

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель Министра —

Главный государственный санитарный
врач Республики Беларусь

А.А. Тарасенко



08

2022 г.

Регистрационный № 049-0622

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ
Mycobacterium tuberculosis
ПОДТИПА В0/W148 ГЕНОТИПА *BEIJING*
инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: ГУ «Республиканский научно-практический центр пульмонологии и фтизиатрии»

АВТОРЫ: канд.мед. наук, доцент Слизень В.В., д-р мед. наук, профессор Суркова Л.К., чл.-корр. НАН Беларуси, д-р. мед. наук, профессор, Гуревич Г.Л., д-р. мед. наук, доцент Скрягина Е.М.

Минск 2022

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель министра —
Главный государственный
санитарный врач
Республики Беларусь

_____ А. А. Тарасенко
26.08.2022
Регистрационный № 049-0622

**МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ *Mycobacterium tuberculosis*
ПОДТИПА B0/W148 ГЕНОТИПА *BEIJING***

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: ГУ «Республиканский научно-практический
центр пульмонологии и фтизиатрии»

АВТОРЫ: канд. мед. наук, доц. В. В. Слипень, д-р мед. наук, проф. Л. К. Суркова,
чл.-корр. НАН Беларуси, д-р мед. наук, проф. Г. Л. Гуревич, д-р мед. наук, доц.
Е. М. Скрягина

Минск 2022

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен метод определения *M. tuberculosis* подтипа B0/W148 генотипа Beijing с помощью полимеразной цепной реакции (далее — ПЦР) в режиме реального времени, который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на диагностику и лечение туберкулеза, а также в проведении эпидемиологического надзора за множественно и широко лекарственно-устойчивым туберкулезом.

Инструкция предназначена для врачей лабораторной диагностики, врачей-бактериологов, иных врачей-специалистов учреждений здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам, страдающим туберкулезом, или осуществляющих государственный санитарный надзор.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ.

1 Туберкулез органов дыхания, подтвержденный бактериологически и гистологически (МКБ-10: A15).

2 Эпидемиологическое расследование в очагах и во время вспышек туберкулезной инфекции.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

Изделия медицинской техники для молекулярно-генетического анализа
Экстракция дезоксирибонуклеиновой кислоты (далее — ДНК)

1 Ламинарный бокс с бактерицидной лампой.

2 Стандартная культура *M. tuberculosis* H37Rv.

3 Клонированный штамм ультракомпетентных бактериальных клеток *Escherichia coli* XL10-Gold®, несущих плазмидный вектор pTZ57 с интегрированным в него фрагментом гена *GyrA* *M. tuberculosis*.

4 Микроцентрифуга для пробирок типа «эппендорф» (10 000–15 000 xg).

5 Микроцентрифуга-вортекс.

6 Термостат твердотельный для микропробирок на 1,5 и 0,5 мл (диапазон рабочих температур от 25 до 99 °С).

7 Комплект автоматических пипеточных дозаторов переменного объема (0,5–10, 5–50, 20–200, 200–1 000 мкл).

8 Холодильник, диапазон рабочих температур от 2 до 8 °С.

9 Морозильная камера, диапазон рабочих температур от -16 до -20 °С).

10 Бактерицидная УФ-лампа.

Проведение ПЦР в реальном времени

1 Термоциклер для проведения ПЦР в режиме реального времени с компьютером и компьютерным программным обеспечением для регистрации и анализа результатов.

- 2 Прибор для запаивания планшетов для ПЦР.
- 3 Микроцентрифуга-вортекс.
- 4 Комплект автоматических пипеточных дозаторов переменного объема (0,5–10, 5–50, 20–200 мкл).
- 5 Холодильник, диапазон рабочих температур от 2 до 8 °С.
- 6 Морозильная камера, диапазон рабочих температур от -16 до -20 °С).
- 7 ПЦР-бокс с бактерицидной УФ-лампой.

Реактивы для ПЦР в режиме реального времени

Пробоподготовка и выделение ДНК

Набор реагентов для выделения ДНК из культур бактерий, мокроты.

Проведение ПЦР в режиме реального времени

- 1 10хПЦР буфер для Taq-полимеразы (750 мМ Трис-НСl (рН 8.8 при 25 °С), 200 мМ (NH₄)₂SO₄, 0,1 % твин-20).
- 2 Хлорид магния 50 мМ.
- 3 Смесь дНТФ (по 2,5 мМ дАТФ, дТТФ, дСТФ, дГТФ).
- 4 Раствор трегалозы 2,5 М.
- 5 Раствор бетаина 5М.
- 6 Вода стерильная бидистиллированная свободная от нуклеаз.
- 7 Олигонуклеотиды: праймеры и зонды в соответствии с приведенным составом в таблице 1; должны храниться при низкой температуре -20 °С.

Таблица 1 — Зонды и праймеры для определения подтипа В0/W148 генотипа *Beijing M. tuberculosis* (из расчета на одну реакцию)

Сокращенное название	Назначение	Количество, пкмоль	Метка 5'	Последовательность олигонуклеотида, 5' → 3'	Метка 3'
1	2	3	4	5	6
F В0\W148 Rv1720	Прямой праймер для детекции подтипа В0/W148 генотипа <i>Beijing</i>	20		GCCGTCGAGCTCATGCTCACGA	
R В0\W148 Rv1720	Обратный праймер для детекции подтипа В0/W148 / генотипа <i>Beijing</i>	20		ACGGGCAGGCTAAGGAAGTTCACA	
М- Rv1720 с В0\W148	Зонд к мутантному типу гена Rv1720, встречающемуся у всех <i>M.tuberculosis</i> , относящихся к подтипу В0/W148 (мечен R6G или JOE)	10	R6G	GAAACCGTGCGCGCCCCTGCA	ВН Q1
W - Rv1720 с В0\W148	Зонд к дикому типу гена Rv1720, встречающемуся у всех <i>M. tuberculosis</i> , не относящихся к подтипу В0/W148 (мечен FAM)	10	FA M	GAAACCGTGCACGCCCCTGCA	ВН Q1

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4	5	6
F- pTZ57R CTRL ¹	Контроль F – прямой праймер для амплификации внутреннего контроля	15		ACAATTTCCATTCGCCA TTCAGG	
R- pTZ57R F1- CTRL ¹	Контроль R – обратный праймер для амплификации внутреннего контроля	15		CTCGAATTCACCTGGCCG TCGT	
ЗОНД- CTRL ¹	Зонд внутреннего контроля (мечен ROX)	10	RO X	AGTCGGCCCCGGTTCGGT TGC	ВН Q2
F Vo\W14 8 Rv1720	Прямой праймер для детекции подтипа В0/W148 генотипа <i>Beijing</i>	20		GCCGTCGAGCTCATGCT CACGA	
ECctrl-R	Обратный праймер контроль	20		CTCGAATTCACCTGGCCGTCGT	
¹⁾ В случае отсутствия клонированной <i>Escherichia coli XL10-Gold®</i> с <i>gyrA</i> геном <i>M. tuberculosis</i> можно использовать контроль, амплифицирующий фрагмент <i>GyrA</i> (прямой праймер <i>GyrA-F</i> _{180-198/194} CGATTCGGCTTCCGCCCCG (15 пкМ из расчета на одну реакционную смесь объемом 50 мкл), обратный праймер <i>GyrA-R</i> _{374-353/194} CGGTGGGTTCATTCCTGGCG (15 пкМ из расчета на одну реакционную смесь объемом 50 мкл) и контрольный зонд ЗОНД-CTRL ROX-AGTCGGCCCCGGTTCGGTTC- ВНQ2 (10 пкМ из расчета на одну реакционную смесь объемом 50 мкл)).					

Необходимы следующие изделия медицинского назначения: пробирки пластиковые типа «эппендорф» 0,5 и 1,5 мл планшеты пластиковые для ПЦР на 96 пробирок, оптически прозрачная пленка для запаивания планшетов для ПЦР, наконечники одноразовые пластиковые с фильтром объемом 0,5–250, 200–1000 мкл; штативы для пробирок; халаты, латексные перчатки.

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

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Материалом для исследования является мокрота (с содержанием КУБ на 3+ при микроскопии по Цилю – Нильсену), чистые культуры микобактерий.

Сбор и обработку мокроты проводят в соответствии с «Руководством по лабораторной диагностике туберкулеза» (приказ Министерства здравоохранения республики Беларусь от 22.03.2013 № 377К).

К собранной мокроте добавляют муколитик в объеме, равном объему пробы, после чего центрифугируют при 12 000 об/мин в течение 15 мин. Дальнейшим исследованиям подвергают осадок.

Экстракция ДНК из биологического материала и чистых культур

Выделение тотальной ДНК производят с использованием коммерческого набора, предназначенного для выделения ДНК из мокроты

или чистых культур микроорганизмов. Выделенные образцы ДНК хранят при температуре – 20 °С не более 1 года.

Определение подтипа B0/W148 генотипа *Beijing M. tuberculosis*

Метод определения подтипа B0/W148 генотипа *Beijing M. tuberculosis* включает амплификацию гена *var12c* (Rv1720 c) с одновременным определением с помощью ПЦР в режиме реального времени с гидролизными зондами состава 95 кодона этого гена: *gca95* или *gcg95*, путем анализа кривых флюоресценции на каналах FAM и JOE (R6G). У *M. tuberculosis* подтипа B0/W148 присутствует типоспецифическая мутация с заменой аденина на гуанин в 95 кодоне - *gcg95* (*gca95*→ *gcg95*), что обеспечивает формирование флюоресценции выше пороговой на канале JOE. У *M. tuberculosis* других подтипов и генотипов в 95 кодоне находится аденин - *gca95*, что обеспечивает формирование в ходе реакции флюоресценцию выше пороговой на канале FAM.

Последовательность праймеров приведена в таблице 1, состав реакционных смесей — в таблице 2

Таблица 2 — Состав реакционных смесей для проведения ПЦР в реальном времени из расчета на одну реакцию

Реагент	Количество на одну реакцию
10-кратный Taq буфер: 100 мМ трис-HCl (pH 9, при 25 °C), 1,0 % Triton® X-100, 500 мМ KCl; 1,5 мМ MgCl ₂	5 мкл (1-кратная концентрация)
F B0\W148 Rv1720 – прямой праймер для детекции подтипа B0/W148 генотипа <i>Beijing</i>	25 пкМ
R B0\W148 Rv1720 – обратный праймер для детекции подтипа B0/W148 / генотипа <i>Beijing</i>	15 пкМ
W -Rv1720c B0\W148 – зонд к дикому типу гена Rv1720, встречающемуся у всех <i>M.tuberculosis</i> , не относящегося к подтипу B0/W148 (мечен FAM)	10 пкМ
M-Rv1720c B0\W148 – зонд к мутантному типу гена Rv1720, встречающемуся у всех <i>M. tuberculosis</i> , относящихся к подтипу B0/W148 (мечен R6G или JOE)	10 пкМ
F-CTRL - контроль F – прямой праймер для амплификации внутреннего контроля	20 пкМ
R-CTRL - контроль R – обратный праймер для амплификации внутреннего контроля	20 пкМ
ЗОНД-CTRL - зонд внутреннего контроля (мечен ROX)	10 пкМ
Раствор dNTP (5 ммоль/мл dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	7 мкл
MgCl ₂ (25 мМ)	5 мкл
Бетаин 5М	5 мкл
Трегалоза 5М	3 мкл
Taq полимеразы	2 ЕД
Экстрагированная ДНК микобактерий	10 мкл
Экстрагированная ДНК клонированного штамма <i>Escherichia coli XL10-Gold®</i>	5 мкл
Свободная от нуклеазы деионизованная вода	до 50 мкл

Условия амплификации с целью определения подтипа B0/W148 генотипа *Beijing M. tuberculosis* приведены в таблице 3

Таблица 3 — Описание условий амплификации с целью определения подтипа B0/W148 генотипа *Beijing M. tuberculosis*

Шаг	Температура	Время	Скорость изменения температуры	Определение флюоресценции на каналах
Начальная денатурация	95 °C	10 мин	3 °C/с	Отсутствует
40 циклов				
Денатурация	95 °C	45 с	4 °C/с	Отсутствует
Отжиг и элонгация	67 °C	75 с	1 °C/с	FAM, JOE, ROX

Детекцию флюоресценции для всех реакционных смесей проводят на стадии отжига (67 °C – 75 с) на канале R6G (возбуждение – 526 нм, экстинкция – 555 нм), FAM (возбуждение – 492 нм, экстинкция – 517 нм), ROX (возбуждение – 580 нм, экстинкция – 605 нм).

Детекция подтипа B0/W148 генотипа *Beijing* проводится путем оценки уровней флюоресценции и характера кривой флюоресценции в ходе проведения ПЦР и осуществляется прибором ПЦР в реальном времени (рисунок 1).

В случае принадлежности культуры к подтипу B0/W148 генотипа *Beijing* отмечается рост флюоресценции на канале JOE, флюоресценция ниже пороговой на канале FAM. Позитивный внутренний контроль флюоресцирует на канале ROX

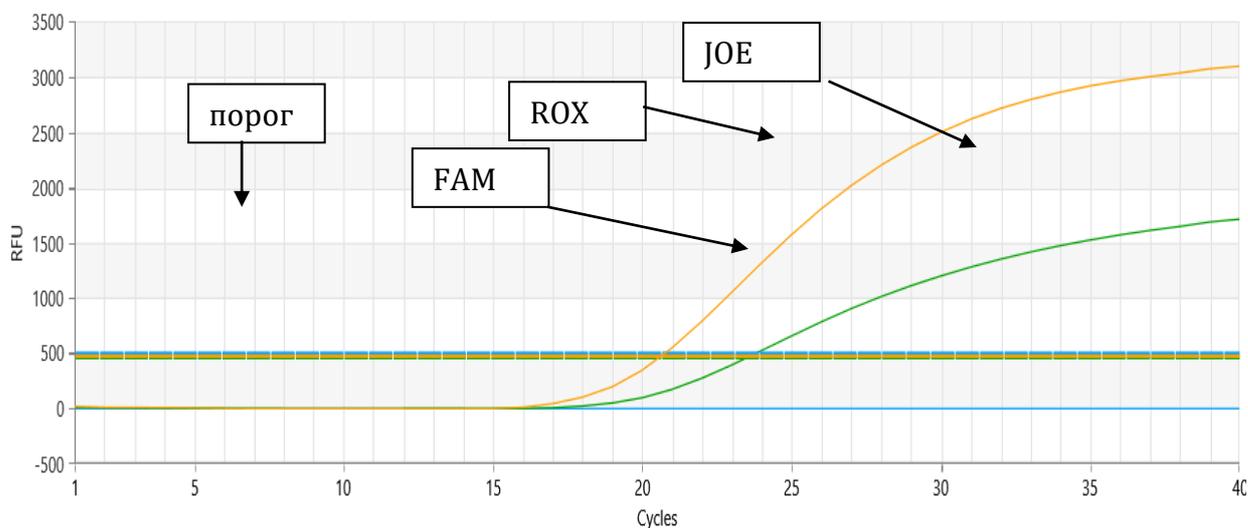


Рисунок 1 — Результаты детекции *M. tuberculosis* подтипа B0/W148 генотипа *Beijing* (флюоресценция регистрируется на канале JOE и ROX, FAM – ниже пороговой)

Учет результатов

Для каждой пробы определяют уровень флюоресценции (RFU) на 35 цикле на каждом канале FAM, JOE, ROX с помощью сервисной

программы анализа уровня флюоресценции, прилагаемой к прибору. Программа отображает числовые значения уровней флюоресценции. Уровни флюоресценции изучаемого образца ДНК на каждом из каналов FAM, R6G, ROX сравнивают с пороговым значением, и в случае превышения уровня флюоресценции пробы порогового значения, флюоресценцию на данном канале считают положительной.

Исключение неспецифической флюоресценции, связанной с денатурацией зонда

Программу учета и оценки результатов, обслуживающую прибор ПЦР в реальном времени, настраивают таким образом, чтобы она отражала цикл, достижения порогового значения флюоресценции. Флюоресценция должна достигать порогового уровня до 35 цикла. Те результаты флюоресценции, которые достигают порогового уровня на 35 и более цикле, считают сомнительными. Для таких проб повторно проводят исследование и считают реакцию отрицательной, если пробы повторно достигают порогового уровня флюоресценции на 35 и более цикле.

Определение порога положительной реакции

Программу учета и оценки результатов, прилагающуюся к прибору ПЦР в реальном времени, настраивают таким образом, чтобы она отражала динамику изменения уровней флюоресценции. Положительными можно считать те пробы, уровень конечной флюоресценции которых удовлетворяет одному из критериев:

1) конечный уровень флюоресценции выше порогового, при этом порог равен сумме конечного уровня флюоресценции отрицательного контроля и толерантности. Толерантность равна 25 % от максимального уровня флюоресценции, который зарегистрирован в процессе постановки всех проб в одной партии исследований;

2) в ходе реакции уровень флюоресценции пробы увеличивается на 50 % и более по сравнению с исходным уровнем флюоресценции.

Интерпретация результатов

Идентификационные критерии принадлежности *M. tuberculosis* к подтипу B0/W148 генотипа *Beijing*

Изоляты M. tuberculosis относятся к подтипу B0/W148 генотипа Beijing при выполнении двух условий:

- а) присутствует флюоресценция выше пороговой на канале JOE;
- б) отсутствует флюоресценция (или ниже пороговой) на канале FAM;
- в) присутствует флюоресценция выше пороговой на канале ROX.

Изоляты M. tuberculosis относятся другим генетическим типам, но не B0/W148 генотипа Beijing:

- а) присутствует флюоресценция выше пороговой на канале FAM;
- б) отсутствует флюоресценция (или ниже пороговой) на канале JOE;
- в) присутствует флюоресценция выше пороговой на канале ROX.

Анализ результатов

В зависимости от того, на каком канале FAM, R6G или ROX регистрируется флюоресценция выше пороговой образцы идентифицируют как «подтип B0/W148 генотипа *Beijing*», «другие подтипы и генотипы», гетерозиготы.

Алгоритм интерпретации результатов приведен в таблице 4.

Таблица 4 — Флюоресцирующий канал и интерпретация результатов в процессе определения *M. tuberculosis* подтипа B0/W148 генотипа *Beijing*

Флюоресцирующий канал и интерпретация результатов			
FAM	R6G	ROX	Интерпретация
+	-	+	<i>M. tuberculosis</i> , не относящиеся к подтипу B0/W148 генотипа <i>Beijing</i>
-	+	+	<i>M. tuberculosis</i> подтипа B0/W148 генотипа <i>Beijing</i>
+	+	+	Гетерозигота
-	-	+	ДНК <i>M. tuberculosis</i> отсутствует
-	-	-	Невалидный результат

Если в образце присутствует ДНК микобактерий, относящиеся к подтипу B0/W148 генотипа *Beijing*:

а) гидролизные зонды, меченные JOE и специфичные для подтипа B0/W148 генотипа *Beijing*, присоединяются к комплементарному им локусу. Благодаря экзонуклеазной активности Taq-полимеразы происходит отщепление флуоресцирующей метки от зонда, что сопровождается появлением флуоресцентного сигнала, определяемого прибором ПЦР в реальном времени на длине волны JOE (возбуждение – 526 нм, экстинкция – 555 нм).

б) гидролизные зонды, мечены FAM, специфичные для других типов и генотипов *M. tuberculosis*, но не подтипа B0/W148 генотипа *Beijing*, не присоединяются к ДНК, и Taq-полимераза не отщепляет флуоресцентную метку, что сопровождается отсутствием флюоресценции на канале FAM (возбуждение – 492 нм, экстинкция – 517 нм).

в) гидролизные зонды контроля обеспечивают флюоресценцию на канале ROX (возбуждение – 580 нм, экстинкция – 605 нм) – положительный внутренний контроль.

Если в образце отсутствует ДНК микобактерий, относящихся к подтипу B0/W148 генотипа *Beijing*, но присутствует ДНК микобактерий других подтипов и генотипов:

а) гидролизные зонды, специфичные для подтипа B0/W148 генотипа *Beijing*, меченные JOE, не присоединяются к ДНК, и Taq-полимераза не отщепляет флуоресцентную метку, флуоресцентный сигнал при этом отсутствует на канале для JOE (возбуждение – 526 нм, экстинкция – 555 нм), или ниже порогового.

б) гидролизный зонд к микобактериям других подтипов и генотипов, чем B0/W148 генотипа *Beijing*, меченый FAM, присоединяется к ДНК,

Тақ-полимераза отщепляет FAM от зонда, что сопровождается появлением флуоресцентного сигнала, определяемого прибором ПЦР в реальном времени на длине волны специфичной для FAM (возбуждение – 492 нм, экстинкция – 517 нм).

в) гидролизные зонды контроля обеспечивают флюоресценцию на канале ROX (возбуждение – 580 нм, экстинкция – 605 нм) – положительный внутренний контроль.

ДНК микобактерий туберкулеза отсутствует

Если в реакционной смеси отсутствуют сигналы флюоресценции, но есть флюоресценция на канале ROX, это говорит о том, что в реакционной смеси отсутствует ДНК микобактерий.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Одновременная флюоресценция на каналах FAM, JOE

Флюоресценция выше пороговой может регистрироваться одновременно на FAM и R6G каналах (гетерозиготы). Если на одном из каналов уровень флюоресценции превосходит флюоресценцию на втором канале в 2 раза и более, то положительной считать пробу по доминантному каналу: если доминирует FAM, то *M. tuberculosis* других подтипов и генотипов, если доминирует R6G - *M. tuberculosis* подтипа B0/W148 генотипа *Beijing*.

В случае идентичности уровней флюоресценции FAM и R6G исследования повторяют, при этом пробу ДНК подвергают повторному центрифугированию при 14 000 g – 20 мин при 4 °С. В случае сохранения идентичности уровней флюоресценции на FAM и R6G каналах при повторных исследованиях, проводят секвенирование. Проба содержит несколько генотипов *M. tuberculosis* одновременно.

Меры безопасности

Первичная обработка клинического материала (мокрота, чистые культуры *M. tuberculosis*) должна проводиться в лабораториях, оснащенных в соответствии с требованиями инфекционного контроля и биобезопасности: обязательное использование вытяжного шкафа, боксов биологической безопасности 2 класса, респираторов, перчаток, медицинских халатов (в соответствии с санитарно-эпидемиологическими требованиями к устройству, оборудованию и содержанию противотуберкулезных организаций здравоохранения и к проведению санитарно-противоэпидемических мероприятий, направленных на предотвращение распространения туберкулеза в противотуберкулезных организациях здравоохранения (постановление Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 03.03.2020 № 130 «Об утверждении специфических санитарно-эпидемиологических требований» и «Руководство по лабораторной диагностике туберкулеза», утвержденное приказом Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 22.03.2013 № 377).