

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель Министра

Е.Л. Богдан

« 16 » _____ 2020 г.

Регистрационный № 146-1220



**МЕТОД КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ *T. DENTICOLA*,
P. GINGIVALIS, *B. FORSYTHUS* В СОДЕРЖИМОМ
ПАТОЛОГИЧЕСКОГО ЗУБОДЕСНЕВОГО КАРМАНА**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: учреждение образования
«Белорусский государственный медицинский университет»,
государственное учреждение «Республиканский научно-практический
центр эпидемиологии и микробиологии»

АВТОРЫ: д-р мед. наук, проф. Дедова Л.Н., канд. биол. наук
Семижон П.А., д-р мед. наук, проф. Рубникович С.П., д-р мед. наук, проф.
Денисова Ю.Л., канд. мед. наук, доц. Кандрюкевич О.В., канд. биол. наук,
Счеслёнок Е.П., Бурдейко Е.Ю., Поддубнов С.В.

Минск, 2020

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) изложен метод количественного определения *T. denticola*, *P. gingivalis*, *B. forsythus*, в содержимом патологического зубодесневого кармана с использованием полимеразной цепной реакции (далее – ПЦР), который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на диагностику и медицинскую профилактику заболеваний, вызываемых периопатогенными микроорганизмами – *T. denticola*, *P. gingivalis*, *B. forsythus*.

Настоящая инструкция предназначена для стоматологов-периодонтологов, стоматологов-терапевтов, хирургов-стоматологов-имплантологов, врачей-ортодонтов, врачей лабораторной диагностики, иных врачей-специалистов учреждений здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам, в стационарных и/или амбулаторных условиях, и/или условиях отделения дневного пребывания, страдающим заболеваниями и патологическими состояниями, сопровождающимися воспалительно-деструктивными и другими патологическими процессами в тканях периодонта.

1. Показания к применению метода:

классификация болезней периодонта профессора Л.Н. Дедовой (2002-2012-2019): **гингивит (K05):** острый, хронический, рецидивный, прогрессирующий, обратимый; **периодонтит (K05):** острый, хронический (K05.3), обострение хронического, в том числе абсцесс (K05.20, K05.21), быстро прогрессирующий (K05.4), ремиссия; **эндопериодонтит:** острый, хронический, обострение хронического, в том числе абсцесс, ремиссия; **рецессия десны (K06.0):** анатомическая (K06.2), физиологическая, симптоматическая; **периодонтальная**

атрофия (K05.5): физиологическая, симптоматическая (Q67.4, K07, K06.1), гипертрофия десны: фиброматоз (K06.10), другая гипертрофия десны (K06.18, K06.19).

2. Противопоказания к применению: отсутствуют.

3. Перечень необходимых изделий медицинской техники, изделий медицинского назначения, реактивов

Таблица 1 – Изделия медицинской техники для проведения молекулярно-генетического анализа

<i>Пробоподготовка и выделение ДНК</i>
ПЦР-бокс с УФ-рециркулятором воздуха
Микроцентрифуга высокоскоростная (с ротором для 1,5 мл пробирок типа «Эппендорф», 10000-18000xg)
Твердотельный термостат (диапазон температур -10 - +99 ⁰ С)
Микроцентрифуга-вортекс
Вакуумный аспиратор с колбой-ловушкой
Дозаторы пипеточные механические переменного объема, комплект (2 – 20 мкл; 20 – 200 мкл; 100 – 1000 мкл)
Холодильник, диапазон рабочих температур от +2 до +4 ⁰ С
Морозильная камера, диапазон рабочих температур от -16 до - 18 ⁰ С
<i>Проведение ПЦР-реакции</i>
Амплификатор (термоциклер) с системой детекции результатов реакции в режиме «реального времени»
ПЦР-бокс с УФ-рециркулятором воздуха
Микроцентрифуга-вортекс
Твердотельный термостат (диапазон температур - 10 - +99 ⁰ С)
Дозаторы пипеточные механические переменного объема, комплект (2 – 20 мкл; 20 – 200 мкл; 100 – 1000 мкл)
Холодильник, диапазон рабочих температур от +2 до +4 ⁰ С
Морозильная камера, диапазон рабочих температур от -16 до - 18 ⁰ С

Таблица 2 – Изделия медицинского назначения

Стоматологическая установка
Стандартный набор стоматологических инструментов
Периодонтальные зонды
Периодонтальные кюреты (универсальные и зоноспецифические)
Штифты стерильные стоматологические бумажные №30
Микропробирки типа эппендорф (0,2 мл);
ПЦР-пробирки/8-луночные стрипы/96-луночные планшеты объемом 0,2 мл с маркировкой «RNAse, DNAse free» (соответствующие типу используемого амплификатора для ПЦР в режиме «реального времени»);
Наконечники с аэрозольным барьером в штативах, стерильные, с маркировкой «RNAse, DNAse free» объемом 20, 200, 1000 мкл;
Наконечники без фильтра 20, 200, 1000 мкл;
Микроцентрифужные стерильные пробирки объемом 1,5 мл;
Халаты, резиновые перчатки, маски, очки (щитки) защитные медицинские, антисептик с дозатором для обработки рук персонала, фильтровальная бумага, штативы для пробирок.

Таблица 3 – Реактивы для проведения ПЦР

<i>Пробоподготовка и выделение ДНК</i>
Набор реагентов для выделения ДНК из клинического материала методом преципитации
<i>Проведение ПЦР-реакции</i>
10x буфер для Taq-полимеразы
Taq-полимераза «горячего старта» 5 ед/мкл
Хлорид магния 50 мМ
Смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (дНТФ) 10 мМ
Синтетические олигонуклеотиды и меченные гибридизационно-флуоресцентные пробы (5-20 пМ)
Вода для молекулярной биологии (свободная от RNKаз/ДНКаз)
Контрольные образцы (стандарты), pJET1.2/blunt/PG, pJET1.2/blunt/BF, pJET1.2/blunt/TD в количестве шести штук с известными концентрациями ДНК (ГЭ/мл).

Качество используемых реактивов должно соответствовать техническим требованиям, предъявляемым к реагентам для проведения молекулярно-биологических исследований.

4. Технология осуществления метода.

4.1 Получение и транспортировка образцов клинического материала.

Материалом для исследования являются пробы биологического материала (содержимое патологического зубодесневого кармана (ПЗДК) или десневой борозды) от пациентов с болезнями периодонта (легкая, средняя, тяжелая степени тяжести). Получение материала для исследования осуществляют следующим образом: предварительно удаляют наддесневые зубные отложения механическим способом, затем извлекают содержимое из десневой борозды и/или ПЗДК в области медиально-вестибулярной поверхности первого верхнего моляра; для извлечения содержимого периодонтального кармана используют стерильные стоматологические бумажные штифты №30. Бумажный штифт вводят в ПЗДК на 10 секунд, затем извлекают и помещают в микропробирку со стерильным физиологическим раствором (150 мкл) для качественного и количественного выявления генетического материала периопатогенных *T. denticola*, *P. gingivalis*, *B. forsythus* методом ПЦР; пробирку помещают на хранение при (- 20°C) до последующей транспортировки в лабораторию. Транспортировку образцов в лабораторию осуществляют при температуре +4±2°C.

4.2 Качественное и количественное выявление периопатогенных *T. denticola*, *P. gingivalis*, *B. forsythus* методом ПЦР в режиме «реального времени»

4.2.1 Выделение ДНК из образцов клинического материала

Выделение ДНК из проб клинического материала осуществляют с использованием зарегистрированных в установленном порядке и разрешенных к применению коммерческих наборов реагентов,

позволяющих выделить тотальную ДНК методом преципитации. Выделенные образцы ДНК могут храниться при $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$ в течение года.

4.2.2 Проведение количественной ПЦР в режиме «реального времени»

Для выявления генетического материала периопатогенных *T. denticola*, *P. gingivalis*, *B. forsythus* с использованием количественной ПЦР в режиме «реального времени», готовят реакционную смесь, включающую следующие компоненты из расчета на одну реакцию: Primer PG-F (0,5 μM), Primer PG-R (0,5 μM), Probe PG_FAM (0,4 μM), Primer TF-F (0,5 μM), Primer TF-R (0,5 μM), Probe TF_ROX (0,2 μM), Primer TD-F (0,5 μM), Primer TD-R (0,5 μM), Probe TD_By-5 (0,4 μM), dNTP mix (0,2 мМ), Taq-buffer (1 x), MgCl_2 (4 мМ), Taq-polimerase (2,5 ME), H_2O (mQ) до конечного объема реакционной смеси 40 мкл. Объем вносимой ДНК - 10 мкл.

Режим амплификации: 1. 95°C – 3 мин.; 2. 94°C – 15 с, 54°C – 30 с, 72°C – 45 с, количество циклов – 35.

Для количественного определения каждого возбудителя в исследуемом образце используется по два контрольных образца (стандарта). Перечень используемых олигонуклеотидов (праймеров) и контрольных образцов приведены в таблицах 3 и 4.

Таблица 3 – Структура праймеров для проведения количественной ПЦР для выявления ДНК *T. denticola*, *P. gingivalis*, *B. forsythus*

Название праймера	Нуклеотидная последовательность 5' → 3'
PG-F:	GCGCTCAACGTTTCAGCCT
PG-R:	CACGAATTCCGCCTGCC
PG FAM:	FAM-GGCAGTTTCAACGGC-BHQ
TF-F:	TGAAAGTTTGTTCGCTTAACGATAAAA
TF-R:	TCGTGCTTCAGTGTCAGTTATACCT

Продолжение таблицы 3

TF ROX:	ROX-CATTCCGCCTACTTTCATC-BHQ2
TD-F:	CTTCCGCAATGGACGAAAGT
TD-R:	CAAAGAAGCATTCCCTCTTCTTCTTA
TD_By-5:	By5-GTAAAATTCTTTTGCAGATGAAG-BHQ2

Таблица 4 – Контрольные образцы (стандарты) для проведения количественной ПЦР

№	Наименование стандартного образца	Стандарт 1 (ГЭ/мл)*	Стандарт 2 (ГЭ/мл)*
1	pJET1.2/blunt/PG	$3,5 \cdot 10^7$	$3,5 \cdot 10^3$
2	pJET1.2/blunt/BF	$2,6 \cdot 10^6$	$2,6 \cdot 10^3$
3	pJET1.2/blunt/TD	$1,3 \cdot 10^5$	$1,3 \cdot 10^3$

*- могут быть использованы другие концентрации стандартных образцов.

В результате проведения ПЦР (рисунок 1) амплифицируются специфические фрагменты ДНК, накопление которых регистрируется по нарастанию флуоресценции: по каналу Cy5 - для *T. denticola* и стандартных образцов pJET1.2/blunt/TD (1B), по каналу FAM - для *P. gingivalis* и стандартных образцов pJET1.2/blunt/PG (1A), по каналу ROX - для *B. Forsythus* и стандартных образцов pJET1.2/blunt/BF (1B).

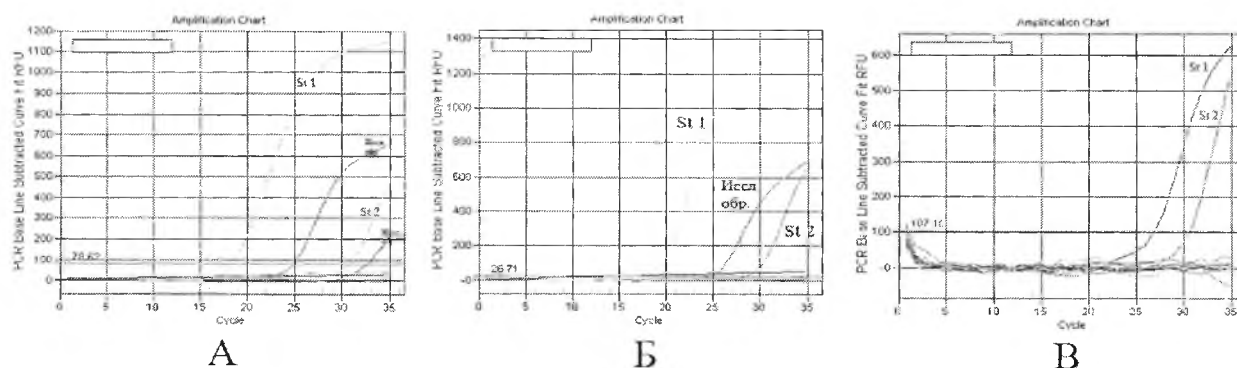


Рисунок 1 - Анализ кривых флуоресценции в результате постановки количественной ПЦР для выявления *T. denticola*, *P. gingivalis*, *B. forsythus*

4.2.3 Анализ и интерпретация результатов

Анализ и интерпретацию результатов проводят с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». Образец учитывается как положительный на наличие ДНК *T. denticola*, если для этого образца получено значение порогового цикла «Ct» по каналу Cy5 меньше либо равное 35; образец учитывается как положительный на наличие ДНК *P. gingivalis*, если для этого образца получено значение «Ct» по каналу FAM меньше либо равное 35; образец учитывается как положительный на наличие ДНК *B. forsythus*, если для этого образца получено значение «Ct» по каналу ROX меньше либо равное 35. Данные о количественном содержании каждого из возбудителей рассчитываются автоматически относительно контрольных образцов (стандартов).

5. Заключение

Использование в стоматологии молекулярно-биологического метода (ПЦР) повышает эффективность исследований, направленных на выявление в клиническом материале пациентов периопатогенных бактерий. Использование метода количественной ПЦР дает возможность прогнозировать стабилизацию или развитие болезней периодонта, выявлять заболевание до проявления выраженных воспалительно-деструктивных признаков или других патологических процессов, а также определяет роль периопатогенов в прогрессировании заболевания.

6. Перечень возможных осложнений или ошибок при выполнении и пути их устранения.

При соблюдении перечня указанных показаний, а также точном использовании техники выполнения манипуляций, изложенных в настоящей инструкции, осложнения и побочные эффекты исключены.

Проведение молекулярно-генетических исследований подразумевает соблюдение правил на всех этапах работы: взятие биоматериала, транспортировка, хранение и пробоподготовка; выделение нуклеиновых кислот, амплификация и детекция. Несоблюдение данных правил приводит к возникновению ошибок, которые становятся причиной ложноположительных и ложноотрицательных результатов, что в свою очередь, приводит к неверной интерпретации результатов.

Причины ложноположительных результатов: перекрестная контаминация от образца к образцу в процессе пробоподготовки и на стадии выделения ДНК; загрязненные в результате предыдущих исследований реагенты, необработанный инструментарий.

Причины появления ложноотрицательных результатов: деградация исследуемой ДНК, несоблюдение технологии выделения нуклеиновых кислот, несоблюдение технологии подготовки ПЦР смеси, наличие ингибиторов ПЦР, использование реагентов с истекшим сроком годности, не соответствующий режим амплификации (неисправность оборудования). Пути устранения: выделить ДНК повторно, строго следуя инструкции, соблюдая холодовую цепь; на всех этапах исследования необходимо использование одноразовой стерильной пластиковой посуды и наконечников во избежание внесения ингибиторов реакции.