

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

Д.Л. Пиневич

«*Пиневич*» 2017 г.

Регистрационный № 046-0617



**МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ
К АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМ ЛЕКАРСТВЕННЫМ СРЕДСТВАМ
HELICOBACTER PYLORI РОТОВОЙ ЖИДКОСТИ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: Учреждение образования
«Белорусский государственный медицинский университет».
Государственное учреждение образования «Белорусская медицинская
академия последипломного образования»;

АВТОРЫ: к.м.н., доцент Шевела Т.Л., д.м.н., профессор Походенько-
Чудакова И.О., д.м.н., профессор Костюк С.А.

Минск, 2017

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель министра

_____ Д.Л. Пиневиц
30.08.2017
Регистрационный № 046-0617

**МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ
HELICOBACTER PYLORI К АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМ ЛЕКАРСТВЕННЫМ
СРЕДСТВАМ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: УО «Белорусский государственный
медицинский университет», ГУО «Белорусская медицинская академия
последипломного образования»

АВТОРЫ: канд. мед. наук, доц. Т.Л. Шевела, д-р мед. наук, проф.
И.О. Походенько-Чудакова, д-р мед. наук, проф. С.А. Костюк

Минск 2017

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен метод определения генетической резистентности *Helicobacter Pylori* (далее — *HP*) к антибактериальным лекарственным средствам (далее — ЛС) в ротовой жидкости, который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на диагностику периимплантита, маргинального периодонтита, а также заболеваний слизистой оболочки полости рта.

Инструкция предназначена для врачей-стоматологов, врачей челюстно-лицевых хирургов, иных врачей-специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинские услуги пациентам, нуждающимся в амбулаторной стоматологической помощи с частичной вторичной адентией, заболеваниями маргинального периодонтита, а также слизистой оболочки полости рта.

Область применения: стоматология, микробиология.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

Набор реагентов для выявления ДНК из биологического материала. Набор реагентов для выявления ДНК *Helicobacter pylori*. Амплификатор, высокоскоростная центрифуга, праймеры и зонды.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

K00.0 Адентия

K05 Гингивит и болезни пародонта

K05.0 Острый гингивит

K05.1 Хронический гингивит

K05.2 Острый перикоронит

K05.3 Хронический пародонтит

K05.4 Пародонтоз

K05.5 Другие болезни пародонта

K05.6 Болезнь пародонта неуточненная

K10.2 Воспалительные заболевания челюстей

K10.3 Альвеолит челюстей

K10.8 Другие неуточненные болезни челюстей

K12 Стоматит и родственные поражения

K12.0 Рецидивирующие афты полости рта

K13.7 Другие и неуточненные поражения слизистой оболочки полости рта

K14 Болезни языка

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Перед установкой дентальных имплантатов на II этапе установки формирователя десневой манжетки, а также при развитии послеоперационных воспалительных осложнений, таких как мукозит и периимплантит, заболеваний маргинального пародонта, слизистой оболочки полости рта.

I этап — качественное выявление возбудителя.

Определение ДНК из ротовой жидкости проводят стандартным сорбентным методом. При этом к 100 мкл транспортной среды, содержащей клинический материал, в пробирке объемом 1,5 мл (Eppendorf), добавляют 300 мкл раствора I (лизирующего, 6 М раствора гуанидина изотиоцианата) и 10 мкл суспензии сорбента (SiO₂). Пробы инкубируют в течение 5 мин при температуре 65°C, 1–2 раза перемешивают на микроцентрифуге при 1500 об./мин. Пробы центрифугируют в течение 15 с на высокоскоростной микроцентрифуге MPW-55 при 12000 об./мин, супернатант удаляют. К осадку добавляют 1000 мкл раствора II (промывочного, 96% этанола, содержащего 100 мМ ацетата натрия, pH 4,8), встряхивают и центрифугируют. Пробирки помещают в твердотельный микротермостат Thermo Block TDB-120 и подсушивают пробы 10 мин при температуре 65°C; оставляют пробирки открытыми. В пробирки с осадком добавляют 100 мкл TE буфера — на 1 л буфера: 0,04 М Трис-ацетат (242 г Трис, 57,1 мл ледяной уксусной кислоты), 0,002 М ЭДТА (100 мл 0,5 М ЭДТА pH 8,0) и инкубируют в течение 5 мин при 65°C. Пробирки центрифугируют в течение 60 с при 12000 оборотов. Водную фазу, содержащую раствор нуклеиновых кислот, используют для постановки реакции амплификации.

Амплификацию проводят по следующей программе:

95°C — 5 мин	} 40 циклов
95°C — 20 с	
60°C — 20 с	
72°C — 25 с	

Качественное выявление возбудителя *Helicobacter pylori* осуществляют с использованием тест-системы с помощью амплификатора-термоциклера. Детекцию результатов осуществляют по каналам FAM для *Helicobacter pylori* и JOE — для фрагмента ДНК человека (эндогенный внутренний контроль). Результаты интерпретируют на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с пороговой линией, установленной на уровне экспоненциального подъема кривой, что определяет наличие (или отсутствие) для данной ДНК-мишени значения порогового цикла Ct в соответствующей графе таблицы результатов программного обеспечения прибора.

При получении положительного результата — наличие возбудителя HP в ротовой жидкости — проводят этап определения генов устойчивости к антибактериальным ЛС.

II этап — аналитический

Проводят выявление tet-гена на наличие у *Helicobacter pylori* устойчивости к антибактериальным лекарственным средствам. Детекцию флуоресценции проводят по следующим каналам: FAM/Green — для tet-гена; ROX/Orange — для erm-гена; VIC/Yellow — для house-keeping гена NAGK. Наличие (или отсутствие) пересечения кривых флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией определяет наличие (или отсутствие) генов устойчивости.

При выявлении tet-гена делают заключение о наличии у *Helicobacter pylori* устойчивости к антибактериальным лекарственным средствам группы

тетрациклинов; при выявлении erm-гена — о наличии у *Helicobacter pylori* устойчивости к группе макролидов.

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.