

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель Министра

Д.Г.Лосицкий

«*12*» *Июль* 2018 г.

Регистрационный № *036-0418*



**МЕТОД ВЫЯВЛЕНИЯ ПРИСУТСТВИЯ  
ПЕРИОДОНТОПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ**

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. д-р.мед.наук, профессор Юдина Н.А., Яковлева-Малых М.О., Пиванкова Н.Н., Мельникова Т.Ю.

Минск, 2018

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ  
Заместитель министра

\_\_\_\_\_ И. Г. Лосяцкий  
27.04.2018  
Регистрационный № 036-0418

**МЕТОД ВЫЯВЛЕНИЯ ПРИСУТСТВИЯ  
ПЕРИОДОНТОПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ**

инструкция по применению

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

АВТОРЫ: д-р мед. наук, доц. С. А. Костюк, О. С. Полуян, д-р мед. наук, проф.  
Н. А. Юдина, М. О. Яковлева-Малых, Н. Н. Пиванкова, Т. Ю. Мельникова

Минск 2018

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен метод выявления присутствия периодонтопатогенных микроорганизмов *Prevotella intermedia*, *Bacteriodes forsythus*, *Treponema denticole*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Enterococcus faecalis* с использованием метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени, который может применяться в комплексе медицинских услуг, направленных на диагностику заболеваний полости рта.

Инструкция предназначена для врачей лабораторной диагностики, врачей-стоматологов, врачей-стоматологов-терапевтов, врачей-стоматологов-ортопедов и иных врачей организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам с заболеваниями полости рта 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 и зонды.

### **ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ**

K04 Болезни пульпы и периапикальных тканей.

K05 Гингивит и болезни пародонта.

K05.0 Острый гингивит.

K05.3 Хронический пародонтит.

K05.4 Юношеский пародонтоз.

### **ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ**

Отсутствуют.

### **ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА**

#### *Этап I. Получение биологического материала*

Техника взятия биологического материала производится в соответствии с инструкцией по применению «Метод обследования пациентов с заболеваниями пульпы и апикального пародонтита», утвержденной Министерством здравоохранения Республики Беларусь от 05.12.2013, рег. № 171-1113.

#### *Этап II. Аналитический*

Для качественного выявления присутствия ДНК периодонтопатогенных возбудителей *Prevotella intermedia*, *Bacteriodes forsythus*, *Treponema denticole*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Enterococcus faecalis* используют молекулярно-генетический анализ (ПЦР) в режиме реального времени с последующим анализом 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:

Pi-f-AATACCCGATGTTGTCCACA (прямой праймер)

Pi-r-TTAGCCGGTCCTTATTCGAA (обратный праймер)

Pi-p-TGACGTGGACCAAAGATTCATCGGTGGA (TaqMan-зонд)

Vf-f-GGGTGAGTAACGCGTATGTAACCT (прямой праймер)

Vf-r-ACCCATCCGCAACCAATAAA (обратный праймер)

Vf-p-CCCGCAACAGCGGGATAACCCGC (TaqMan-зонд)

Td-f-CCGAATGTGCTCATTTACATAAAGGT (прямой праймер)

Td-r-GATACCCATCGTTGCCTTGGT (обратный праймер)

Td-p-CTCACCAACTAGCTAATGGGACGCGG (TaqMan-зонд)

Aac-f-CTTACCTACTTTGACATCCGAA (прямой праймер)

Aac-r-ATGCGCACCTGTCTCAAAGC (обратный праймер)

Aac-p-AGAACTCAGAGATGGGTTTGTGCCTTAG (TaqMan-зонд)

Pg-f-TAGCTTGCTAAGGTTCGATGG (прямой праймер)

Pg-r-CAAGTGTATGCGGTTTTAGT (обратный праймер)

Pg-p-TGCGTAACGCGTATGCAACTTGCC (TaqMan-зонд)

Ef-f-CGCTTCTTTCCTCCCGAGT (прямой праймер)

Ef-r-GCCATGCGGCATAAACTG (обратный праймер)

Ef-p-CAATTGGAAAAGGAGTGGCGGACG (TaqMan-зонд)

HPRT1 – f – AGCGGTAACCATGCGTATTT (прямой праймер)

HPRT1 – r – CACATGTGAATTTTCGGCTTG (обратный праймер)

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

Аmplификацию производят по следующей программе:

95 °C – 5 мин – 1 цикл

95 °C – 15 с  
52 °C – 15 с  
72 °C – 60 с

} 35 циклов

Детекцию флуоресценции производят последовательно по следующим каналам: FAM/Green — для периодонтопатогенных возбудителей *Prevotella intermedia*, *Bacteriodes forsythus*, *Treponema denticole*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Enterococcus faecalis*; 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 периодонтопатогенных возбудителей.

### *Этап III. Принятие управленческого решения*

При наличии пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией по каналу для *Prevotella intermedia*, *Bacteriodes forsythus*, *Treponema denticole*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Enterococcus faecalis* делают заключение о присутствии в исследуемом биологическом материале ДНК данного возбудителя.

### **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.