

Протокол исследования «DeMaRes» (Detection Macrolides Resistance)

Оглавление

Распределение обязанностей

1. Цель исследования
 2. Дизайн исследования
 3. Краткое описание исследования
 4. Забор клинического материала
 - 4.1. Критерии включения и исключения
 5. Процедура исследования
 - 5.1. Исследовательские центры
 - 5.2. Центральная лаборатория
 6. Обработка данных и статистический анализ
 7. Представление данных
 8. Продолжительность исследования
- Приложение 1. Образцы таблиц для заполнения данных
- Приложение 2. Хранение и транспортировка образцов

Распределение обязанностей

Руководитель:

Козлов Роман Сергеевич, д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, ректор ФГБОУ ВО СГМУ Минздрава России, главный внештатный специалист по клинической микробиологии и антимикробной резистентности Минздрава России, Президент Межрегиональной ассоциации по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии (МАКМАХ), Руководитель сотрудничающего центра ВОЗ по укреплению потенциала в сфере надзора и исследований антимикробной резистентности.

Координатор:

Эйдельштейн Инна Александровна, к.б.н., руководитель лаборатории молекулярной диагностики НИИ антимикробной химиотерапии ФГБОУ ВО СГМУ Минздрава России.

inna.edelstein@antibiotic.ru

1. Цель исследования

Оценить уровень распространенности и спектр мутаций резистентности к макролидам и фторхинолонам у *M. pneumoniae* и *M. genitalium*, выделенных от пациентов в различных регионах Российской Федерации.

2. Дизайн исследования

Многоцентровое проспективное молекулярно-генетическое исследование.

3. Краткое описание исследования

В исследование включаются положительные образцы ДНК *M. pneumoniae* и *M. genitalium*, полученные после рутинного ПЦР анализа ($Ct \leq 25$).

В лаборатории центра-участника исследования проводится выделение ДНК возбудителей из клинического материала и временное хранение положительных образцов с последующей отправкой в НИИ антимикробной химиотерапии (НИИАХ) ФГБОУ ВО СГМУ Минздрава России (выполняет функцию Методического верификационного центра по вопросам антимикробной резистентности в соответствии с приказом Минздрава России от 24.12.2020 г. № 1366).

В НИИАХ будет проводиться оценка соответствия полученных образцов критериям включения, правильность заполнения сопутствующей документации, анализ ПЦР-положительных образцов на наличие мутаций, связанных с устойчивостью к антибиотикам, методом ПЦР в режиме реального времени и последующее секвенирование по Сэнгеру соответствующих фрагментов гена в случае выявления мутаций.

4. Клинический материал

Исследованию подлежит клинический материал, полученный от пациентов (взрослых и детей) с клиническими признаками инфекции различной локализации либо при скрининговых мероприятиях (Таблица 1).

Таблица 1. Локализация инфекции и клинический материал

Локализация	Клинический материал
Дыхательная система	Мокрота БАЛ Соскоб с задней стенки глотки
Урогенитальный тракт	Моча Секрет простаты Соскоб из цервикального канала Соскоб из уретры

4.1. Критерии включения и исключения

Критерии включения:

1. Все образцы должны быть выделены у пациентов с симптомами инфекции либо при скрининговых мероприятиях из соответствующего клинического материала (Таблица 1).
2. От одного пациента в исследование может быть включен только один образец из одного анатомического локуса.
3. Образец выделенной ДНК (не менее 50-100мкл) должен находиться в пробирке типа Эппендорф (объемом 1,5-2 мл). Если в лаборатории центра-участника работа ведется с использованием автоматической системы выделения, то выделенную ДНК необходимо перенести в пробирку типа Эппендорф.
4. На крышке пробирки должен быть написан один идентификационный номер образца, дублирующийся в сопроводительной документации.
5. Информация о каждом образце должна быть внесена в электронную таблицу в формате Excel (образцы таблиц в Приложении 1).

6. Работа с образцами, поступившими в НИИАХ, проводится только при наличии сопроводительной информации.

Критерии исключения

В исследование не включаются образцы:

1. Клинический материал не прошедший процедуру пробоподготовки.
2. Образцы выделенной ДНК, присланные в пробирках другого объёма (0,5; 0,2 или 0,6 мл).
3. Пробирки с образцами выделенной ДНК, на крышках которых неправильно указан идентификационный номер образца:
 - недопустимо написание двойных номеров (например, 234-651);
 - недопустимо написание номеров с фамилией пациента (например, 79035 Иванов);
 - недопустимо написание номера с цифрой или любым другим обозначением (5496773 фн или 5496773/165 кп).
4. Образцы, поступившие в центральную лабораторию без необходимой информации: без данных, внесенных в таблицу Excel или с некорректно введенными данными.

5. Процедура исследования

5.1. Исследовательские центры

В лаборатории каждого центра-участника исследования проводятся следующие процедуры:

1. Выделение ДНК из клинического материала методом ПЦР в реальном времени – в соответствии со стандартными процедурами, принятыми в лаборатории (любая система выделения и выявления ДНК микроорганизма). Рекомендуемые значения Ct для отбора проб, не более 25 (исходя из особенностей чувствительности метода исследования).

2. Внесение выделенной ДНК не менее 100-50 мкл в пробирки типа Эппендорф.
3. Присваивание каждому образцу идентификационного номера с последующим указанием номера на крышке пробирки (в соответствии с критериями).
4. Заполнение информации по каждому образцу в виде электронной таблицы.
5. Временное хранение и подготовка образцов для транспортировки в НИИАХ. (Информация о хранении и транспортировке изложены в Приложении 2.)

5.2. Центральная лаборатория

Лаборатория НИИАХ осуществляет следующие процедуры:

1. Оценка соответствия присланных образцов критериям включения и отсутствия критериев исключения.
2. Проверка образцов на наличие ДНК с отбором для дальнейшего исследования только «положительных» образцов.
3. Выявление мутаций с помощью ПЦР в режиме реального времени.
4. Секвенирование по Сэнгеру соответствующих фрагментов гена для подтверждения характера мутаций.

5. Обработка и представление данных

Полученные результаты автоматически оцифровываются и вносятся в компьютерную базу данных. В случае выявления мутаций после секвенирования по Сэнгеру данные передаются в каждый центр-участник.

Результаты импортируются в электронном виде на онлайн платформу AMRcloud (<https://amrcloud.net/ru/project/demares/>) на странице проекта DeMaRes.

Все публикации с участием материалов центров-участников в обязательном порядке согласуются с авторами и представляются на рецензию.

На всех этапах обработки и представления данных соблюдается принцип конфиденциальности в отношении персональных данных пациентов и информации о медицинских организациях-участниках исследования.

6. Продолжительность исследования

Исследование не имеет конечной точки.

Приложение 1

Примеры таблиц для внесения данных по каждому образцу

Таблицы нужно вести в строго установленном порядке: не допускать свободного написания данных и не добавлять колонки с иной дополнительной информацией.

Таблица 2. Индивидуальная регистрационная карта (для *M. pneumoniae*)

#	Key number	Strain or specimen name	M.pneumoniae	City	Location	Date of collection	Source	Date of Birth	Partient age	Sex	In or outpatient	Diagnosis/clinical syndrom
1	MPNMOSS5467	5467	positive	Moscow, Russia	Municipal Hospital#67	2018.10.18	throat swab	2000-07-30	13,23	F	out	pneumoniae
2												
3												

MPNMOSS-*Mycoplasma PNeumoniae*, MOS-Moscow, S-sample

Таблица 3. Индивидуальная регистрационная карта (для *M. genitalium*)

#	Key number	Strain or specimen name	M. genitalium	C. trachomatis	City	Location	Date of collection	Source	Date of Birth	Partient age	Sex	In or out patient	Pregnant	Diagnosis/clinical syndrom
1	MGEMOSS5467	5467	positive	negative	MoscowRussia	Municipal Hospital#67	2000-10-18	urethral swab	2000.07.30	20,23	M	out	not applicable	
2	MGEMOSS5468	5468	positive	negative	MoscowRussia	Municipal Hospital#67	2021-10-19	cervical swab	2000-07-31	21,23	F	out	yes	
3														

MGEMOSS- *Mycoplasma GENitalium*, MOS-Moscow, S-sample

Приложение 2

Хранение и транспортировка образцов

Образцы, которые подлежат транспортировке, необходимо хранить при -20C° до момента отправки.

Организация транспортировки образцов в центральную лабораторию осуществляется НИИАХ ФГБОУ ВО «Смоленский государственный медицинский университет» Минздрава России. Для согласования даты и времени транспортировки материала необходимо связаться с координатором исследования не менее, чем за 10 рабочих дней до желаемой даты отправки.