зонды для амплификации ДНК хламидияподобных микроорганизмов

Микроорганизм	Последовательность праймеров и зонд (5'-3')
<i>S. negevensis</i>	SimkF: 5'-GAGAGCTGGGGTAGCCTGGT-3' SimkR: 5'-TTAGCCTTGGTGC GCCTTTA-3' 5'-FAM-TGCGGTAGGAGAGAGGCTCATG-BHQ1-3'
<i>W. chondrophila</i>	WHF: 5'-GAACGAAGTGTGCTCTTGAGT-3' WHR: 5'-CCTCTCTAGCACCATATCCG-3' 5'-FAM-CTACCTTTAACTCTGGGATAACGGTTGG BHQ1-3'
<i>P. acanthamoebae</i>	PacF: 5'-CTCAACTCCAGAACAGCATTT-3' PacR: 5'-CTCAGCGTCAGGAATAAGC-3' 5'-HEX-TTCCACATGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATG-BHQ1-3'

3.2. Для идентификации *S. negevensis* приготовить реакционную смесь согласно таблице 4.

Таблица 4 – Состав реакционной смеси и программа для амплификации *S. negevensis*

Реагент	Концентрация исходных растворов	Объем в расчете на 1 реакцию (мкл)		
ПЦР буфер KCl	10X	2,5		
MgCl ₂	4 мМ	2		
Смесь дНТФ	10 мМ	0,5		
Прямой праймер (F)	10 мкМ	0,1		
Обратный праймер (R)	10 мкМ	0,1		
Зонд	15 мкМ	0,1		
Тaq-полимераза	5 ед/мкл	0,2		
Вода для ПЦР	-	14,5		
ДНК		5		
Общий объем, мкл	30			
Температурно-временной режим				
№ п/п	Температура, °С	Время	Измерение флуоресценции	Количество циклов
1	95	3 мин	-	1
2	95	15 с	В соответствии с типом красителя	40
	60	15 с		
3	72	15 с		

3.3. Для идентификации *W. chondrophila* приготовить реакционную смесь согласно таблице 5.

Таблица 5 – Состав реакционной смеси и программа для амплификации ДНК *W. chondrophila*

Реагент	Концентрация исходных растворов	Объем в расчете на 1 реакцию (мкл)		
ПЦР буфер KCl	10X	2,5		
MgCl ₂	4 мМ	1,5		
Смесь дНТФ	10 мМ	0,5		
Прямой праймер (F)	15 мкМ	0,4		
Обратный праймер (R)	15 мкМ	0,4		
Зонд	10 мкМ	0,1		
Тaq-полимераза	5 ед/мкл	0,3		
Вода для ПЦР	-	13,7		
ДНК		5		
Общий объем, мкл	30			
Температурно-временной режим				
№ п/п	Температура, °С	Время	Измерение флуоресценции	Количество циклов
1	95	2 мин	-	1
2	95	15 с	В соответствии с типом красителя	40
	60	1 мин		
3	72	45 с		

3.4. Для идентификации *P. acanthamoebae* приготовить реакционную смесь согласно таблице 6.

Таблица 6 – Состав реакционной смеси и программа для амплификации ДНК *P. acanthamoebae*

Реагент	Концентрация исходных растворов	Объем в расчете на 1 реакцию (мкл)		
ПЦР буфер KCl	10X	2,5		
MgCl ₂	2,5 мМ	1,25		
Смесь дНТФ	10 мМ	0,5		
Прямой праймер (F)	15 мкМ	0,2		
Обратный праймер (R)	15 мкМ	0,2		
Зонд	10 мкМ	0,2		
Taq-полимераза	5 ед/мкл	0,2		
Вода для ПЦР	-	14,9		
ДНК		5		
Общий объем, мкл	30			
Температурно-временной режим				
№ п/п	Температура, °С	Время	Измерение флуоресценции	Количество циклов
1	95	3 мин	-	1
2	95	15 с	В соответствии с типом красителя	40
	52	15 с		
3	72	15 с		

4. Учет и интерпретация результатов

4.1 Учет реакции амплификации гена 16S РНК микроорганизмов семейства *Chlamydiaceae* провести по каналу для флуорофоров FAM/Green.

4.2 Результат амплификации считается «Положительным» (т.е. ДНК микроорганизмов семейства *Chlamydiaceae* присутствует в анализируемом образце), если кривая флуоресценции имеет S-образную форму, а значение порогового цикла амплификации C_t составляет не менее 35-38.

4.3 Результат амплификации считается «Отрицательным» (т.е. ДНК микроорганизмов семейства *Chlamydiaceae* отсутствует в анализируемом образце), если сигнал флуоресценции слабый, а значение порогового цикла амплификации C_t неопределенное или менее 35.

4.4 При «Положительном» результате амплификации далее выполнить идентификацию хламидияподобных микроорганизмов согласно пункту 3.

4.5 Учет реакции амплификации для идентификации *S. negevensis*, *W. chondrophila* провести по каналу для флуорофоров FAM/Green, для *P. acanthamoebae* – по каналу для флуорофоров HEX.

5. Перечень возможных ошибок при выполнении и пути их устранения

Проблемы	Возможные причины	Способы решения
1	2	3
Кривая флуоресценции в клинических образцах пересекает пороговое значение, но не имеет типичной S-образной формы	Наличие примесей в клинических образцах	Провести повторное выделение ДНК из клинических образцов
В положительном контроле значение порогового цикла Ct отсутствует или превышает граничное значение, но реакция положительна с исследуемыми пробами	ДНК контрольных образцов деградировала или не была добавлена	Повторить амплификацию для всех отрицательных клинических образцов с использованием нового положительного контроля
В пробе отрицательного контроля по любому из каналов FAM, HEX зафиксировано значение порогового цикла Ct	загрязнение отрицательного контроля	Повторить исследование для всех положительных образцов с использованием нового отрицательного контроля