

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

Ю.Л.Горбич

« 02 » 07 2025 г.

Регистрационный № 129-1124

**МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТИПА ГЕМОЛИТИКО-УРЕМИЧЕСКОГО
СИНДРОМА, АССОЦИИРОВАННОГО С ДИАРЕЕЙ, У ДЕТЕЙ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: государственное учреждение
«Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного
здоровья», учреждение образования «Белорусский государственный
медицинский университет», учреждение здравоохранения «4-я городская
детская клиническая больница»

АВТОРЫ: канд. биол. наук Семейко Г.В., д-р мед. наук, проф. Байко С.В.,
д-р. мед. наук, проф. Самойлович Е.О., Чередниченко М.Д.

Минск, 2024

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) изложен метод определения типа гемолитико-уремического синдрома (ГУС), ассоциированного с диареей, основанный на обнаружении ДНК шигатоксин-продуцирующей *Escherichia coli* (далее – STEC) с помощью ПЦР в реальном времени, который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на диагностику ГУС.

Инструкция предназначена для врачей-лаборантов, врачей-инфекционистов, врачей-педиатров и иных врачей-специалистов, оказывающих медицинскую помощь пациентам в стационарных и/или амбулаторных условиях, и/или в условиях отделения дневного пребывания.

1 Показания к применению

Гемолитико-уремический синдром (МКБ10: D59.3).

Противопоказания к применению: отсутствуют.

2 Перечень медицинских изделий, реактивов и так далее

2.1 Изделия медицинской техники

амплификатор с оптическим модулем для проведения ПЦР в режиме реального времени с компьютером с соответствующим программным обеспечением для управления прибором, анализа и хранения данных;

ламинарное укрытие с бактерицидной лампой;

морозильная камера, поддерживающая температуру минус 18... минус 20 °С;

термоблок для микропробирок объемом 1,5 мл;

холодильная установка, поддерживающая температуру +4...+8 °С;

центрифуга-вортекс;

центрифуга высокоскоростная (с ротором для пробирок типа «эппендорф», 14 000 g).

2.2 Изделия медицинского назначения и так далее

дозаторы автоматические переменного объема: 2-20, 20-200, 200-1000 мкл;

криоштатив для микропробирок объемом 0,2 и 0,5 мл;

наконечники одноразовые для автоматических дозаторов с аэрозольным барьером в штативах, стерильные, с маркировкой «RNAse, DNAse free», объемом до 10, 100, 200, 1000 мкл;

одноразовая пластиковая посуда (стерильные пробирки типа «эппендорф» объемом 1,5 мл, ПЦР-пробирки / стрипы / планшеты объемом 0,2 мл с маркировкой «RNAse, DNAse free»);

штативы для микропробирок и автоматических пипеток.

Изделия медицинского назначения для взятия биологического материала:

стерильная емкость/флакон с плотно закручивающейся крышкой;

стерильный шпатель (для сбора твердой фракции) или пластиковый одноразовый шприц (если стул жидкий).

Изделия медицинского назначения для лабораторной диагностики:

набор для выделения ДНК из фекалий;

ПЦР тест-система для обнаружения ДНК шигатоксин-продуцирующих *Escherichia coli* (STEC) в реальном времени

или реагенты для проведения ПЦР: вода стерильная для молекулярной биологии (далее – вода); высокоочищенная рекомбинантная Taq ДНК-полимераза с функцией «горячий старт» для ПЦР в реальном времени (5 ед/мкл); 10×буфер для Taq полимеразы без MgCl₂; 50 мМ раствор MgCl₂; 10 мМ смесь дНТФ; праймеры и зонды для амплификации фрагментов ДНК и положительные контроли ПЦР (pAL2-Tstx1, pAL2-Tstx2).

3 Технология реализации метода

3.1 Информация по биологической безопасности

Манипуляции с биологическим материалом необходимо проводить с соблюдением правил работы с инфицированным материалом и использованием средств индивидуальной защиты согласно СанПиН «Требования безопасности при осуществлении работ с условно-патогенными микроорганизмами и патогенными биологическими агентами, к организации и проведению их учета, хранения, передачи и транспортировки», утвержденными постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 06.01.2017 № 2.

3.2 Биологический материал

Биологическим материалом для исследования являются фекалии пациента.

3.2.1 Порядок сбора, транспортировки и хранения материала

1. Промаркировать стерильный флакон с закручивающейся крышкой.
2. Стерильным шпателем взять фекалии массой около 1 г и поместить в промаркированный флакон. Если фекалии жидкие, с помощью одноразового шприца взять 1 мл биологического материала.
3. Флакон тщательно укупорить.
4. Хранить биологический материал в холодильной установке при температуре +4...+8 °С не более 24 часов до исследования в лаборатории или замораживать при температуре минус 20 °С – до 1 года.

3.3 Выделение ДНК

Выделение ДНК выполнять с использованием наборов, предназначенных для выделения ДНК из биологического материала человека, включая фекалии, в соответствии с прилагаемой к ним инструкцией. При выделении отдельную пробирку дополнительно отвести

для отрицательного контроля выделения, в нее внести воду в количестве, согласно инструкции по применению набора.

3.4 Постановка ПЦР

Выявление STEC осуществляется с помощью ПЦР в режиме реального времени. При проведении ПЦР каждый исследуемый образец тестируется параллельно в двух реакциях: со специфическими праймерами к гену stx1 (кодирует шигатоксин 1 типа) и к гену stx2 (кодирует шигатоксин 2 типа). Реакция проводится в объеме 25 мкл, из которых 20 мкл – реакционная смесь, 5 мкл – исследуемая ДНК.

Последовательности используемых олигонуклеотидов (праймеров и зондов) приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Праймеры и зонды для ПЦР в реальном времени для обнаружения шигатоксинов 1 и 2 типа

Ген	Название праймера	Последовательность нуклеотидов (5' → 3')	Длина участка (п.н.)
stx1	stx1_f	TTTGTYACTGTSACAGCWGAAGCYTTACG	131
	stx1_r	CCCCAGTTCARWGTRAGRTCMACTC	
	stx1_p	Cy5-CTGGATGATCTCAGTGGGCGTTCTT-ATGTAA-BHQ2	
stx2	stx2_f	TTTGTYACTGTSACAGCWGAAGCYTTACG	128
	stx2_r	CCCCAGTTCARWGTRAGRTCMACTC	
	stx2_p	HEX-TCGTCAGGCACTGTCTGAAACTGC-TCC-BHQ1	

Каждый олигонуклеотид развести в воде для получения рабочей концентрации 10 мкМ/мкл. Для расчета объема воды, необходимого для разведения каждого из олигонуклеотидов до требуемой концентрации, применить формулу:

$$V [H_2O] = n \text{ нмоль [праймера/зонда]} \times 1000 / C \text{ мкМ [раствора]}.$$

Например: если количество (n) высушенного праймера/зонда в пробирке равно 27,5 нмоль, то для приготовления раствора с концентрацией [C], равной 10 мкМ, необходимо добавить H₂O в объеме

(V) 2750 мкл. Полученные растворы олигонуклеотидов хранить при минус 20 °С до 3 месяцев, однако следует избегать их многократного (более 5 раз) размораживания и замораживания.

Реакционные смеси готовить с использованием криоштатива согласно таблице 2 и таблице 3.

Таблица 2 – Компоненты реакционной смеси для детекции шигатоксина типа 1 методом ПЦР в режиме реального времени

Компонент	Объем на 1 реакцию, мкл	Конечная концентрация
Вода	12,35	
10× буфер	2,5	1х
MgCl ₂ (50 мМ)	2	4 мМ
дНТФ (10 мМ)	0,5	0,2 мМ
Прямой праймер stx1_f (10 мкМ)	0,75	300 нМ
Обратный праймер stx1_r (10 мкМ)	0,75	300 нМ
Зонд stx1_p (10 мкМ)	0,75	300 нМ
ДНК-полимераза (5 ед/мкл)	0,4	2 ед
Всего:	20	

Таблица 3 – Компоненты реакционной смеси для детекции шигатоксина типа 2 методом ПЦР в режиме реального времени

Компонент	Объем на 1 реакцию, мкл	Конечная концентрация
Вода	11,85	
10× буфер	2,5	1х
MgCl ₂ (50 мМ)	2	4 мМ
дНТФ (10 мМ)	0,5	0,2 мМ
Прямой праймер stx2_f (10 мкМ)	0,75	300 нМ
Обратный праймер stx2_r (10 мкМ)	0,75	300 нМ
Зонд stx2_p (10 мкМ)	1,25	500 нМ
ДНК-полимераза (5 ед/мкл)	0,4	2 ед
Всего:	20	

Объем компонентов смеси рассчитывать исходя из количества исследуемых образцов (n) + 1 отрицательный контроль выделения + 1 отрицательный контроль ПЦР (вода) + 1 положительный контроль ПЦР.

Взять соответствующее количество ПЦР-пробирок/ стрипов/ планшет объемом 0,2 мл. В каждую пробирку (или лунку стрипа/ планшета) внести по 20 мкл реакционной смеси и по 5 мкл исследуемого или контрольного образца. Положительный контроль добавлять в последнюю очередь.

Перед постановкой в амплификатор осадить капли со стенок пробирок кратким центрифугированием (2-3 секунды).

Режим амплификации представлен в таблице 4. Считывание флуоресценции установить после каждого этапа элонгации.

Таблица 4 – Режим амплификации

Температура, °С	Время, секунда	Кол-во циклов, шт
95	180	1
95	10	45
60	60 детекция флуоресцентного сигнала	

Детекцию флуоресцентного сигнала для гена *stx1* проводить по каналу Cy5, для гена *stx2* – по каналу HEX.

Установить пробирки или планшет в ячейки реакционного модуля прибора. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала. По окончании выполнения программы приступить к учету результатов.

3.5 Учет результатов и оценка достоверности

После окончания ПЦР произвести учет полученных результатов. Пороговую линию установить вручную на уровне 10 % максимального уровня флуоресценции положительного контрольного образца в последнем цикле амплификации (Cy5 и HEX). При этом кривая флуоресценции положительного контрольного образца должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции, переходящего в линейный подъем.

Результаты интерпретировать на основании наличия пересечения кривой флуоресценции на каждом из используемых каналов с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) значения порогового цикла (Ct).

Результат ПЦР считать положительным, если кривая флуоресценции имеет типичную для ПЦР в режиме реального времени S-образную форму, однократно пересекается с пороговой линией и значение порогового цикла Ct для канала ниже или равно 40. Результат считать отрицательным в случае отсутствия кривой типичной формы или отсутствия пересечения с пороговой линией (нет значения Ct) или значение порогового цикла Ct выше 40 (таблица 5).

Результат выполненной ПЦР считать достоверным, если для положительного контроля ПЦР сигнал флуоресценции присутствует по обоим каналам, а для отрицательного контроля выделения и отрицательного контроля ПЦР сигнал флуоресценции отсутствует.

Таблица 5 – Учет результатов ПЦР по каналам Cy5 и HEX

Значение порогового цикла Ct		Результат исследования
stx1 (Cy5)	stx2 (HEX)	
выше 40 или нет значения	выше 40 или нет значения	отрицательный
ниже или равно 40	выше 40 или нет значения	положительный – выявлена ДНК STEC
выше 40 или нет значения	ниже или равно 40	положительный – выявлена ДНК STEC
ниже или равно 40	ниже или равно 40	положительный – выявлена ДНК STEC

3.6 Определение типа гемолитико-уремического синдрома

При обнаружении в биологическом материале ДНК STEC, ГУС определяется как типичный, обусловленный шигатоксин-продуцирующей *Escherichia coli* (STEC- ГУС).

4 Перечень возможных ошибок и пути их устранения

Проблемы	Возможные причины	Способы решения
Зафиксировано значение порогового цикла C_t в отрицательном контроле выделения по любому из каналов	Перекрестная контаминация при выделении ДНК	Предпринять меры по выявлению и ликвидации источника возможной контаминации. Повторить исследование для всех положительных образцов, начиная с выделения ДНК, с использованием нового отрицательного контроля
Зафиксировано значение порогового цикла C_t в отрицательном контроле ПЦР по любому из каналов	Перекрестная контаминация при выполнении ПЦР	Предпринять меры по выявлению и ликвидации источника возможной контаминации. Повторить исследование для всех положительных образцов.
Отрицательный результат для всех исследуемых образцов, включая положительный контроль	Пропущен компонент ПЦР смеси, задан неправильный режим амплификации, использованы реагенты с истекшим сроком годности	Повторить исследование для всех образцов с использованием свежих реагентов и (или) новых наборов праймеров и зондов, проверить правильность приготовления реакционной смеси и соблюдение режима амплификации
В положительном контроле значение порогового цикла C_t отсутствует или превышает граничное значение,	ДНК контрольных образцов деградировала или не была добавлена. Разрушились зонды, меченные флуоресцентным красителем, или праймеры.	Повторить амплификацию для всех отрицательных образцов с использованием нового положительного контроля.