

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**



**УТВЕРЖДАЮ**  
Первый заместитель Министра

Ю.Л.Горбич  
2025 г.

Регистрационный № 171-1204

**МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЕНОВ КАРБАПЕНЕМАЗ ГРУППЫ ОХА  
(ОКСАЦИЛЛИНАЗЫ)  
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ  
У ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ  
(инструкция по применению)**

**УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:** учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»

**АВТОРЫ:** Буткевич В.В, канд. хим. наук., доц. Бабенко А.С., д-р мед. наук, проф. Тапальский Д.В., д-р мед. наук, проф. Жаворонок С.В.

Минск, 2024

## ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

ИСМП	- инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
дНТФ	- дезоксинуклеотидтрифосфат
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
ПЦР-РВ	- полимеразная цепная реакция в режиме реального времени
МБЛ	- металло- $\beta$ -лактамазы
УФ	- ультрафиолетовое излучение
ЭДТА	- этилендиаминтетраацетат
КРС	- <i>Klebsiella Pneumoniae</i> Carbaenemase
ОХА	- Бета-лактамазы класса D (Oxacillinase)

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен метод выявления генов сериновых карбапенемаз, обеспечивающих устойчивость энтеробактерий к карбапенемам и другим бета-лактамам антибиотикам, с использованием полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ), который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на лечение заболеваний и патологических состояний, вызванных энтеробактериями.

Инструкция предназначена для врачей-бактериологов, врачей-инфекционистов, врачей-лаборантов, врачей лабораторной диагностики, иных врачей-специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам с инфекциями вызванными бактериальными агентами в условиях медицинского стационара, и/или в амбулаторных условиях, и/или в условиях отделения дневного пребывания.

## **1. ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ МЕТОДА**

генерализованные инфекции;  
инфекции нижних дыхательных путей;  
инфекции мочевыделительной системы;  
раневые инфекции;  
интраабдоминальные инфекции;  
инфекции новорожденных.

## **2. ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ**

Отсутствуют.

## **3. ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМЫХ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ, РАСХОДНЫХ МАТЕРИАЛОВ И ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ**

### **1. Лабораторное оборудование и материалы:**

- 1.1. ПЦР-бокс с ультрафиолетовым излучением (УФ);
- 1.2. микроцентрифуга-вортекс не менее 500×g;
- 1.3. микроцентрифуга для пробирок вместимостью 1,5-2,0 мл не менее 8000×g;
- 1.4. программируемый термоциклер для проведения ПЦР-РВ в комплекте с компьютером и программным обеспечением для управления прибором, хранения данных и анализа;
- 1.5. твердотельный термостат для микропробирок вместимостью 1,5 мл и 2,0 мл с функцией охлаждения и нагрева (-10°C ... +100°C);
- 1.6. холодильник бытовой +2...+8°C с морозильной камерой (-12...-22°C);
- 1.7. дозаторы переменного объема (0,5–10; 5–50; 20–200; 100–1000 мкл);
- 1.8. штатив для пробирок вместимостью 0,2 мл;
- 1.9. штатив для пробирок вместимостью 1,5 мл и 2,0 мл;
- 1.10. ёмкость для сброса использованных наконечников;
- 1.11. пробирки для ПЦР объёмом 0,2 мл с оптическими крышками;
- 1.12. пробирки объёмом 1,5 и 2,0 мл;

1.13. наконечники для дозатора с фильтрами объёмом до 10 мкл, до 200 мкл и до 1000 мкл;

## **2. Наборы и реактивы:**

2.1. набор для выделения геномной ДНК из образцов бактериальной культуры;

2.2. набор для проведения ПЦР-РВ;

2.3. олигонуклеотидные праймеры и зонды для ПЦР-РВ.

## **3. Средства индивидуальной защиты:**

3.1 неопудренные перчатки;

3.2 халат лабораторный;

3.3 раствор антисептика, предназначенный для обработки рук персонала;

3.4 раствор дезинфицирующий для инактивации биологического материала.

## **4. ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДА**

Все этапы работы – выделения дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) из бактериальных культур и проведение ПЦР-РВ, проводятся в отдельных помещениях согласно правилам организации ПЦР-лаборатории – инструкция по применению от 13.11.2008 №090-1008 «Организация работ в лабораториях, использующих метод полимеразной цепной реакции (ПЦР)».

Получение биологического материала проводится в соответствии с приказом Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 10.11.2015 №1123 «Об утверждении Инструкции о порядке организации преаналитического этапа лабораторных исследований». При работе с образцами биологического материала необходимо соблюдать меры безопасности как при работе с потенциально инфицированным материалом. Для выделения ДНК из бактерий используют суточную культуру.

Технология применения метода включает три этапа:

Этап 1 – выделение геномной ДНК из бактериальной чистой культуры (после 24 часов инкубации на селективных средах). Выделение геномной ДНК осуществляется согласно инструкции производителя набора реагентов. Хранение полученных образцов ДНК осуществляется при температуре +2...+8°C в течение 30 суток. Для длительного хранения (более 30 суток) осуществляется использование бытовых морозильных камер (-12...-22°C).

Этап 2 – выявления генов сериновых карбапенемаз группы ОХА с использованием ПЦР-РВ посредством молекулярно-генетического исследования образцов ДНК. Олигонуклеотиды в таблице 1 должны поставляться в лиофилизированном виде в защищенной от света упаковке. Каждый олигонуклеотид и зонд растворяют отдельно в воде для ПЦР до конечной концентрации 100 пикомоль/мкл.

Таблица 1. – Олигонуклеотидные последовательности праймеров и зондов, используемые для выявления гена устойчивости бактерий к антибиотикам ОХА – устойчивость к карбапенемам с использованием ПЦР в режиме реального времени.

Код	Последовательность	Мод.5'	Мод.3'
ОХА48_F	TGGCTTGTTTGACAATACGC		
ОХА48_R	CACGGAGCAAATCAGCTTTT		
ОХА48_P	GCTGCGCTCCGATACGTGTA	FAM	BHQ1

Выявление методом ПЦР-РВ проводят с использованием готовой смеси для ПЦР-РВ или отдельных компонентов с соблюдением следующих требований: конечный объем реакционной смеси (в пробирке) включающей все компоненты для проведения ПЦР-РВ, а также ДНК-матрицу – 25 мкл; концентрация ионов магния в реакционной смеси 2 мМ (2 миллимоль/литр); концентрация дезоксинуклеотидтрифосфатов (дНТФ) в реакционной смеси 0,2 мМ (миллимоль/литр) каждого (дА, дТ, дЦ и дГ); количество термостабильной Taq ДНК-полимеразы 1,25 единицы активности (1,25 ед.); количество ДНК-матрицы 50-500 нг; количество каждого олигонуклеотида, включая зонды для ПЦР-РВ 10 пикомоль (концентрация 400 наномоль/литр). При использовании растворов олигонуклеотидов с концентрацией 100 пикомоль/мкл требуется использовать 0,1 мкл раствора каждого олигонуклеотида. Рекомендуется готовить общую смесь всех 3 олигонуклеотидов и вносить по 0,3 мкл такого раствора для проведения единичного исследования (реакции).

Пример составления схемы постановки анализа методом ПЦР-РВ приводится в таблицах 2 и 3 с использованием готовой смеси для ПЦР-РВ и отдельных компонентов для проведения ПЦР-РВ соответственно. Программа термоциклирования представлена в таблице 4. Детекция осуществляется по каналу FAM в конце каждого цикла на этапе элонгации. При высоких концентрациях ДНК количество циклов может быть уменьшено до 40.

Таблица 2. – Схема постановки ПЦР-РВ с использованием готовой смеси

№	Компонент	Объем на 1 реакцию, мкл
1	Вода для ПЦР	до 25
2	Готовая смесь для проведения ПЦР-РВ	12,5
3	Смесь олигонуклеотидов	0,4
4	ДНК-матрица	1-5

Таблица 3. – Схема постановки ПЦР-РВ с использованием отдельных компонентов

№	Компонент	Объем на 1 реакцию, мкл
1	Вода для ПЦР	до 25
2	Раствор хлорида магния (50 мМ)	1
3	Смесь дНТФ (10 мМ)	0,25
4	Смесь олигонуклеотидов	0,4
5	Буферный раствор 10х	2,5
6	Раствор ДНК-полимеразы (5 ед/мкл)	0,25
7	ДНК-матрица	1-5

Таблица 4. – Программа термоциклирования

Этап	Температура, °С	Продолжительность	Количество циклов
Денатурация первичная	95	5 мин	1
Денатурация	95	5 сек	40
Отжиг/Элонгация	60	50 сек	

Этап 3 – интерпретация результатов.

Результат считается положительным при пересечении кривой флуоресценции пороговой линии (определяется прибором) в диапазоне 5-45 цикла амплификации. Результат считается отрицательным при отсутствии кривой флуоресценции.

При выявлении генов устойчивости (положительный результат) бактерий к антибиотикам ОХА – устойчивость к карбапенемам, следует планировать схему лечения с учетом данных о наличии устойчивости.

### **ВОЗМОЖНЫЕ ОШИБКИ ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ МЕТОДА И СПОСОБЫ ИХ УСТРАНЕНИЯ**

Использование методики ПЦР-РВ подразумевает строгое следование всем правилам по организации и проведению исследования в ПЦР-лаборатории, которые становятся причиной ошибочных результатов. При использовании метода ПЦР-РВ для выявления генов устойчивости бактерий к антибиотикам основной причиной ошибок могут являться факторы, связанные с нарушением правил отбора, хранения и транспортировки проб. Выделенная культура может быть недостаточно чистой и содержать другие микроорганизмы.

Во избежание данных ошибок необходимо четкое соблюдение правил получения, хранения и транспортировки биологического материала; выполнение процедур, связанных с проведением ПЦР-исследования.