

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель Министра –

Главный государственный санитарный
врач Республики Беларусь

А.А. Тарасенко

08 2022 г.

Регистрационный № 038-0622



МЕТОД ГЕНОТИПИРОВАНИЯ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ

РЕЗИСТЕНТНОСТИ К МЕТРОНИДАЗОЛУ

TRICHOMONAS VAGINALIS

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

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

АВТОРЫ: канд. биол. наук, доцент Рубаник Л.В., д-р. мед. наук,
профессор Полещук Н.Н., Жукова Ю.С.

Минск, 2022

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкции) изложен метод генотипирования и определения резистентности к метронидазолу возбудителя *Trichomonas vaginalis*, который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на диагностику и медицинскую профилактику заболеваний, вызываемых данным микроорганизмом.

Инструкция предназначена для врачей лабораторной диагностики, врачей-лаборантов, врачей-эпидемиологов, врачей-дерматовенерологов, врачей-гинекологов, врачей-урологов 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 *T. vaginalis* (МКБ-10 – A59).

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Отсутствуют.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМЫХ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ, РЕАГЕНТОВ, РАСХОДНЫХ МАТЕРИАЛОВ

Изделия медицинской техники:

- амплификатор 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;
- центрифуга для пробирок типа Эппендорф объемом 1,5 мл;
- микроцентрифуга-встряхиватель типа Vortex;
- весы лабораторные электронные;
- дозаторы пипеточные механические переменного объема (1-10 мкл; 2-20 мкл; 20-200 мкл; 200-1000 мкл);
- источник постоянного тока для электрофореза;
- форма для заливки геля и гребенки;
- 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 объемом 0,2 мл, 0,5 мл и 1,5 мл;
- наконечники полимерные для дозаторов пипеточных;
- штативы для микропробирок;
- набор реагентов для выделения нуклеиновых кислот из клинического материала (мазок-соскоб слизистых оболочек урогенитального тракта человека);
- набор реагентов для обнаружения ДНК *T. vaginalis*.
- набор реагентов для проведения обратной транскрипции;

Реактивы:

- ПЦР смесь, содержащая буфер для Taq-полимеразы, Taq-полимеразу, $MgCl_2$ и смесь дНТФ;
- смесь для рестрикции, содержащая буферы для ферментов рестрикции и рестриктазы HindII, MseI и RsaI;

- олигонуклеотидные праймеры (концентрация 25 пМ);
- стерильная бидистиллированная вода свободная от нуклеаз;
- агароза;
- маркер молекулярного веса (от 50 п.о. до 1500 п.о.);
- буфер для загрузки образцов в гели;
- ТАЕ-буфер;
- бромистый этидий.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ МЕТОДА

1.1 Получение, транспортировка и хранение биологического материала

Материалом для исследования является мазок-соскоб эпителиальных клеток слизистых оболочек урогенитального тракта человека, моча, секрет предстательной железы. Для взятия соскоба у используется зонд гинекологический одноразовый или цитощетка, ложка Фолькмана.

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 года) образцы необходимо заморозить при температуре -20°C и ниже. Не допускается многократное замораживание-оттаивание образцов.

1.2 Выделение нуклеиновых кислот из биологического материала

Выделение нуклеиновых кислот проводят с использованием коммерческих наборов, предназначенных для выделения нуклеиновых кислот и зарегистрированных в Республике Беларусь в установленном порядке. Выделенные образцы нуклеиновых кислот хранят при -20°C не более года. Не допускается многократное замораживание-оттаивание образцов.

1.3 Детекция ДНК *T. vaginalis* с помощью ПЦР

Для выявления ДНК *T. vaginalis* используют коммерческие ПЦР тест-системы с электрофоретической детекцией или с детекцией флуоресцентного сигнала продуктов реакции в режиме реального времени.

1.4 Генотипирование изолятов *T. vaginalis*

Генотипирование изолятов *T. vaginalis* основано на анализе полиморфизма длин рестрикционных фрагментов гена актина.

1.4.1 Реакция амплификации гена актина *T. vaginalis*

В случае обнаружения ДНК *T. vaginalis*, следующим этапом является постановка реакции амплификации участка гена актина. Проводят двухраундовую ПЦР с набором внешних и внутренних праймеров (таблица 1).

Таблица 1 – Набор праймеров для проведения первого этапа генотипирования участка гена актина *T. vaginalis*

Праймеры	Последовательность, 5' - 3'
Внешние	Tv8S(F): 5'-TCTGGAATGGCTGAAGAAGACG-3' Tv9R(R): 5'-CAGGGTACATCGTATTGGTC-3'
Внутренние	Tv10S(F): 5'-CAGACACTCGTTATCG-3' Tv11R(R): 5'-CGGTGAACGATGGATG-3'

Амплификацию осуществляют в автоматическом режиме по программам, представленным в таблице 2 и 3. Реакцию с внутренними праймерами выполняют в объеме реакционной смеси 50 мкл для последующей постановки реакции рестрикции.

Таблица 2 – Условия амплификации участка гена актина *T. vaginalis* с внешними праймерами

TV8S/TV9R		Концентрации		Кол-во на 1 пробу, мкл
Буфер А 10х				2,5
MgCl2		50 мМ		1,5
дНТФ		10 мМ		0,5
ДНК-полимераза ArtStart		5 ед/мкл		0,2
Прямой праймер (TV8S)		10 мкМ		2,5
Обратный праймер (TV9R)		10 мкМ		2,5
H2O		до 20 мкл		10,3
+ 5 мкл ДНК				
ПРОГРАММА АМПЛИФИКАЦИИ				
1. Начальная денатурация		95°C	5 мин	1 повтор
2.	Доп. денатурация	95°C	45 сек	60 повторов Со 2 цикла 10 циклов со снижением на 1°C
	Отжиг	62-52°C	45 сек	
	Элонгация	72°C	1 мин	
3. Фин. элонгация		72°C	10 мин	1 повтор

Таблица 3 – Условия амплификации участка гена актина *T. vaginalis* с внутренними праймерами

TV10S/TV11R		Концентрации		Кол-во на 1 пробу, мкл
Буфер А 10х				5,0
MgCl2 50 мМ		50 мМ		3,0
дНТФ		10 мМ		1,0
ДНК-полимераза ArtStart		5 ед/мкл		0,4
Прямой праймер (TV10S)		20 мкМ		1,0
Обратный праймер (TV11R)		20 мкМ		1,0
H2O		до 40 мкл		28,6
+10 мкл ДНК				
ПРОГРАММА АМПЛИФИКАЦИИ				
1. Начальная денатурация		95°C	5 мин	1 повтор
2.	Доп. денатурация	95°C	45 сек	50 повторов
	Отжиг	53°C	45 сек	
	Элонгация	72°C	90 сек	
3. Фин. элонгация		72°C	10 мин	1 повтор

Анализ продуктов амплификации осуществляют методом электрофореза в 2,0% агарозном геле с последующим окрашиванием бромистым этидием (0,5 мг/мл) и детекцией в ультрафиолетовом трансиллюминаторе (312 нм). В случае визуализации продукта амплификации в агарозном геле на уровне 1100 п.о. маркера молекулярной массы проводят реакцию рестрикции исследуемой пробы. Если амплификата не отмечается, то пробу повторно выделяют и постановку реакции повторяют.

1.4.2 Реакция рестрикции

На следующем этапе проводят реакцию рестрикции для образцов с визуализированной полосой ампликона согласно протоколу, приведенному в таблице 4.

Таблица 4 – Протокол реакции рестрикции продуктов амплификации участка гена актина *T. vaginalis*

Рестрикция	<i>Hind</i> III	<i>Rsa</i> I	<i>Mse</i> I
H ₂ O	17 мкл	17 мкл	17 мкл
10x буфер для фермента	Tango 2 мкл	Tango 2 мкл	R 2 мкл
ДНК	10 мкл	10 мкл	10 мкл
Рестриктаза	2 мкл	2 мкл	2 мкл
Общий объем	21 мкл	21 мкл	21 мкл
ПРОГРАММА РЕСТРИКЦИИ			
Температура	37°C		
Время	4 часа		

Анализ продуктов реакции рестрикции осуществляют методом электрофореза в 2,0% агарозном геле с последующим окрашиванием бромистым этидием (0,5 мг/мл) и детекцией в ультрафиолетовом трансиллюминаторе (312 нм). Результаты интерпретируют путем соответствия размеров фрагментов после рестрикции, характерных для каждого генотипа *T. vaginalis* (таблица 5-7; где знаком «+» обозначено

наличие фрагмента, а знаком «-» – его отсутствие), маркеру молекулярной массы.

Таблица 5 – Фрагменты гена актина *T. vaginalis* после рестрикции эндонуклеазой HindII

	Рестрикция с помощью HindII				
Генотип	827 п.о.	426 п.о.	401 п.о.	213 п.о.	60 п.о.
A	+	-	-	+	+
E	+	-	-	+	+
G	-	+	+	+	+
H	-	+	+	+	+
I	-	+	+	+	+
M	-	+	+	+	+
N	-	+	+	+	+
P	-	+	+	+	+

Таблица 6 – Фрагменты гена актина *T. vaginalis* после рестрикции эндонуклеазой MseI

	Рестрикция с помощью MseI					
Генотип	581 п.о.	519 п.о.	333 п.о.	315 п.о.	204 п.о.	186 п.о.
A	+	+	-	-	-	-
E	+	-	-	+	+	-
G	+	+	-	-	-	-
H	+	+	-	-	-	-
I	+	+	-	-	-	-
M	+	-	+	-	-	+
N	+	-	+	-	-	+
P	+	-	+	-	-	+

Таблица 7 – Фрагменты гена актина *T. vaginalis* после рестрикции эндонуклеазой RsaI

	Рестрикция с помощью RsaI							
Генотип	568 п.о.	452 п.о.	236 п.о.	190 п.о.	116 п.о.	106 п.о.	103 п.о.	87 п.о.
A	+	-	+	+	-	+	-	-
E	+	-	+	-	-	+	+	+
G	+	-	+	+	-	+	-	-
H	+	-	+	-	-	+	+	-

I	-	+	+	+	+	+	-	-
M	+	-	+	+	-	+	-	-
N	+	-	+	-	-	+	+	+
P	-	+	+	-	+	+	+	+

1.5 Определение резистентности изолятов *T. vaginalis* к метронидазолу

Определение резистентности простейшего к метронидазолу и его производным основано на выявлении/отсутствии экспрессии ключевого гена *T. vaginalis* - пируват ферредоксин оксидоредуктазы (pyruvate ferredoxin oxidoreductase – pfor). В случае ее отсутствия, основной фермент не образуется и метронидазол не может преобразоваться в активную форму, что обуславливает устойчивость возбудителя к препарату.

1.5.1 Реакция обратной транскрипции

В случае обнаружения нуклеиновой кислоты *T. vaginalis*, на следующем этапе проводят реакцию обратной транскрипции РНК-матрицы изолятов возбудителя с использованием коммерческих наборов согласно протоколу, изложенному в таблице 8.

Таблица 8 – Протокол постановки реакции обратной транскрипции РНК-матрицы *T. vaginalis*

Обратная транскрипция	Кол-во на 1 пробу, мкл
2,5х реакционная смесь	10,0
Ревертаза	1,0
Праймер Random-6	1,0
Вода	8,0
Общий объем смеси	20,0
РНК	5,0
ПРОГРАММА	
45°C 40 мин	1 повтор
92°C 5 мин	1 повтор

1.5.2 Реакция амплификации участка гена *pfor T. vaginalis*

На следующем этапе проводят реакцию амплификации участка гена пируват ферредоксин оксидоредуктазы (*pfor*) *T. vaginalis*. Возможна постановка ПЦР как в формате электрофоретического учета продуктов реакции, так и в режиме реального времени. Для первого варианта используют праймеры со следующими последовательностями: PforF 5'-CTCGTTTGGGGTGCTACATT-3' и PforR 5'-CCTGATCCCAAACCTTGAG-3'. Режим амплификации и состав реакционной смеси приведены в таблице 9.

Таблица 9 – Оптимальный состав реакционной смеси и режим амплификации участка гена *pfor T. vaginalis* при проведении ПЦР в формате электрофоретического учета продуктов реакции

PFOR электрофорез		Концентрации		Кол-во на 1 пробу, мкл
Буфер А 10х				2,5
MgCl2		50 мМ		1,5
дНТФ		10 мМ		0,5
ДНК-полимераза ArtStart		5 ед/мкл		0,2
Прямой праймер (pforF)		10,0 мкМ		2,5
Обратный праймер (pforR)		10,0 мкМ		2,5
H2O		до 20 мкл		10,3
+5 мкл пробы кДНК				
ПРОГРАММА АМПЛИФИКАЦИИ				
1. Начальная денатурация		95°C	5 мин	1 повтор
2.	Доп. денатурация	95°C	30 сек	35 повторов
	Отжиг	55°C	30 сек	
	Элонгация	72°C	1 мин	
3. Фин. элонгация		72°C	5 мин	1 повтор

Анализ продуктов амплификации осуществляют методом электрофореза в 2,0% 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 участка гена *pfor* (239 п.о.) изолята *T. vaginalis* маркеру молекулярной массы.

Для постановки ПЦР в режиме реального времени используют праймеры и зонд со следующими последовательностями: PforFRT 5'-CTCGTTTGGGGTGCTACATT-3' и PforRRT 5'-AGCCGAATTCAGCGTTATCT-3', зонд PforRT 5'-FAM ACAACAACGAGCGCGGACACGGT BHQ1-3'. Режим амплификации и состав реакционной смеси приведены в таблице 10.

Таблица 10 – Оптимальный состав реакционной смеси и режим амплификации участка гена *pfor* *T. vaginalis* при проведении ПЦР в режиме реального времени

PFOR Real-time		Концентрации		Кол-во на 1 пробу, мкл
Буфер А 10х				2,5
MgCl2		50 мМ		1,5
дНТФ		10 мМ		0,5
ДНК-полимераза ArtStart		5 ед/мкл		0,2
Прямой праймер (pforFRT)		10,0 мкМ		1,0
Обратный праймер (pforRRT)		10,0 мкМ		1,0
Зонд (Pfor)				0,3
H2O		до 20 мкл		13,0
+5 мкл пробы кДНК				
ПРОГРАММА АМПЛИФИКАЦИИ				
1. Начальная денатурация		95°C	5 мин	1 повтор
2.	Доп. денатурация	95°C	30 сек	35 повторов
	Отжиг	58°C	20 сек	
	Элонгация (регистрация сигнала флуоресценции по FAM)	72°C	10 сек	

Учет реакции амплификации гена *pfor* *T. vaginalis* производится по каналу FAM. Результаты анализа интерпретируются на основании наличия/отсутствия пересечения кривой флуоресценции с пороговой линией.

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(ы)	Повторить процедуру амплификации с соблюдением условий и контролем всех 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	НК контрольного образца деградировала или не была добавлена	Использовать только свежие образцы биологического материала для выделения НК. Использовать пробы НК сразу после выделения.
Ампликон в пробе отрицательного контроля	Реагент(ы) контаминированы амплифицированной НК	Повторить процедуру амплификации с контролем реагентов