

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель Министра – Главный
государственный санитарный врач
Республики Беларусь

А.А. Тарасенко



«16» 08 2022 г.

Регистрационный № 040-0622

МЕТОД МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ И
ОПРЕДЕЛЕНИЯ РЕЗИСТЕТНОСТИ К АНТИБИОТИКАМ
ENTEROCOCCUS FAECALIS

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: государственное учреждение
«Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и
микробиологии»

АВТОРЫ: д.м.н., профессор, академик НАН Беларуси Титов Л.П.,
Дубовик П.И., Василевская М.Е.

Минск 2022

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель Министра – Главный
государственный санитарный врач
Республики Беларусь

_____ А.А. Тарасенко

26.08.2022

Регистрационный № 040-0622

МЕТОД МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ И
ОПРЕДЕЛЕНИЯ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К АНТИБИОТИКАМ

ENTEROCOCCUS FAECALIS

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: государственное учреждение
«Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и
микробиологии»

АВТОРЫ: д.м.н., профессор, академик НАН Беларуси Титов Л.П.,
Дубовик П.И., Василевская М.Е.

Минск 2022

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) изложен метод идентификации *Enterococcus faecalis* и определения генов резистентности к различным классам антибиотиков 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 у бактерий *E. faecalis*, вызвавших развитие инфекционного процесса.

Инструкция предназначена для врачей-бактериологов, врачей эпидемиологов, врачей-лаборантов, врачей-лабораторной диагностики, врачей-инфекционистов, иных врачей – специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь.

1. Показания к применению

Инфекционные заболевания, вызванные бактериями *E. faecalis* с множественной резистентностью к антибиотикам, МКБ 10 другие бактериальные болезни, не классифицированные в других рубриках (А-48).

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

Тақ-полимераза 5 ед/мкл

Хлорид магния 50 мМ

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) Экстракцию ДНК *E. faecalis* из образцов клинического материала и бактериальных культур проводят с использованием коммерческого набора

для выделения ДНК в соответствии с прилагаемой инструкцией. Выделенные образцы ДНК хранят при -20°C не более 1 года.

2) ПЦР в режиме реального времени

Для идентификации *E. faecalis* и определения генов резистентности к различным классам антибиотиков проводят несколько ПЦР, мишенями в которых являются разные гены. Характеристика используемых генов-мишеней представлена в таблице 1.

Таблица 1 – Гены-мишени для идентификации и определения профиля резистентности к антибиотикам *E. faecalis*

Наименование гена-мишени	Назначение ПЦР	Праймеры
<i>ddl</i> (D-аланин–D-аланин лигаза)	Идентификация <i>E. faecalis</i>	<i>ddl-F</i> <i>ddl-R</i> <i>ddl-FAM</i>
<i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i> (ацетилтрансфераза)	Устойчивость к аминогликозидам	<i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia -F</i> <i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia -R</i> <i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia-FAM</i>
<i>ant(6')- Ia</i> (нуклеотидилтрансфераза)		<i>ant(6')- Ia-F</i> <i>ant(6')- Ia-R</i> <i>ant(6')- Ia-FAM</i>
<i>ant(4')-IIb</i> (нуклеотидилтрансфераза)		<i>ant(4')-IIb-F</i> <i>ant(4')-IIb -R</i> <i>ant(4')-IIb-FAM</i>
<i>aph(3')-IIIa</i> (фосфотрансфераза)		<i>aph(3')-IIIa-F</i> <i>aph(3')-IIIa-R</i> <i>aph(3')-IIIa-FAM</i>
<i>vanB</i>	Устойчивость к гликопептидам (ванкомицин)	<i>vanB -F</i> <i>vanB -R</i> <i>vanB -FAM</i>
<i>rbp5</i> (пенициллинсвязывающий белок)	Устойчивость к аминопеницилинам	<i>rbp5-F</i> <i>rbp5-R</i> <i>rbp5-FAM</i>

Таблица 2 – Нуклеотидная последовательность праймеров для ПЦР-РВ

Наименование праймера	Размер ампликона, п.о.	Последовательность
<i>ddl-F</i>	84	TTGGCATTCACAAAGTACCA
<i>ddl-R</i>		AATTGCTCGGGCATCATAAC
<i>ddl-FAM</i>		FAM- TTCGTGCCAGTTTTAAGAAGTGACTGG- BHQ1
<i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia -F</i>	176	ACAGAGCCTTGGGAAGATGA
<i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia -R</i>		CTCCAATAATTTGGCTCTCCT
<i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia-FAM</i>		FAM- CTGATGAGATAGTCTATGGTATGGATC- BHQ1
<i>aph(3')-IIIa-F</i>	162	GAAAGCTGCCTGTTCCAAAG
<i>aph(3')-IIIa-R</i>		GAAAGAGCCTGATGCACTCC
<i>aph(3')-IIIa-FAM</i>		FAM- TCCTGCACTTTGAACGGCATGATGGCT- BHQ1
<i>ant(4')-IIb -F</i>	168	CTGCCATGTTGATTGGTCTG
<i>ant(4')-IIb -R</i>		TATCCGTGTCGTTCTGTCCA
<i>ant(4')-IIb-FAM</i>		FAM- CATCATCGCATCTGTTATACGAC- BHQ1
<i>ant(6')-Ia-F</i>	232	CCCAGAGGAGAGCTTTGATG
<i>ant(6')-Ia-R</i>		TGTCCGTTTGCCCTCATAAT
<i>ant(6')-Ia-FAM</i>		FAM- TACTGCATTTCCCGGTGGACA- BHQ1
<i>vanB-F</i>	202	GATTTGATTGTTCGGCGAAGTG
<i>vanB-R</i>		TCCTGATGGATGCGGAAGA
<i>vanB-FAM</i>		FAM- TCAAATCCGGCTGAGCCACGGT- BHQ1
<i>pbp5-F</i>	243	GTGCTGCTGATGTCAAAGGA
<i>pbp5-R</i>		TTGCTGCTTCTTGTGTGGTC
<i>pbp5-FAM</i>		FAM- ACTTTGTCATTTCCCTCCATTTCTGG- BHQ1

Все олигонуклеотиды синтезируют под заказ в лиофилизированном виде. Каждый олигонуклеотид растворяют отдельно в бидистиллированной воде.

Таблица 3 – Реакционная смесь для ПЦР

Реагент	Исходная концентрация	Конечная концентрация в реакционной смеси	Объем на одну реакцию (мкл)
H ₂ O (деионизированная)	-	-	16,1 мкл
ПЦР-буфер	10X	1X	2,5 мкл
dNTPs	25 мМ	0,2 мМ	0,2 мкл
MgCl ₂	50 мМ	2 мМ	1 мкл
Прямой праймер	10 мМ	0,4 мМ	1 мкл
Обратный праймер	10 мМ	0,4 мМ	1 мкл
ДНК-зонд	10 мМ	0,4 мМ	1 мкл
Тақ-полимераза	5 ед/мкл	2 ед/реакцию	0,2 мкл
ДНК			2 мкл
Вся смесь			25 мкл

Приготовленные реакционные смеси разливают в пробирки для РТ-ПЦР по 23 мкл. По 2 мкл ДНК-образца добавляют в соответствующие пробирки со смесью. В качестве положительного контроля используется ДНК штамма с подтвержденным наличием определяемого гена. В качестве отрицательного контроля используется 2 мкл деионизированной воды.

Приготовление реакционных смесей, раскапывание их в пробирки и добавление ДНК-образцов проводится на льду. Перед постановкой в амплификатор следует осадить капли со стенок пробирок кратким центрифугированием на центрифуге/вортексе (1-3 с).

5.1 Проведение амплификации с детекцией в режиме реального времени

Запрограммировать прибор (амплификатор с системой детекции в режиме реального времени) для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (таблица 3).

Таблица 4 – Программа амплификации фрагментов генов *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, *aph(3')-IIIa*, *ant(4')-IIb*, *ant(6')-Ia*; гена *vanB*; гена *pbp 5*; гена *ddl*

Гены	Шаг	Кол-во циклов	Температура	Время
<i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i> <i>aph(3')-IIIa</i> <i>ant(4')-IIb</i> <i>ant(6')-Ia</i>	предварительная денатурация	1	94 °С	3 минуты
	денатурация	35	94°С	20 сек
	отжиг		56 °С	30 сек
	элонгация		72 °С	30 сек
<i>pbp 5</i>	предварительная денатурация	1	95°С	3 минуты
	денатурация	40	94°С	30 сек.
	отжиг		58°С	40 сек.
	элонгация		72°С	30 сек
<i>ddl</i>	предварительная денатурация	1	95°С	5 минут
	денатурация	40	94°С	20 сек
	отжиг		56°С	20 сек
	элонгация		72°С	30 сек
<i>vanB</i>	предварительная денатурация	1	95 °С	5 минут
	денатурация	35	94 °С	20 сек
	отжиг		56 °С	30 сек
	элонгация		72 °С	30 сек

Детекция флуоресцентного сигнала проводится по каналам для флуорофора FAM/Green.

Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора.

Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.

По окончании выполнения программы приступить к анализу и интерпретации результатов.

5. Анализ и интерпретация результатов

Анализ результатов проводят с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции на используемом канале с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы ДНК значения порогового цикла C_T . C_T – номер цикла, в котором сигнал флуоресценции пересекает пороговую линию (threshold). Threshold – пороговый уровень флуоресценции, устанавливается значение 0.05. Отобразить кривые амплификации в режимах AutoScale/Автошкала и Linear Scale/Линейная шкала. Dynamic Tube/Динамич.фон устанавливается значение включено. Slope Correct/Коррект.уклона устанавливается значение включено. Ignore First/Игнор.первые поставить 3 Cycles/Цикла. Take Off Adj. устанавливается значение отключено.

Принцип анализа результатов амплификации следующий: результат амплификации считается положительным (то есть, в образце присутствует фрагмент искомого гена), если кривая флуоресценции имеет типичную для ПЦР в режиме реального времени S-образную форму и однократно пересекается с пороговой линией в области достоверного прироста флуоресценции, отрицательным – в случае отсутствия кривой типичной формы, не пересекающейся с пороговой линией (нет значения C_T) или если определено значение порогового цикла C_T , превышающее указанное граничное значение.

6. Достоверность результатов ПЦР

Результаты реакции считаются достоверными, если в положительном контроле присутствует сигнал флуоресценции, а в негативном контроле сигнал флуоресценции отсутствует.

6.1 Возможные проблемы при постановке ПЦР в режиме реального времени и их устранение

Проблемы	Возможные причины	Способы решения
1. В пробе положительного контроля значение порогового цикла C_T по соответствующему каналу отсутствует или превышает граничное значение	- ДНК в положительном контроле разрушилась - разрушились пробы, меченные флуоресцентным красителем, или праймеры	- повторить амплификацию для всех отрицательных клинических образцов с использованием нового положительного контроля и (или) новых наборов праймеров и проб; - соблюдать правила их транспортировки и хранения
2. Кривая флуоресценции в клинических образцах пересекает пороговое значение, но не имеет типичной S-образной формы	- наличие примесей в клинических образцах	- более тщательная очистка при выделении ДНК из клинических образцов
3) В пробе отрицательного контроля зафиксировано значение порогового цикла C_T	- загрязнение проб	- повторить амплификацию для всех образцов с использованием нового отрицательного контроля, и новых наборов праймеров и проб; - предпринять меры по выявлению и ликвидации источника возможной контаминации

7. Контроль клинической эффективности метода

Не требуется.