

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель Министра –

Главный государственный санитарный
врач Республики Беларусь

Н.П. Жукова

«20» июля 2019 г.

Регистрационный № 004-0619

МЕТОД ГЕНОТИПИРОВАНИЯ *CHLAMYDIA TRACHOMATIS*

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический
центр эпидемиологии и микробиологии»

АВТОРЫ: канд. биол. наук Рубаник Л.В., д-р. мед. наук, профессор
Полещук Н.Н., Капустина Ю.М.

Минск, 2019

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкции) изложен метод генотипирования *Chlamydia trachomatis*, который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на диагностику и медицинскую профилактику заболеваний, вызываемых данным микроорганизмом.

Инструкция предназначена для врачей-микробиологов, врачей-эпидемиологов, врачей лабораторной диагностики и иных врачей – специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам в стационарных и/или амбулаторных условиях, и/или в условиях отделения дневного пребывания.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Патологические состояния, вызываемые *C. trachomatis* (МКБ-10 – A56, A74).

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Отсутствуют.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМЫХ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ, РЕАГЕНТОВ, РАСХОДНЫХ МАТЕРИАЛОВ

Изделия медицинской техники:

- термоциклер для проведения ПЦР;
- бокс ламинарный с бактерицидной лампой;
- холодильник (от + 2°C до +8 °C) с морозильной камерой (от -16°C до -20°C);
- термостат твердотельный для микропробирок на 1,5 мл и 0,5 мл;
- микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 13 тыс. об/мин;
- вортекс-шейкер;

- дозаторы пипеточные механические переменного объема, комплект (1-10 мкл; 2-20 мкл; 20-200 мкл; 200-1000 мкл);
- источник постоянного тока для электрофореза;
- камера для горизонтального электрофореза;
- трансиллюминатор ультрафиолетовый для просмотра гелей.

Изделия медицинского назначения:

- среда транспортная для мазков-соскобов из урогенитального тракта;
- зонд гинекологический одноразовый или цитощетка;
- пробирки пластиковые типа «Эппендорф» (0,5 мл и 1,5 мл);
- наконечники полимерные для дозаторов пипеточных;
- штативы для пробирок;
- набор реагентов для выделения ДНК из клинического материала (соскоба слизистых оболочек урогенитального тракта человека);
- набор реагентов для обнаружения ДНК *C. trachomatis*.

Реактивы:

- ПЦР смесь, содержащая буфер для Taq-полимеразы, Taq-полимеразу, MgCl₂ и смесь дНТФ;
- олигонуклеотидные праймеры (концентрация 25 пМ);
- стерильная бидистиллированная свободная от нуклеаз вода;
- агароза;
- маркер молекулярного веса (от 50 п.о. до 1500 п.о.);
- ТАЕ-буфер;
- бромистый этидий.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ МЕТОДА

1.1 Получение, транспортировка и хранение биологического материала

Материалом для исследования является соскоб эпителиальных клеток из цервикального канала, уретры, влагалища. Для взятия соскоба используется зонд гинекологический одноразовый или цитощетка.

Материал помещают в стерильную пробирку объемом 1,5 мл, содержащую 500 мкл коммерческой транспортной среды, маркируют и доставляют в лабораторию в плотно закрытой пробирке. Условия транспортировки и хранения: при комнатной температуре от +18°C до +25°C до 48 часов; при температуре от +2°C до +8°C до 7 суток; для более длительного хранения (до 1 г.) образцы необходимо заморозить при температуре -20°C и ниже. Не допускается повторное замораживание-оттаивание образцов.

1.2 Выделение ДНК из биологического материала (мазка-соскоба из урогенитального тракта)

Выделение тотальной ДНК проводят стандартным методом с использованием коммерческих наборов, предназначенных для выделения ДНК и зарегистрированных в Республике Беларусь в установленном порядке. Выделенные образцы ДНК хранят при -20°C не более 1 года. Не допускается повторное замораживание-оттаивание образцов.

1.3 Детекция ДНК *S. trachomatis* с помощью ПЦР в режиме реального времени

Для выявления ДНК *S. trachomatis* используют коммерческие ПЦР тест-системы с детекцией флуоресцентного сигнала продуктов реакции в режиме реального времени.

1.4 Определение принадлежности изолята к геногруппе *C. trachomatis*

В случае обнаружения ДНК *C. trachomatis*, на следующем этапе определяют принадлежность изолята возбудителя к геногруппе. Для этого проводят 3 параллельных ПЦР с использованием группоспецифических праймеров к участкам гена *ompA* *C. trachomatis*, представленных в таблице 1.

Таблица 1 – Группоспецифические праймеры *C. trachomatis*

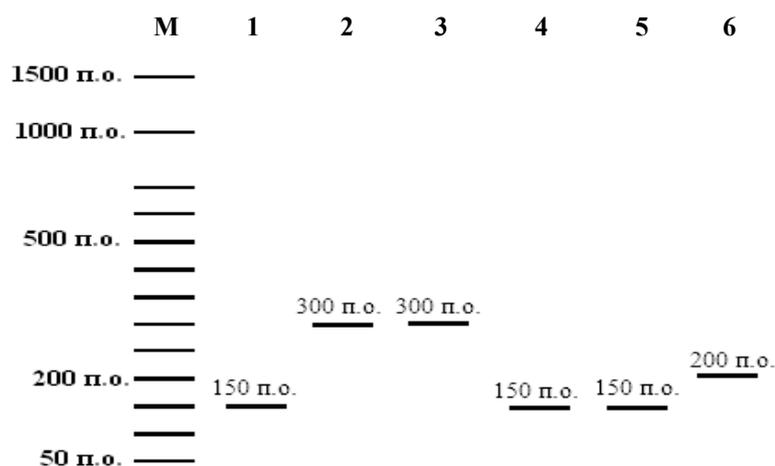
Группа	Последовательность, 5' - 3'
В	F - 5'-GCTTAGATCAATCTGTTGTTGA-3' R - 5'-TCTAGGCTTATGGATAGTAAAC-3'
С	F - 5'-AACTTAGTTGGATTATTCGGAA-3' R - 5'-TCTGTATAAAGCTCAACCA-3'
Промежуточная	F - 5'-CTGTGGTGGAACCTGTATACA-3' R - 5'-TGCCACTCATGGTAATCAA-3'

Объем реакционной смеси 25 мкл включает: 25 пмоль раствора прямого праймера, 25 пмоль раствора обратного праймера, 12,5 мкл готовой смеси для ПЦР, бидистиллированная вода до объема 20 мкл, 5 мкл выделенной ДНК исследуемого образца. Амплификацию проводят в автоматическом режиме по заданным программам, представленным в таблице 2.

Таблица 2 – Условия амплификации группоспецифических фрагментов гена *ompA* *S. trachomatis*

Группа	Условия амплификации		
	Температура	Время	Количество циклов
В	95 °С	5 мин	1
	95 °С	30 сек	35
	57 °С	30 сек	
	72 °С	30 сек	
	72 °С	5 мин	1
С	95 °С	5 мин	1
	95 °С	30 сек	35
	51 °С	30 сек	
	72 °С	30 сек	
	72 °С	5 мин	1
Промежуточная	95 °С	5 мин	1
	95 °С	30 сек	35
	53 °С	30 сек	
	72 °С	30 сек	
	72 °С	5 мин	1

Анализ продуктов амплификации осуществляют методом электрофореза в 1,5% агарозном геле с последующим окрашиванием бромистым этидием (0,5 мг/мл) и детекцией в ультрафиолетовом трансиллюминаторе (312 нм). Принадлежность исследуемой пробы к группе В устанавливается в случае визуализации продукта амплификации в агарозном геле на уровне 200 п.о. маркера молекулярной массы, к группе С – на уровне 150 п.о., к промежуточной группе – на уровне 300 п.о. (рисунок 1).



линии 1, 4, 5 – группа С; линии 2, 3 – промежуточная группа;
линия 6 – группа В; М - маркер молекулярной массы (50 – 2500 п.о.)

Рисунок 1 – Схема учета реакции амплификации с группоспецифическими праймерами к участкам гена *ompA* *C. trachomatis*

1.5 Определение генотипа *C. trachomatis*

Установив принадлежность изолята к группе *C. trachomatis*, определяют его генотип. Для этого при помощи ПЦР проводят внутригрупповое типирование с использованием типоспецифических праймеров, представленных в таблице 3.

Таблица 3 – Типоспецифические праймеры *C. trachomatis*

Группа	Генотип	Последовательность, 5' - 3'
В	Е	F - 5'- ACACAGATACTGCCTTCTCTTG -3' R - 5'- CTTGCTTGCCACTCATGGTAAT -3'
	В	F - 5'- AGCCGAGACTATCTTTGATGTT -3' R - 5'- TCTGCGCTAGTTTTTCACATCG -3'
	D/Da	F - 5'- GTGCAGCTCCATCCACTCT-3' R - 5'- ACGCTCCACGCAAAAGTAGT -3'

С	С	F - 5'- AAGGAAGTGTGGTCTCTGCCG -3' R - 5'- AATTATACAATTATTAGAACC -3'
	J	F - 5'- ATCTTTTTTCCTAACACTGCT -3' R - 5'- TTTAGGTTTAGATTGAGCAT -3'
	Ja	F - 5'- TACTGTCAGCGATGTAGCAG-3' R - 5'- TCCCAGATATTTAATGCCAT-3'
	H	F - 5'- ATCTTCTGATTTTAATACAGC -3' R - 5'- ACTTTAGGTTTAGATTGAGCA -3'
	A	F - 5'- AACACAATCTTCTGGCTTTGAT -3' R - 5'- TGATTCAAAGCAGTGTTAGGA -3'
	K	F - 5'- TGTTCCTAACACTGCTTTGGA -3' R - 5'-AGGTTTAGATTGAGCATATTGG-3'
Промежуточная	F	F - 5'- ACGAAACCTGCTGCAGATA -3' R - 5'- TTGCCACTCATGGTAATCA -3'
	G	F - 5'- AGTGTAGTCGCAGCTAAC -3' R - 5'- ACTGTAACCTGCGTATTTG -3'

Объем реакционной смеси 25 мкл: 25 пмоль раствора прямого праймера, 25 пмоль раствора обратного праймера, 12,5 мкл готовой смеси для ПЦР, бидистиллированная вода до объема 20 мкл, 5 мкл исследуемого образца. Амплификацию проводят в автоматическом режиме по заданным программам, представленным в таблицах 4-6.

Таблица 4 – Условия амплификации типоспецифических фрагментов гена *ompA* *S. trachomatis*, относящихся к группе В

Группа	Генотип	Условия амплификации		
		Температура	Время	Количество циклов
В	Е	95 °С	5 мин	1
		95 °С	30 сек	35
		62 °С	30 сек	
		72 °С	30 сек	
		72 °С	5 мин	1
	В	95 °С	5 мин	1
		95 °С	30 сек	35
		61 °С	30 сек	
		72 °С	30 сек	
		72 °С	5 мин	1
	D/Da	95 °С	5 мин	1
		95 °С	30 сек	35
		57 °С	30 сек	
		72 °С	30 сек	
		72 °С	5 мин	1

Таблица 5 – Условия амплификации типоспецифических фрагментов гена *ompA* *S. trachomatis*, относящихся к промежуточной группе

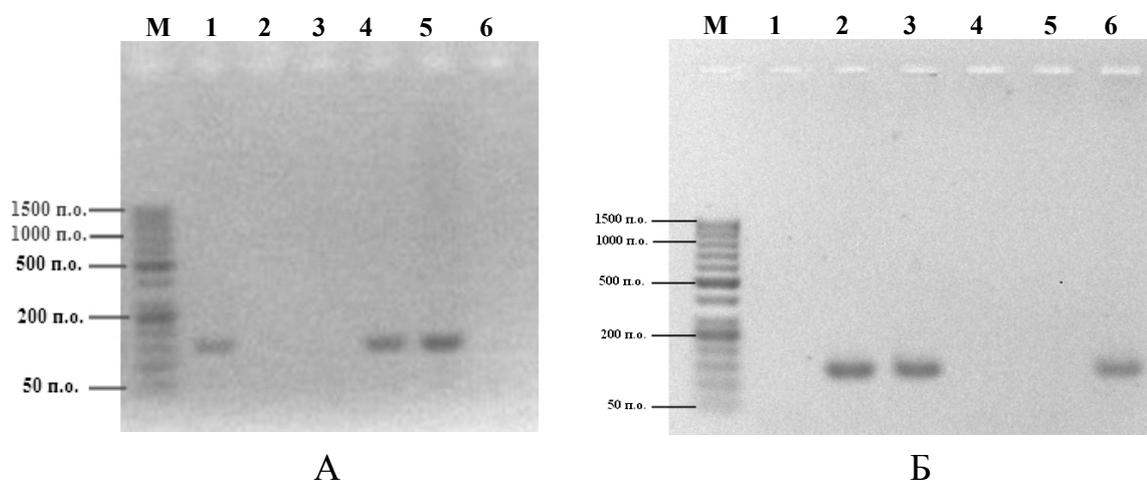
Группа	Генотип	Условия амплификации		
		Температура	Время	Количество циклов
Промежуточная	F	95 °С	5 мин	1
		95 °С	30 сек	35
		53 °С	30 сек	
		72 °С	30 сек	
		72 °С	5 мин	1
	G	95 °С	5 мин	1
		95 °С	30 сек	35
		53 °С	30 сек	
		72 °С	30 сек	
		72 °С	5 мин	1

Таблица 6 – Условия амплификации типоспецифических фрагментов гена *ompA* *S. trachomatis*, относящихся к группе С

Группа	Генотип	Условия амплификации		
		Температура	Время	Количество циклов
С	С	95 °С	5 мин	1
		95 °С	30 сек	35
		49°С	30 сек	
		72 °С	30 сек	
		72 °С	5 мин	1
	J	95 °С	5 мин	1
		95 °С	30 сек	35
		51 °С	30 сек	
		72 °С	30 сек	
		72 °С	5 мин	1
	Ja	95 °С	5 мин	1
		95 °С	30 сек	35
		53 °С	30 сек	
		72 °С	30 сек	
		72 °С	5 мин	1
	H	95 °С	5 мин	1
		95 °С	30 сек	35
		51 °С	30 сек	
		72 °С	30 сек	
		72 °С	5 мин	1
	A	95 °С	5 мин	1
		95 °С	30 сек	35
		57 °С	30 сек	
		72 °С	30 сек	
		72 °С	5 мин	1
K	95 °С	5 мин	1	
	95 °С	30 сек	35	
	57 °С	30 сек		
	72 °С	30 сек		
	72 °С	5 мин	1	

Анализ продуктов амплификации осуществляют методом электрофореза в 1,5% агарозном геле с последующим окрашиванием бромистым этидием (0,5 мг/мл) и детекцией в ультрафиолетовом трансиллюминаторе (312 нм). Результаты интерпретируют путем соответствия размера амплифицированного фрагмента, характерного для каждого генотипа *C. trachomatis*, маркеру молекулярной массы.

Пример идентификации генотипа(ов) изолятов *C. trachomatis*, относящихся к геногруппе С, представлен на рисунке 2.



(А) линии 1, 4, 5 - генотип J (152 п.о.); (Б) линии 2, 3, 6 - генотип К (145 п.о.); М - маркер молекулярной массы (50 – 2500 п.о.)

Рисунок 2 – Электрофореграмма продуктов амплификации с типоспецифическими праймерами к гену *ompA* *C. trachomatis*. Во всех случаях установлен моногенотипный вариант инфицирования.

**ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОШИБОК И
ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ**

Проблема	Возможная причина	Пути устранения
Все реакции отрицательны, включая положительный контроль	Пропущен компонент реакции; использован неподходящий режим амплификации; непригоден реагент (реагенты)	Повторить процедуру амплификации с соблюдением условий и контролем реагентов. Использовать качественные, свежие реагенты, соблюдать сроки и условия хранения; распределять реагенты по отдельным аликвотам
Нет ампликона в положительном контроле, но реакция положительна с исследуемыми пробами	ДНК контрольного образца деградировала или не была добавлена	Использовать только свежие образцы биологического материала для выделения ДНК. Использовать пробы ДНК сразу после выделения.
Ампликон в пробе отрицательного контроля	Вода или реагенты контаминированы амплифицированной ДНК	Повторить процедуру амплификации с контролем реагентов