



МІНІСТЭРСТВА
АХОВЫ ЗДАРОЎЯ
РЭСПУБЛІКІ БЕЛАРУСЬ

МИНИСТЕРСТВО
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

ЗАГАД

ПРИКАЗ

20.05.2009 № 485

г. Минск

г. Минск

Об утверждении инструкции по
лабораторной диагностике гонореи

На основании Положения о Министерстве здравоохранения Республики Беларусь, утвержденного постановлением Совета Министров Республики Беларусь от 23 августа 2000 г. № 1331, в редакции постановления Совета Министров Республики Беларусь от 1 августа 2005 г. № 843, в целях совершенствования организации медицинской помощи населению республики ПРИКАЗЫВАЮ:

1. Утвердить инструкцию по лабораторной диагностике гонореи (далее - Инструкция);

2. Начальникам управления здравоохранения областных исполнительных комитетов, председателю комитета по здравоохранению Мингорисполкома, руководителям республиканских организаций здравоохранения принять необходимые меры для внедрения Инструкции в практическую работу.

3. Ректорам медицинских университетов, ректору Белорусской медицинской академии последипломного образования внедрить Инструкцию в учебный процесс.

4. Контроль за исполнением приказа возложить на начальника управления организации медицинской помощи Волжанкину Г.В.

Заместитель Министра

В.Е.Шевчук

Инструкция
по лабораторной диагностике гонореи

ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

1. На территории Республики Беларусь лабораторная диагностика гонококковой инфекции осуществляется в клинико-диагностических и бактериологических лабораториях.

2. Данная инструкция разработана для решения следующих задач:

- определения показаний к обследованию на гонококковую инфекцию;

- определения спектра диагностических методов, используемых для диагностики гонококковой инфекции;

- установления единых требований к порядку диагностики гонококковой инфекции.

3. Диагноз гонореи устанавливается на основании положительных результатов микроскопического исследования у мужчин с клиническими симптомами уретрита.

4. При исследовании материала от женщин, детей, в случаях сексуального насилия, при исследовании материалов из ротоглотки, конъюнктивы, прямой кишки, критериями постановки диагноза является культуральный метод.

5. Контроль излеченности по гонококковой инфекции проводится не ранее чем через 10-14 дней после окончания лечения культуральным методом и не ранее, чем через 3-4 недели методы амплификации нуклеиновых кислот (МАНК).

6. Инструкция включает в себя следующие приложения:

Приложение 1. Перечень медицинских показаний для обязательного обследования на гонококковую инфекцию;

Приложение 2. Правила отбора, транспортировки и хранения первичных проб при обследовании пациентов на гонорею;

Приложение 3. Методика микроскопической диагностики гонококковой инфекции;

Приложение 4. Методика культуральной диагностики гонококковой инфекции;

Приложение 5. Методика определения антибиотикочувствительности и резистентности *Neisseria gonorrhoeae* к антимикробным препаратам;

Приложение 6. Методика молекулярно- биологической диагностики гонококковой инфекции.

Перечень медицинских показаний для обязательного обследования на
 гонококковую инфекцию

Показания	Рекомендуемый вид исследования	Кратность исследования
наличие признаков гнойного конъюнктивита	культуральный метод	однократно
наличие болей и выделений из прямой кишки, признаки проктита	культуральный метод	однократно
воспалительные изменения ротоглотки при подозрении на гонококковую инфекцию	культуральный метод	однократно
скрининговые исследования*	микроскопический метод или МАНК	однократно
МУЖЧИНЫ		
наличие жалоб на гнойные или слизисто-гнойные выделения из уретры, зуд уретры, дизурия	микроскопический метод	однократно
воспаление в области наружного отверстия уретры, парауретральных ходов	микроскопический метод	однократно
простатит, эпидидимит, эпидидимоорхит	культуральный метод или МАНК	однократно
ЖЕНЩИНЫ		
наличие гнойных или слизисто-гнойных выделений из МПО, эктопия шейки матки	культуральный метод или МАНК	однократно
зуд, жжение при мочеиспускании, боли внизу живота, усиление белей, кровянистые выделения	культуральный метод или МАНК	однократно
бесплодие, невынашивание	культуральный метод	однократно

беременности	метод или МАНК	
направляемые на прерывание беременности, инвазивные гинекологические манипуляции*	микроскопический метод или МАНК	однократно
беременные женщины	культуральный метод или МАНК	трижды: 1-ое - при постановке на учет; 2-ое - 27-30 недель; 3-е - 36-40 недель.
роженицы без обменных карт в родильных домах	культуральный метод или МАНК	однократно
родильницы с осложненным течением послеродового периода на 5-6 день после родов	культуральный метод или МАНК	однократно
НОВОРОЖДЕННЫЕ**		
гнойный конъюнктивит	культуральный метод	однократно
вульвовагинит	культуральный метод или МАНК	однократно
ДЕТИ (ДЕВОЧКИ)		
вульвовагинит	культуральный метод или МАНК	однократно
ЛИЦА		
вступавшие в половой контакт с больным гонореей	культуральный метод или МАНК	однократно
проходящие специально скрининговое обследование на другие ИППП или с установленным диагнозом ИППП	культуральный метод или МАНК	однократно

декретированных профессий при проведении обязательных медицинских осмотров в соответствии с утвержденными регламентирующими документами*	микроскопический метод	однократно
подвергшиеся сексуальному насилию	культуральный метод или МАНК	однократно
проходящие контроль излеченности по гонококковой инфекции	культуральный метод или МАНК	однократно, при использовании культурального метода - через 10-14 дней, методом МАНК – через 3-4 недели

* При выявлении признаков воспалительных изменений со стороны нижних отделов мочеполового тракта дальнейшее обследование проводится в соответствии с клиническими показаниями.

** При подтверждении гонококковой этиологии конъюнктивита и (или) вульвовагинита обследуются родители.

Приложение № 2
к приказу Министерства здравоохранения
Республики Беларусь
20.05.2009 № 485

Правила отбора, транспортировки и хранения первичных проб при обследовании пациентов на гонорею

Метод исследования	Материалы и оборудование, инвентарий	Обследуемый очаг/биоматериал	Правила взятия	Сроки и температурные условия хранения и транспортировки	Примечания
Микроскопический	Зонд универсальный для МАНК; одноразовая бактериологическая петля; стерильный ватный/дакроновый тампон; стерильный марлевый	Уретра, мужчины	Подготовка к взятию проб: попросить пациента слегка помассировать уретру скользящими движениями от основания пениса к его головке перед взятием уретрального материала, область наружного отверстия уретры очистить с помощью стерильного марлевого тампона, крайнюю плоть отвести назад. Взятие материала: осторожно ввести универсальный зонд или одноразовую бактериологическую петлю в	Каждое стекло с образцом маркируется и помещается в контейнер для транспортировки в сопровождении направления (направление к препаратам помещается в полиэтиленовый пакет). При необходимости	Материал для микроскопического исследования берется обязательно на два предметных стекла (одно для окраски метиленовым синим

(ватный) тампон; ложка Фолькмана; вагинальное зеркало; предметные стекла; покровные стекла.		наружное отверстие мочеиспускательного канала (на глубину 1-2 см) и слегка нажимая на переднюю стенку уретры собрать материал. (Взятие материала проводится не ранее 2-3 часов после мочеиспускания).	хранения материала более 24 часов после высушивания каждый образец отдельно фиксируют 96 ⁰ этиловым спиртом в течение 3 минут. В направлении должно быть указание на проведенную фиксацию препарата.	второе – по Граму при обнаружении диплококков). Детям препубертального возраста брать материал из уретры не рекомендуется. В этом случае берутся мазки из наружного отверстия мочеиспускательного канала мягким зондом или
	Уретра, женщины	Подготовка к взятию образцов: наружное отверстие очистить с помощью стерильного тампона, при отсутствии свободных выделений провести легкий массаж уретры. Взятие материала: осторожно ввести универсальный зонд или одноразовую бактериологическую петлю в наружное отверстие мочеиспускательного канала (на глубину 0,5-2 см) и слегка нажимая на переднюю стенку уретры собрать материал. (Взятие материала проводится не ранее 2-3 часов после мочеиспускания).		
	Цервикальный	Подготовка к взятию образцов: ввести гинекологическое зеркало и		

		канал	<p>очистить наружное отверстие цервикального канала от выделений при помощи стерильного тампона.</p> <p>Взятие материала:</p> <p>осторожно ввести универсальный зонд или одноразовую бактериологическую петлю в цервикальный канал (на глубину 2 см) и вращая его, собрать материал.</p> <p>У беременных для исследования собираются свободно истекающие выделения из цервикального канала.</p>		<p>собирается моча для исследования молекулярными биологическими методами (ПЦР и др.).</p> <p>В случае несоблюдения правил взятия и условий доставки биологического материала (разбитые, не промаркированные, склеенные друг с</p>
		Влагалище (у девочек препубертатного возраста)	<p>Взятие материала:</p> <p>при наличии выделений используется стерильный ватный/дакроновый тампон. При отсутствии выделений ложка Фолькмана осторожно вводится через гименальное отверстие и материал берется из преддверия влагалища.</p>		

					другом стекла, отсутствие материала на стекле) образцы не подлежат микроскопическому исследованию.
Культуральный(бактериологический)	Зонд универсальный для МАНК; одноразовая бактериологическая петля 1 мкл и 10 мкл; стерильный ватный/дакроновый тампон; стерильный марлевый	Уретра, мужчины	Подготовка к взятию проб: попросить пациента слегка помассировать уретру скользящими движениями от основания пениса к его головке перед взятием уретрального материала, область наружного отверстия уретры очистить с помощью стерильного марлевого тампона, крайнюю плоть отвести назад. Взятие материала: осторожно ввести универсальный зонд или одноразовую бактериологическую петлю в наружное отверстие	Сразу после взятия материал помещается в соответствующую транспортную среду, или производится посев на селективную и/или неселективную питательную среду. При первичном посеве материала	Взятие проб осуществляется строго следуя инструкции только стерильными одноразовыми инструментами.

(ватный) тампон; ложка Фолькмана; вагинальное зеркало ректальное зеркало или проктоскоп; флаконы с транспортно й средой; питательны е среды.		мочеиспускательного канала (на глубину 1-2 см) и слегка нажимая на переднюю стенку уретры собрать материал. (Взятие материала проводится не ранее 2-3 часов после мочеиспускания).	на питательную среду доставка в лабораторию осуществляется немедленно или не позднее 2-х часов от момента взятия в сопровождении направления с соблюдением температурного режима (35-37 ⁰). Материал, взятый в транспортную среду, необходимо доставить в лабораторию при температуре 18- 20 ⁰ C. Промаркированна я пробирка с транспортной средой помещается в
	Предста тельная железа	Сбор материала: - получение материала рекомендуется проводить после мочеиспускания; - провести ректальный массаж предстательной железы; - материал для исследования собрать из наружного отверстия уретры.	
	Уретра, женщин Ы	Подготовка к взятию образцов: наружное отверстие очистить с помощью стерильного тампона, при отсутствии свободных выделений провести легкий массаж уретры. Взятие материала: осторожно ввести универсальный зонд или одноразовую бактериологическую петлю в наружное отверстие мочеиспускательного канала (на глубину 0,5-2 см) и слегка нажимая	

			на переднюю стенку уретры собрать материал. (Взятие материала проводится не ранее 2-3 часов после мочеиспускания).	емкость для транспортировки. В транспортной среде материал от больного может храниться при комнатной температуре в течение 24-х часов.
	Цервикальный канал	Подготовка к взятию образцов: ввести гинекологическое зеркало и очистить наружное отверстие цервикального канала от выделений при помощи стерильного тампона. Взятие материала: осторожно ввести универсальный зонд или одноразовую бактериологическую петлю в цервикальный канал (на глубину 2 см) и вращая его, собрать материал. У беременных для исследования собираются свободно стекающие выделения из цервикального канала.		
	Влагалище (у девочек препубертатного возраста)	Взятие материала: при наличии выделений используется стерильный ватный/дакроновый тампон. При отсутствии выделений ложка Фолькмана осторожно вводится через гименальное отверстие и материал берется из преддверия		

			влагалища.		
		Прямая кишка	<p>Взятие материала:</p> <p>Материал для исследования из прямой кишки получают либо «слепым» методом, либо с помощью ректоскопа или ректальных зеркал из анального отверстия.</p> <p>Универсальный зонд или стерильный тампон на деревянной или пластиковой ручке вводят на глубину 3 см в канал и производят взятие материала со всех стенок прямой кишки круговыми движениями в течение 10 секунд.</p> <p>При наличии на тампоне видимых каловых масс тампон выбрасывается и проводится повторная попытка получения материала.</p>		
		Конъюнк- ктива	<p>Взятие материала:</p> <p>отводят нижнее веко и стерильным тампоном проводят по поверхности конъюнктивы нижнего века по направлению к внутреннему углу глаза. Исследование из каждого глаза проводят отдельным тампоном.</p>		
		Ротогло	Взятие материала:		

		тка	стерильным тампоном проводят по задней стенке глотки выше нижнего края мягкого неба, а также по поверхности миндалин.		
МАНК	Зонд универсальный для исследования на МАНК; стерильный марлевый (ватный) тампон; стерильный контейнер для мочи; вагинальное зеркало ректальное зеркало или проктоскоп; одноразовые пробирки с транспортно	Уретра, мужчины	Подготовка к взятию проб: попросить пациента слегка помассировать уретру скользящими движениями от основания пениса к его головке перед взятием уретрального материала, область наружного отверстия уретры очистить с помощью стерильного марлевого тампона, крайнюю плоть отвести назад. Взятие материала: осторожно ввести универсальный зонд в наружное отверстие мочеиспускательного канала (на глубину 3-4 см) и слегка нажимая на переднюю стенку уретры собрать материал.	Материал доставляется в предназначенных для этого пробирках с транспортной средой согласно инструкции производителя тест-систем.	Взятие проб осуществляется следуя инструкции производителя тест-систем стерильными одноразовыми инструментами. Детям препубертатного возраста мазки берутся из наружного отверстия мочеиспускательного
		Предстательная железа	Сбор материала: - получение материала рекомендуется проводить после мочеиспускания; - провести ректальный массаж	Пробы из уретры и цевикального канала могут храниться при комнатной температуре в теч. 48 часов. При 2-8°C в теч. 2-х недель. При -20°C – 1 месяц.	

й средой средой.		предстательной железы; материал для исследования собрать из наружного отверстия уретры.	Секрет предстательной железы храниться при комнатной температуре в теч. 6 часов. При 2- 8°C в теч. 1-х суток. При -20°C – 1 неделя. Моча храниться при комнатной температуре в теч. 6 часов. При 2- 8°C в теч. 1-х суток. Отделяемое конъюнктивы, ротоглотки и прямой кишки храниться при комнатной температуре в теч. 6 часов. При 2-	канала мягким зондом или собирается моча. Условия хранения должны согласоваться с рекомендаци ями производител ей ДНК/РНК тестов. Допускается однократное разморажива ние образца.
	Уретра, женщин ы	Подготовка к взятию образцов: наружное отверстие очистить с помощью стерильного тампона, при отсутствии свободных выделений провести легкий массаж уретры. Взятие материала: осторожно ввести универсальный зонд в наружное отверстие мочеиспускательного канала (на глубину 0,5-2 см) и слегка нажимая на переднюю стенку уретры собрать материал.		
	Цервик альный канал	Подготовка к взятию образцов: ввести гинекологическое зеркало и очистить наружное отверстие цервикального канала от выделений при помощи стерильного тампона. Взятие материала: осторожно ввести универсальный зонд или одноразовую бактериологическую петлю в цервикальный канал (на глубину 2		

			см) и вращая его, собрать материал. У беременных для исследования собираются свободно стекающие выделения из цервикального канала.	8°С в теч. 3-х суток. При -20°С – 1 месяц. Клинический материал, помещенный, в транспортную среду, должен транспортироваться только на холоде (в сумке-холодильнике). При доставке в лабораторию в сроки, превышающие 2 часа, хранение клинического материала необходимо осуществлять в холодильнике при -20° С. Моча должна быть доставлена в	
	Влагалище (у девочек препубертатного возраста)	Взятие материала: при наличии выделений используется универсальный зонд. При отсутствии выделений ложка Фолькмана осторожно вводится через гименальное отверстие и материал берется из преддверия влагалища.			
	Конъюнктив	Взятие материала: отводят нижнее веко и стерильным тампоном проводят по поверхности конъюнктивы нижнего века по направлению к внутреннему углу глаза. Исследование из каждого глаза проводят отдельным тампоном.			
	Ротоглотка	Взятие материала: универсальным зондом проводят по задней стенке глотки выше нижнего края мягкого неба, а также по поверхности миндалин.			
	Моча	Для исследования собирается первые 10-20 мл (первая порция)			

			свободно выпущенной мочи в стерильный контейнер.	лабораторию в течение 3 часов без дополнительного замораживания или охлаждения. Пробирка с клиническим материалом помещается в герметичную емкость для транспортировки в сопровождении соответствующего направления.	
--	--	--	--	---	--

Приложение № 3
к приказу Министерства здравоохранения
Республики Беларусь
20.05.2009 № 485

Методика микроскопической диагностики гонококковой инфекции

Название	Микроскопический метод исследования при подозрении на гонококковую инфекцию
Принцип	Выявление воспалительных изменений в первичных образцах, поиск и обнаружение грамтрицательных диплококков, расположенных в полиморфноядерных лейкоцитах и на клетках эпителия.
Материал для исследования	Отделяемое или соскоб из уретры, отделяемое или соскоб из цервикального канала, отделяемое из преддверия влагалища (у девочек до пубертатного возраста), отделяемое из конъюнктивы.
Необходимое оборудование и материалы	Бинокулярный микроскоп с возможностью увеличения до $\times 1000$; пипетки пластиковые; песочные часы на 1 и 3 минуты или таймер; приспособление для окраски препаратов; перчатки медицинские; емкости для сбора и обработки стекол; предметные стекла; стеклянный стакан; фильтровальная бумага; карандаш для маркировки стекол.
Реагенты	Иммерсионное масло; метиленовый синий; набор красителей для окраски по Граму; спирт этиловый 96%; гидроокись калия (КОН); дезинфицирующие растворы.

<p>Подготовка к проведению анализа</p>	<p>Перед окрашиванием препарат фиксируют 96% этиловым спиртом (погружением на 1-2 мин). Зафиксированные препараты можно хранить при комнатной температуре в течение нескольких дней.</p> <p>Приготовление растворов красителей:</p> <ul style="list-style-type: none"> - 1% водный раствор метиленового синего: растворяют 1 г метиленового синего в 100 мл дистиллированной воды. Фильтруют через бумажный фильтр; - метиленовый синий (по Леффлеру): растворяют 1 г метиленового синего в 20 мл 96% этилового спирта, добавляют 1 мл 1% раствора КОН и доводят дистиллированной водой до объема 100 мл; - 1% водный раствор кристаллического фиолетового: растворяют 1 г кристаллического фиолетового в 100 мл горячей дистиллированной воды. Фильтруют через бумажный фильтр в горячем виде; - раствор Люголя: 2 г йодида калия растворяют в 300 мл дистиллированной воды, добавляют 1 г кристаллического йода, фильтруют через бумажный фильтр. Хранят в бутылки из темного стекла; - 1% водный раствор нейтрального красного: 1 г нейтрального красного растворяют в 100 мл дистиллированной воды. Фильтруют через бумажный фильтр. <p>Вместо нейтрального красного можно использовать 0,1% раствор сафранина. Приготовление красителя:</p> <ul style="list-style-type: none"> - 1 г сафранина растворяют в 100 мл этилового спирта; перед окраской к 1 части спиртового раствора добавляют 9 частей дистиллированной воды.
<p>Окраска мазков метиленовым синим</p>	<p>Процедура окраски мазков водным раствором метиленового синего:</p> <p>На фиксированный препарат наносят 1% водный раствор метиленового синего на 1 – 2 мин (в</p>

	<p>зависимости от толщины мазка). Тщательно смывают оставшийся краситель струей холодной воды. Препарат высушивают на воздухе.</p> <p>Процедура окраски мазков спиртовым раствором метиленового синего по Леффлеру: высушенный препарат опускают в стакан с 1% метиленовым синим по Леффлеру на 10-15 сек., промывают погружением в другой стакан с водопроводной водой, препарат высушивают на воздухе.</p>
<p>Окраска мазков по методу Грама</p>	<p>На фиксированный мазок наносят несколько капель 1% водного раствора кристаллического фиолетового на 1 минуту. Препарат промывают водопроводной водой. Наносят раствор Люголя, покрывая поверхность стекла, на 20-30 сек (до почернения мазка). Препарат промывают струей водопроводной воды. Мазок обесцвечивают 96% спиртом под контролем глаза, погружая и вынимая препарат из стакана со спиртом. В зависимости от толщины препарата процесс обесцвечивания занимает 15- 20 секунд. Процедуру проводят до тех пор, пока с тонких участков мазка перестанут стекать струйки фиолетового красителя. Излишнего обесцвечивания надо избегать, так как это может повлиять на качество окраски препарата. Препарат немедленно промывают водопроводной водой. Докрашивание препарата проводят 1% водным раствором нейтрального красного или 0,1% раствором сафранина в течение 1- 2 минут. Краситель сливают, препарат промывают проточной водой и высушивают на воздухе.</p>
<p>Учет и оценка результатов</p>	<p>Оценка мазков, окрашенных метиленовым синим. При микроскопии препарата видны: ядра клеток, окрашенные в синий цвет; цитоплазма, окрашенная в голубой цвет разной интенсивности; бактериальная</p>

микрофлора, окрашенная в синий цвет разной интенсивности.

Оценка мазков, окрашенных по Граму. Препарат оранжево-красного цвета на тонких участках, лилово-фиолетового на толстых. Ядра клеточных элементов (лейкоцитов, эпителиальных клеток) должны частично удерживать основную фиолетовую окраску, т.е. в центре они должны быть окрашены в фиолетовый цвет, по периферии в оранжево-красный. На этом фоне гонококки, расположенные в лейкоцитах и на других участках мазка, будут оранжево-красными.

При неправильной окраске надо повторить взятие материала и окраску мазка. Высокое качество окраски может быть достигнуто своевременной остановкой процесса обесцвечивания. Когда обесцвечивание недостаточно, ядра лейкоцитов и эпителиальных клеток окрашиваются в темно-фиолетовый цвет, и грамотрицательные бактерии могут приобрести фиолетовую окраску, и таким образом все бактерии будут приняты за грамположительные. В этом случае процесс обесцвечивания спиртом нужно повторить. Если процесс обесцвечивания был слишком долгим, грамположительные микроорганизмы окрасятся в интенсивно красный цвет и будут неправильно расценены как грамотрицательные.

При микроскопии мазка, окрашенного по Граму, можно определить следующие морфологические объекты: слизь (красноватая аморфная масса/пучки, которая образует фон препарата); эпителиальные клетки (в большинстве случаев видны только ядра: они овальные/круглые, мономорфны по своей окраске – ярко-фиолетового цвета); сегментоядерные лейкоциты (ядра окрашены в фиолетовый цвет, цитоплазма бледно-

	<p>розовая); гонококки (красно-розового цвета, расположены как в лейкоцитах, так и внеклеточно, а также на эпителиальных клетках); микроорганизмы (грамотрицательные и грамположительные); сперматозоиды (редко); эритроциты (редко).</p> <p>Морфология гонококка – диплококк, имеющий форму кофейного зерна и располагающийся попарно вогнутыми сторонами друг к другу. Гонококки в основном располагаются внутри лейкоцитов и на эпителиальных клетках. Как внутри лейкоцитов, так и вне они располагаются парами или группами так, что одни диплококки лежат по отношению к другим под разными углами, напоминая “пчелиный рой”. Размножаясь делением в разных плоскостях, они не образуют цепочек.</p> <p>Положительное лабораторное заключение основывается на обязательном выявлении трех признаков микроорганизма: типичной морфологии, характерному расположению, грамотрицательной окраске. При обнаружении диплококков, располагающихся только вне клеток, положительное лабораторное заключение не выставляется.</p> <p>По результатам микроскопического исследования формулируется одно из возможных заключений:</p> <ul style="list-style-type: none"> -грамотрицательные внутриклеточные и/или внеклеточные диплококки, морфологически сходные с гонококками обнаружены; -грамотрицательные внутриклеточные и/или внеклеточные диплококки, морфологически сходные с гонококками не обнаружены. <p>В лабораторном заключении можно дополнительно дать сведения о выявлении других микроорганизмов с указанием их морфотипа и грам-принадлежности.</p>
--	--

	<p>В случае обнаружения грамотрицательных диплококков окрашенные препараты (метиленовым синим и по Граму) сохраняют в лаборатории в течение 3-х месяцев.</p>
<p>Контроль качества</p>	<p>На преаналитическом этапе оценивается:</p> <ul style="list-style-type: none"> - взятие биологического материала в соответствии с требованиями; - выполнение требований хранения и доставки материала в лабораторию; - выполнение требований маркировки проб и соответствия маркировки пробы маркировке направления; - контроль растворов красителей (внешнее состояние, срок годности), условия и сроки хранения; - качество лабораторной посуды. <p>Мероприятия аналитического этапа:</p> <ul style="list-style-type: none"> - включение официально зарегистрированных контрольных материалов; - соблюдение технологии окраски в соответствии с инструкцией производителя; - учет результатов с контрольным материалом и испытуемым образцом в соответствии с официально признанными критериями. <p>Мероприятия постаналитического этапа:</p> <ul style="list-style-type: none"> - правильность внесения результатов в бланк исследования; - своевременное доведение информации до врача, назначившего исследование. <p>При проведении процедуры окрашивания для микроскопического исследования каждая партия мазков должна содержать контрольные стекла с заведомо грамположительными и грамотрицательными бактериями.</p> <p>Проведение визуального анализа качества окрашивания</p>

	<p>препарата включает оценку интенсивности окрашивания клеток, при этом ядра эпителиальных клеток и лейкоцитов окрашены в фиолетовый цвет, а цитоплазма – в розовый цвет.</p> <p>Каждая новая серия реактивов для окрашивания по Граму должна быть проверена на качество при помощи грамположительных и грамотрицательных штаммов бактерий.</p>
<p>Источники ошибок</p>	<p>-неудовлетворительное техническое состояние оборудования;</p> <p>- нарушение техники взятия клинического материала;</p> <p>-нарушение правил получения биологического материала для исследования;</p> <p>- нарушение методики проведения микроскопического анализа;</p> <p>-отсутствие контрольных штаммов.</p>
<p>Дополнительные сведения об особенностях проведения процедуры</p>	<p>Преимущества метода:</p> <ul style="list-style-type: none"> - быстрота получения результата; - простые условия транспортировки; - несложность выполнения; - низкая стоимость; - высокая чувствительность и специфичность для мазков из уретры у мужчин при наличии клинических симптомов (референс-метод); - возможность выявления других микроорганизмов (трихомонад, кандид и проч.). <p>Недостатки метода:</p> <ul style="list-style-type: none"> - субъективность оценки результатов; - низкая чувствительность для цервикальных проб; - микроскопический метод не может быть использован в решении спорных вопросов; - низкая чувствительность для ранней диагностики гонококковой инфекции, бессимптомной инфекции и

	для некоторых ауksотипов и вариантов гонокков.
--	--

Приложение № 4
к приказу Министерства здравоохранения
Республики Беларусь
20.05.2009 № 485

Методика культуральной диагностики *Neisseria gonorrhoeae*

Название	Культуральный (бактериологический) метод диагностики гонококковой инфекции
Принцип	Выделение культуры <i>Neisseria gonorrhoeae</i> с использованием специальных питательных сред с последующей видовой идентификацией по биохимическим и морфологическим признакам.
Биологический материал для исследования	отделяемое или соскоб из уретры; отделяемое или соскоб из цервикального канала; материал из заднего свода влагалища; отделяемое конъюнктивы; отделяемое прямой кишки; секрет предстательной железы; соскоб из ротоглотки.
Подготовка проб к исследованию	Не проводится.
Оборудование, инструменты и материалы	Термостат на $36\pm 1^\circ\text{C}$; эксикатор; CO_2 – инкубатор на $36\pm 1^\circ\text{C}$; ламинарный бокс; бактериологический анализатор; спиртовка или газовая горелка; световой микроскоп; перчатки; средства индивидуальной защиты персонала; предметные стекла; бактериологические петли; чашки Петри; карандаш для маркировки стекол;

	емкость для сбора отходов.
Реагенты	Набор красителей для окраски по Граму; транспортные среды; питательный агар (контрольная среда); селективная и неселективная питательные среды для выделения нейссерий; набор реагентов для видовой идентификации нейссерий; оксидазный реагент (1% тетраметил-пара-фенилендиамин дигидрохлорида водный раствор).
Подготовка к проведению анализа	Культивирование гонококков следует проводить на чашках Петри диаметром 90 мм с количеством среды не менее 20 мл на чашку или 100 мм с количеством среды 25 мл. Возможно также использование чашек диаметром 60-40 мм с толщиной агара не менее 4-4,5 мм. После приготовления чашек со средой (в соответствии с инструкцией производителя) они помещаются в термостат при $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ на 1 час для удаления конденсата (излишней влажности). Пересушивание среды недопустимо, т.к. это отразится на качестве роста гонококков. Готовая среда, разлитая по чашкам, хранится в холодильнике при температуре $6\pm 2^{\circ}\text{C}$ до 3 недель в герметично закрытых полиэтиленовых пакетах крышками вниз. Превышение срока хранения среды делает выращивание гонококков неэффективным. Перед проведением посева чашки необходимо прогреть в термостате при температуре $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ в течение 30 минут или оставить при комнатной температуре в течение 1 часа.
Процедура анализа	Клинический материал от каждого пациента засеивается на отдельную чашку Петри непосредственно в кабинете врача. При использовании больших чашек (90 или 100 мм), материал из уретры и цервикального канала у женщин засеивается на одну чашку Петри в разные ее

секторы с соответствующей маркировкой. Материал из уретры мужчин засевадается на отдельную чашку.

Посев на питательную среду для выделения гонококков обязательно сопровождается параллельным посевом на контрольную питательную среду (необогатенный питательный агар) и приготовлением из исследуемого материала мазка для ориентировочного микроскопического исследования.

Взятый материал тампоном наносится на поверхность, равную примерно $\frac{1}{4}$ площади поверхности среды чашки или сектора. Затем стерильной бактериологической петлей материал распределяется по оставшейся площади поверхности питательной среды штриховыми движениями в 3-4 разных направлениях с целью создания условий для роста отдельно расположенных колоний гонококков. Засеянные питательные среды должны быть доставлены в лабораторию не позднее 2 часов, при этом не допускается их охлаждения. Несоблюдение этих условий резко сказывается на эффективности культурального метода, поэтому во всех других случаях требуется производить забор первичных проб на транспортные среды.

При использовании транспортных сред посев проводится тампоном, извлеченным из флакона со средой.

Чашки немедленно помещаются в CO_2 -инкубатор с содержанием CO_2 $5\pm 2\%$, влажностью 70% с контролируемой температурой $36\pm 1^\circ\text{C}$. Допускается использование увлажненного эксикатора, который ставится в термостат с контролируемой температурой $36\pm 1^\circ\text{C}$, в эксикаторе создаются условия повышенного содержания CO_2 при помощи свечи или газогенерирующих пакетов. Чашки просматриваются

	<p>через 18-24 часа инкубации, в случае отсутствия роста – через 48 часов.</p> <p>При отсутствии признаков роста через 72 часа инкубации наблюдение прекращают.</p> <p>При выявлении характерных колоний проводится первичная и видовая идентификация (см. ниже).</p> <p>Недопустимо для выделения и идентификации гонококков использовать пробирки.</p> <p>При использовании коммерческих культуральных систем руководствуются инструкцией производителя.</p>
<p>Учет и оценка результатов</p>	<p>Оценка вида колоний.</p> <p>По внешнему виду типичные колонии гонококков через 18-24 часа инкубации выпуклые, прозрачные, серо-белого цвета, имеют диаметр 0,5-1,0 мм. При дальнейшей инкубации колонии могут увеличиваться в размерах до 3,0 мм и уплощаться. Нередко на одной чашке можно встретить колонии разного вида.</p> <p>Тест на цитохромную оксидазу.</p> <p>Обнаружение оксидазоположительных грамотрицательных диплококков считается достаточным для их идентификации как <i>N.gonorrhoeae</i> при рутинной диагностике.</p> <p>Для определения цитохром-оксидазы используется один из рекомендованных методов:</p> <ul style="list-style-type: none"> - на подозрительную колонию наносится капля оксидазного реагента (тетраметил-р-фенилендиамина, 1% водный раствор). Быстрое изменение цвета реагента, обычно в течение 5-10 секунд, на сине-фиолетовый и его сохранение дольше 30 секунд позволяет считать тест положительным. Реагент, используемый в оксидазном тесте, убивает гонококки, поэтому дальнейшая работа с этими колониями будет невозможна;

	<ul style="list-style-type: none">- полоска фильтровальной бумаги смачивается несколькими каплями реагента, затем на нее помещается бактериологической петлей материал из подозрительной колонии. Этот способ позволяет сохранить материал на чашке для проведения дальнейших исследований;- на предварительно увлажненные дистиллированной водой коммерческие диски и полоски, содержащие тетраметил-р-фенилендиамина гидрохлорид, платиновой петлей или стерильной стеклянной палочкой наносят испытуемую культуру. <p>Темно-лиловое или синее окрашивание, появляющееся через 10-30 секунд, свидетельствует о положительной оксидазной реакции. Отсутствие изменения цвета – об отсутствии данного фермента.</p> <p>Высокая чувствительность оксидазного теста не согласуется с его специфичностью. Оксидазоположительными могут быть и другие бактерии, выделяющие цитохромную оксидазу, поэтому оксидазоположительные колонии микроорганизмов обязательно нужно исследовать микроскопически с окраской по Граму.</p> <p>Во избежание ложноположительных реакций не следует применять стальную или нихромовую проволоку при проведении оксидазного теста, так как возможно поверхностное окисление этих металлов; для учета результатов важно соблюдение временного интервала - 10-30 секунд.</p> <p>Приготовление мазка из культуры.</p> <p>Материал из подозрительной колонии смешивают с небольшой каплей дистиллированной воды на предметном стекле, высушивают на воздухе, фиксируют в пламени горелки и окрашивают по Граму (см.</p>
--	---

«Микроскопические методы диагностики гонококковой инфекции»).

При исследовании мазков из культур учитывается морфология, расположение и окраска гонококков. После 18-24 часов культивирования гонококки в мазках представляют собой скопления грамтрицательных кокков и диплококков, имеющих более компактное расположение микроорганизмов в центре и разреженное, неравномерное распределение по периферии.

Наряду с интенсивно окрашенными в розово-красный цвет кокками встречаются и бледно окрашенные формы. Более старые культуры (48 часов и более) часто тяжело интерпретировать, т.к. отмечается большое количество полностью лизированных клеток. По мере старения культуры увеличивается полиморфность гонококков и вариабельность окраски по Граму.

Наряду с гонококками в мазках из первичных культур могут нередко встречаться штаммы стафилококков, стрептококков и др., отличающиеся по окраске от гонококков. При несоблюдении правил окраски по Граму они могут переобесцвечиваться и ошибочно приниматься за гонококки.

Оценка качества окраски мазков из культур – см. «Микроскопическая диагностика гонококковой инфекции».

Препараты с наличием грамтрицательных кокков и диплококков из культуры должны сохраняться в лаборатории в течение 3 месяцев.

Видовая идентификация проводится при выделении оксидазоположительных грамтрицательных диплококков, полученных из экстрагенитальных образцов клинического материала, генитальных

препаратов у детей и женщин в менопаузе.

Для подтверждающей идентификации нейссерий используется один из следующих тестов:

- изучение ферментативной активности
- молекулярно-биологические методы (см. приложение б).

Ферментативная активность *N.gonorrhoeae* изучается только у чистых культур гонококков. Реакции могут быть ложноположительными из-за загрязненности исследуемых колоний посторонней бактериальной флорой. Реакция также может быть ложно отрицательной если гонококки культивировались дольше чем 24 часа (из-за аутолиза) или если некоторые ингибирующие субстанции перенесены из чашки которая использовалась для первичного культивирования. Для того, чтобы избежать этих последствий, требуется проведение субкультивации колоний из первичной культуры с использованием новых чашек с неселективной средой (к примеру, на шоколадном агаре) в течение 18-24 часов.

Первичная культура гонококков не пригодна для изучения их ферментативной активности, т.к. она может содержать другие микроорганизмы, что может привести к ложному результату.

Изучение ферментативной активности *N.gonorrhoeae* проводится в росто-независимых тестах, которые дают возможность получить более быстрый (в течение нескольких часов) и специфический результат, позволяя идентифицировать исключительно *N.gonorrhoeae* и исключить другие непатогенные нейссерии. Существуют коммерческие наборы для изучения ферментативной активности *N.gonorrhoeae*. Оценка проводится по изменению цвета индикатора.

	<p>Результаты ферментативной активности разных видов <i>N.gonorrhoeae</i> и других оксидазо-положительных видов представлены в таблице 1.</p> <p>В случае получения роста грамотрицательных кокков на небогащенном питательном агаре (контрольная среда), выдается либо отрицательный результат лабораторного заключения, либо проводится видовая идентификация выделенной микрофлоры.</p> <p>Форма лабораторного заключения культурального (бактериологического) исследования:</p> <ul style="list-style-type: none"> - <i>N.gonorrhoeae</i> выделена; - <i>N.gonorrhoeae</i> не выделена. <p>В лабораторном заключении дополнительно можно дать информацию о сопутствующей микрофлоре с указанием ее морфотипа и грам-принадлежности.</p>
<p>Контроль качества</p>	<p>На преаналитическом этапе оценивается:</p> <ul style="list-style-type: none"> - взятие биологического материала в соответствии с требованиями; - выполнение требований хранения и доставки материала в лабораторию; - выполнение требований маркировки проб и соответствия маркировки пробы маркировке направления; - контроль растворов красителей (внешнее состояние, срок годности), условия и сроки хранения; - контроль транспортных и питательных сред, реагентов (внешнее состояние, срок годности), условия и сроки хранения; - качество лабораторной посуды. <p>Мероприятия аналитического этапа:</p> <ul style="list-style-type: none"> - включение официально зарегистрированных контрольных материалов; - соблюдение технологии окраски в соответствии с

	<p>инструкцией производителя;</p> <ul style="list-style-type: none">- исполнение методики постановки в соответствии с инструкцией производителя;- учет результатов с контрольным материалом и испытуемым образцом в соответствии с официально признанными критериями. <p>Мероприятия постаналитического этапа:</p> <ul style="list-style-type: none">- правильности внесения результатов в бланк исследования;- своевременное доведение информации до врача, назначившего исследование. <p>Контроль качества среды.</p> <p>Каждую новую партию среды необходимо контролировать на способность поддерживать рост гонококков. Это производится путем посева референс-штаммов гонококков. Каждая новая партия среды должна с использованием референс-штаммов быть исследована на ингибиторные свойства по отношению к другим бактериям и грибам путем использования таких референс-штаммов как <i>E. coli</i>, <i>S. epidermidis</i>, <i>N. sicca</i> и <i>C. albicans</i>, а также на стерильность (путем инкубации образца среды в термостате в течение 2-х дней).</p> <p>Контроль качества оксидазного теста.</p> <p>Для оценки качества оксидазного реагента обязательно используются как положительный, так и отрицательный контроли. Положительный контроль <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (к примеру, ATCC 27853), <i>N.gonorrhoeae</i> (к примеру, ATCC 19424). Отрицательный контроль <i>Staphylococcus aureus</i> (к примеру, ATCC 25923), <i>E.coli</i> (к примеру, ATCC 25922).</p> <p>Контроль качества для ферментации сахаров и хромогенных энзимсубстратных тестов.</p> <p>Каждая новая серия реактивов должна пройти контроль</p>
--	--

	качества при использовании референс-штаммов соответствующих бактерий, например, <i>N.gonorrhoeae</i> , <i>N.meningitidis</i> , <i>N.sicca</i> , <i>N.lactamica</i> и <i>M.catarrhalis</i> . Каждый раз, когда проводится видовая идентификация, те же референс-штаммы должны использоваться в качестве контроля.
--	--

Таблица 1. Ферментативная активность для разных видов *N. gonorrhoeae* и других оксидазо-положительных видов

Виды нейссерий	Ферментативная активность				
	Глюкоза	Мальтоза	Лактоза	Сахароза	Фруктоза
<i>N. gonorrhoeae</i>	+	-	-	-	-
<i>N. meningitidis</i>	+	+	-	-	-
<i>N. lactamica</i>	+	+	+	-	-
<i>N. cinerea</i>	+/-	-	-	-	-
<i>N. polysaccharea</i>	+	+	-	-	-
<i>N. sicca</i>	+	+	-	+	+
<i>N. mucosa</i>	+	+	-	+	+
<i>N. subflava*</i>	+	+	-	+/-	+/-
<i>N. flavescens</i>	-	-	-	-	-
<i>M. catarrhalis</i>	-	-	-	-	-
<i>K. denitrificans</i>	+	-	-	-	-

* включая биовары *subflava*, *flava*, и *perflava*, которые отличаются по активности и по отношению к сахарозе и фруктозе;

+ изменение цвета среды, свидетельствующее о ферментации (положительная реакция);

- отсутствие изменения цвета, свидетельствующее об отсутствии ферментации (отрицательная реакция);

+/- признак непостоянный у одного и того же штамма.

Рекомендуемые транспортные среды

Транспортные среды должны содержать уголь. К использованию может быть рекомендована транспортная система в полистироловой

пробирке со средой Амиес (Amies) с активированным углем (Германия).
Регистрационный № НМ – 7.8013 от 30.01.07.

Рекомендуемые к применению питательные среды

В качестве питательных сред могут использоваться следующие сертифицированные на территории Республики Беларусь среды:

- питательная среда для выделения гонококка ООО «Химмедсинтез», (г. Минск, Республика Беларусь). Регистрационный №ИМ – 7.92851 от 25.04.07;
- среда питательная для выделения гонококка, сухая, выпускаемая НПО «Микроген» МЗ РФ (г. Ставрополь), ФГУП (г. Москва, Россия). Регистрационный №ИМ – 7.5869 от 01.07.05;
- гонококковый шоколадный агар (BioMerieux, Франция) – Chocolate agar + Poly Vitex, Chocolate agar + Poly Vitex VCATL). Регистрационный №ИМ – 7.7461 от 01.08.06;
- GC-II агар с добавлением бычьего гемоглобина, выпускаемый компанией Becton Dickinson (США). Регистрационный №ИМ – 7.6081 от 02.09.05;
- GC агар Base, основа гонококкового агара (Hi – Media, Индия). Регистрационный №ИМ – 7.4175/0311 от 26.08.03;
- Готовая коммерческая система, включающая в себя селективную гонококковую среду и генератор СО₂ Gonoline (BioMerieux, Франция). Регистрационный №ИМ – 7.93199 от 27.07.07;
- селективные добавки с антибиотиками к питательным средам первичного выделения патогенных нейссерий, ингибирующие контаминантную флору;
 - V-C-A-T Inhibitor (Becton Dickinson, США). Содержит Vancomycin, Colistin, Anisomycin, Trimetoprim. Регистрационный №ИМ – 7.60.81 от 02.09.05;
 - V-C-N Inhibitor (Becton Dickinson, США). Содержит Vancomycin, Colistin, Nistatin. Регистрационный №ИМ – 7.60.81 от 02.09.05;
 - V-C-N-T Supplement (Hi-Media, Индия). Содержит Vancomycin, Colistin, Nistatin, Trimetoprim. Регистрационный № ИМ – 7.4175/0311 от 26.08.03.

Приложение № 5
к приказу Министерства здравоохранения
Республики Беларусь
20.05.2009 № 485

Методика определения антибиотикочувствительности и резистентности
Neisseria gonorrhoeae к антимикробным препаратам

Название	Определение антибиотикочувствительности и резистентности <i>N.gonorrhoeae</i> к антимикробным препаратам
Принцип	<p>Определение антибактериальных препаратов, целесообразных для лечения конкретного больного с гонококковой инфекцией.</p> <p>Определение чувствительности <i>N. gonorrhoeae</i> к антибактериальным препаратам проводится одним из следующих методов: диско-диффузионным, методом серийных разведений в агаре, использованием E-теста.</p> <p>К числу обязательных для тестирования относятся антибактериальные препараты, наиболее часто применяемые для лечения гонококковой инфекции - цефтриаксон/цефиксим, ципрофлоксацин/офлоксацин, спектиномицин.</p> <p>Другие антибактериальные препараты, рекомендуемые для проведения тестирования:</p> <ul style="list-style-type: none">- препараты группы пенициллина (бензилпенициллин, ампициллин, оксациллин, амоксициллин);- препараты группы тетрациклина (тетрациклин, доксициклин);- препараты группы макролидов (эритромицин, азитромицин);- препараты группы аминогликозидов (канамицин, гентамицин).

Биологический материал для исследования	Чистые суточные культуры <i>N. gonorrhoeae</i> , выделенные от больных
Подготовка проб к исследованию	<p>Для проведения тестов на чувствительность и устойчивость гонококков к антибиотикам необходимо использовать суточную культуру <i>N. gonorrhoeae</i> (не более 24 часов инкубации).</p> <p>Для определения антибиотико-чувствительности методом серийных разведений в агаре, необходимо подготовить чашки Петри с необходимой концентрацией антибиотиков. Готовые чашки Петри хранятся в холодильнике не более одной недели из-за возможной потери антимикробной активности.</p> <p>Питательные среды, после извлечения из холодильника, прогреваются в термостате при $36^0 \pm 1^0 \text{C}$ в течение 30 минут или выдерживаются при комнатной температуре в течение 1 часа.</p>
Необходимое оборудование и материалы	<p>Репликатор для посева микроорганизмов;</p> <p>пинцет медицинский;</p> <p>стерильная микробиологическая посуда (чашки Петри, пробирки);</p> <p>пипетка;</p> <p>стерильные ватные тампоны;</p> <p>стандарты МакФарланда (или прибор, их измеряющий);</p> <p>карандаш для маркировки стекол;</p> <p>СО₂ инкубатор;</p> <p>эксикатор;</p> <p>линейка;</p> <p>бактериологическая петля;</p> <p>предметные стекла;</p> <p>секундомер;</p> <p>одноразовые перчатки.</p>
Реагенты	Питательная среда для культивирования гонококков;

	<p>диски с антибиотиками (с или без автоматического диспенсера); сухие взвеси антибиотиков; стерильная дистиллированная вода; стерильный физиологический раствор; полоски для Е-теста; диски с нитроцефином; тест на цитохромную оксидазу.</p>
<p>Процедура проведения исследования диско-диффузионным методом</p>	<p>Метод основан на способности антибиотиков диффундировать из пропитанных ими бумажных дисков в питательную среду, угнетая рост гонококков, посеянных на поверхности среды.</p> <p>Для определения чувствительности к антибиотикам используется та же среда, что и для выделения гонококков. При определении чувствительности гонококков к антибиотикам следует использовать только стандартизированные диски.</p> <p>Сроки и условия хранения дисков с антибиотиками указываются на упаковке производителя.</p> <p>При определении чувствительности используют стандартное разведение гонококков в стерильном физ. растворе, соответствующее по плотности 0,5 по стандарту МакФарланда и содержащее примерно $1,0 \times 10^8$ КОЕ/мл. Подготовленное разведение гонококков следует использовать в течение не более 15 минут после приготовления.</p> <p>Нанесение взвеси гонококков на чашки Петри может проводиться либо с использованием коммерческих стерильных ватных тампонов, либо с использованием стерильной пипетки.</p> <p>Нанесение взвеси гонококков с использованием коммерческих стерильных ватных тампонов:</p> <p>Рекомендуется использовать тампоны из хлопковой ваты</p>

	<p>на деревянных палочках. Тампоны из синтетического материала не впитывают суспензию в достаточном количестве для посева по всей поверхности чашки, поэтому нежелательны для использования. Тампон погружают в стандартную суспензию, затем избыток удаляют отжатием тампона о стенки пробирки. Нанесение суспензии проводят штриховыми движениями в трех направлениях, поворачивая чашку Петри. Тампоном обрабатывают поверхность агара 3-4 раза.</p> <p>Нанесение взвеси гонококков с использованием пипетки: На поверхность чашки Петри с питательной средой стерильной пипеткой наносят 1-2 мл взвеси гонококков, равномерно распределяют по поверхности агара покачиванием, после чего удаляют избыток микробной взвеси пипеткой.</p> <p>Далее на поверхность агара наносят диски с антибиотиками. Аппликацию дисков проводят с помощью стерильного пинцета или автоматического диспенсера. Расстояние от диска до края чашки и между дисками должно быть 15-20 мм. На одну чашку диаметром 90-100 мм следует помещать не более 6 дисков. Диски должны равномерно контактировать с поверхностью агара, для чего их следует аккуратно прижимать пинцетом. Не следует один из дисков располагать в центре чашки. Диск, нанесенный на поверхность питательной среды, нельзя перемещать на новое место.</p> <p>Сразу после нанесения дисков чашки Петри помещают в CO₂ инкубатор или увлажненный эксикатор с содержанием CO₂ 5 %, и инкубируют при температуре 36°±1° С в течение суток.</p>
Учет и оценка результатов	Учет результатов проводится путем измерения диаметра (мм) зоны полного подавления видимого роста гонококков. По диаметру зон задержки роста судят о

	<p>чувствительности, умеренной чувствительности и устойчивости исследуемой культуры к антибиотикам. Диагностически значимые зоны задержки роста указываются производителями.</p>
<p>Процедура проведения анализа методом серийных разведений в агаре</p>	<p>Принцип метода заключается в приготовлении ряда последовательных разведений антибиотиков в питательной среде с внесением во все разведения исследуемой культуры гонококков. По подавлению роста бактерий определенной концентрацией антимикробного препарата судят о степени чувствительности данного штамма.</p> <p>Для определения чувствительности используют стандартное разведение гонококков, соответствующее по плотности 0,5 по стандарту МакФарланда и содержащее примерно $1,0 \times 10^8$ КОЕ/мл. После приготовления суспензии в течение не более чем 15 минут проводят посев культуры на чашки с разными концентрациями антибиотиков. На одну чашку можно поместить несколько штаммов гонококков при помощи специального репликатора.</p> <p>Последовательность проведения посева: на чашку со средой, не содержащей антибиотика (отрицательный контроль); далее на чашки Петри со средой в порядке возрастания концентрации антибиотика; последней засеивается еще одна чашка со средой без антибиотика (второй отрицательный контроль) для исключения контаминации в процессе посева. Кроме тестируемых штаммов гонококков обязательно проводится посев референс-штамма <i>N. gonorrhoeae</i> с известной чувствительностью к тестируемым антибиотикам.</p> <p>После проведения посева чашки Петри немедленно</p>

	<p>помещают в CO₂-инкубатор или увлажненный эксикатор с концентрацией CO₂ 5% и инкубируют при температуре 36±1° С в течение суток.</p>
Учет и оценка результатов	<p>По истечению 24 часов проводят оценку результата. Минимальной подавляющей концентрацией считается наименьшая концентрация антибиотика, при которой отсутствует рост гонококка.</p>
Процедура проведения E-теста	<p>Сущность метода заключается в способности антибиотиков диффундировать из пропитанных ими бумажных полосок в питательную среду, угнетая рост гонококков, посеянных на поверхности агара.</p> <p>При этом методе используются бумажные полоски с различными концентрациями антибиотиков на одной полоске.</p> <p>На чашку диаметром 90-100 мм наносится одна полоска. На чашку диаметром 140-150 мм можно нанести до 4 полосок, укладывая их по радиусу чашки.</p> <p>Для постановки готовится стандартное разведение гонококков, соответствующее 0,5 стандарту МакФарланд содержащее примерно 1.0×10^8 ИФЕ/мл. Используют чашки Петри диаметром 90-100 мм (25 мл среды) или 140-150 мм (60 мл среды) для получения гомогенного роста.</p> <p>Приготовленная суспензия гонококков должна использоваться в течение 15 минут со времени ее приготовления.</p> <p>Процедура посева культуры гонококков проводится аналогично методике, описанной для диско-диффузионного метода.</p> <p>Полоски E-теста, содержащие градиенты концентрации различных антибиотиков, наносятся на поверхность агара с помощью стерильного пинцета. Полоски должны быть нанесены равномерно и плотно прилегать к агару. Для</p>

	<p>этого их нужно аккуратно пригладить пинцетом в направлении от низкой концентрации к высокой. После того, как полоска нанесена, она не должна передвигаться на другое место.</p> <p>Сразу после инокуляции чашки помещаются в CO₂-инкубатор или увлажненный эксикатор с содержанием CO₂ 5%, и инкубируются при температуре 36°±1°С в течение суток.</p>
Учет и оценка результатов	Результат учитывается по зоне задержки роста гонококков и оценивается по МПК каждого тестируемого антибиотика.
Процедура определения β-лактамазной активности гонококков	<p>β-лактамазную активность гонококков определяют при помощи хромогенового цефалоспоринового теста.</p> <p>Для постановки теста используются диски, пропитанные нитроцефином, которые должны храниться замороженными (при -20°С).</p> <p>Диск с нитроцефином помещается на чистую сухую чашку Петри или предметное стекло и смачивается дистиллированной водой, или диск может быть внесен в пробирку, содержащую 0,3 мл стерильной дистиллированной воды.</p> <p>На диск бактериологической петлей помещается материал с 5-10 колоний гонококков или суспендируется в пробирке с диском.</p> <p>В качестве положительного контроля используется референс-штамм <i>Haemophilus influenzae</i>, в качестве отрицательного – референс-штамм <i>Enterococcus faecalis</i>.</p>
Учет и оценка полученных результатов	При изменении цвета с желтого на розовый или красный в течение 5-15 секунд тест расценивается как положительный. При отсутствии изменения окраски через 15 минут – как отрицательный. При использовании пробирки результаты оцениваются через 10-30 минут.
Контроль	На преаналитическом этапе оценивается:

качества	<ul style="list-style-type: none"> - контроль реагентов (внешнее состояние, срок годности), условия и сроки хранения; - контроль питательных сред (внешнее состояние, срок годности), условия и сроки хранения; - качество лабораторной посуды. <p>Мероприятия аналитического этапа:</p> <ul style="list-style-type: none"> - включение официально зарегистрированных контрольных материалов; - исполнение методики постановки в соответствии с инструкцией производителя; - учет результатов с контрольным материалом и испытуемым образцом в соответствии с официально признанными критериями. <p>Мероприятия постаналитического этапа:</p> <ul style="list-style-type: none"> - правильности внесения результатов в бланк исследования; - своевременное доведение информации до врача, назначившего исследование. <p>На результаты тестирования чувствительности к антибиотикам значительно влияют такие микробиологические параметры, как концентрация приготовленной суспензии из свежей культуры, состав и объем культуральной среды, качество антибиотиков (дисков), полосок для Е-теста, условия инкубации, а также факторы ингибирования.</p> <p>Критерии интерпретации (чувствительный, промежуточный и резистентный) необходимо оптимизировать для каждого метода. Кроме того, на регулярной основе с применением всех методов необходимо анализировать референс-штаммы <i>N. gonorrhoeae</i>, для которых установлена их чувствительность/ резистентность к тестируемым антибиотикам.</p>
----------	---

Приложение № 6
к приказу Министерства здравоохранения
Республики Беларусь
20.05.2009 № 485

Методика молекулярно- биологической диагностики гонококковой
инфекции

Название	Молекулярно-биологический метод диагностики гонококковой инфекции
Принцип	Диагностика <i>Neisseria gonorrhoeae</i> посредством обнаружения в образцах первичных проб нуклеиновых кислот возбудителя. Основные принципы организации ПЦР-лабораторий и проведения молекулярно-биологического метода диагностики изложены в инструкции «Организация работ в лабораториях, использующих метод полимеразной цепной реакции (ПЦР)» регистрационный номер 090-1008.
Биологический материал для исследования	отделяемое из уретры; отделяемое из цервикального канала; отделяемое из заднего свода влагалища; моча; секрет предстательной железы; соскоб из конъюнктивы (при наличии валидированных для данного материала тест-систем); соскоб из ротоглотки (при наличии валидированных тест-систем).
Подготовка проб к исследованию	В случае хранения проб в морозильной камере, пробирки с образцами первичных проб выдержать при комнатной температуре до их полного оттаивания. Не рекомендуется многократное замораживание-оттаивание проб.

<p>Оборудование, инструменты и материалы</p>	<p>Стерильные ламинарные шкафы для проведения ПЦР-исследований (не менее 2 шт.); холодильники на 2-8 °С с морозильной камерой (не менее 3 шт.); твердотельные термостаты для микропробирок (не менее 2 шт.); высокоскоростная (до 16000 об/мин) микроцентрифуга для пробирок типа «Eppendorf»; микроцентрифуги-вортексы для микропробирок (не менее 3 шт.); вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой; амплификатор (термоциклер) или амплификатор с детекцией результатов амплификации в режиме реального времени; ПЦР-детектор флуоресценции; источник постоянного тока для электрофореза; камера для горизонтального электрофореза с плашками и гребенками для приготовления геля; трансиллюминатор для детекции продуктов амплификации в агарозном геле; видеосистема для регистрации изображений; компьютер; микроволновая печь для приготовления агарозного геля или магнитная плитка-мешалка; одноразовые пластиковые микропробирки типа «Eppendorf» 1,5 мл; одноразовые пластиковые микропробирки 0,5 или 0,2 мл; наборы автоматических дозаторов переменного объема (отдельно для этапа выделения, амплификации выделенной нуклеиновой кислоты и детекции продуктов амплификации методом гель-электрофореза); одноразовые наконечники для дозаторов переменного</p>
--	--

	<p>объема, тестированные на отсутствие ДНК/РНК; одноразовые наконечники с аэрозольным барьером для дозаторов переменного объема, тестированные на отсутствие ДНК/РНК; стаканы; колбы; цилиндры; стеклянные палочки; штативы для микропробирок; штативы для автоматических дозаторов; емкости для дезинфекции; дезинфицирующие средства; бактерицидные облучатели; контейнеры для транспортировки образцов первичных проб; средства индивидуальной защиты (одноразовые перчатки, маски, бахилы).</p>
Реагенты	<p>транспортные среды для клинического материала; набор реагентов для выделения нуклеиновых кислот из проб первичных образцов; набор реагентов для проведения амплификации нуклеиновых кислот с детекцией методом гель-электрофореза или набор реагентов для проведения амплификации нуклеиновых кислот с детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени; набор реагентов для детекции продуктов амплификации методом гель-электрофореза; дистиллированная вода; 70% этиловый спирт.</p>
Подготовка к проведению анализа	<p>Все работы проводятся с использованием одноразовых расходных материалов, спецодежда меняется при переходе из одного помещения (зоны) в другое.</p>
Процедура	<p>Процедура включает в себя следующие этапы:</p>

анализа	<ul style="list-style-type: none"> - пробоподготовка (выделение нуклеиновых кислот) из образцов первичных проб или чистой культуры микроорганизма; - проведение амплификации; - детекция и учет продуктов амплификации. <p>Технология проведения этапов анализа описана в соответствующих инструкциях и рекомендациях производителя тест-систем.</p> <p>Организацию работ на всех этапах, а также обеззараживание проб необходимо проводить в соответствии с требованиями санитарных правил «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности и гельминтами», постановление №40 от 27.07.2000 г.</p>
Учет и оценка результатов	<p>Результаты амплификации анализируют с помощью: гель-электрофореза, флуоресцентного ПЦР-детектора или с использованием амплификатора с детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени.</p> <p>Проведение учета и оценки полученных результатов осуществляется согласно инструкциям производителей тест-систем с использованием соответствующего программного обеспечения.</p> <p>Форма лабораторного заключения:</p> <ul style="list-style-type: none"> - ДНК (РНК) <i>N.gonorrhoeae</i> обнаружена; - ДНК (РНК) <i>N.gonorrhoeae</i> не обнаружена.
Контроль качества	<p>На преаналитическом этапе оценивается:</p> <ul style="list-style-type: none"> - взятие биологического материала в соответствии с требованиями; - выполнение требований хранения и доставки материала в лабораторию; - выполнение требований маркировки проб и соответствия маркировки пробы маркировке направления; - контроль реагентов (внешнее состояние, срок годности),

условия и сроки хранения;

- качество лабораторной посуды.

Мероприятия аналитического этапа:

- включение официально зарегистрированных контрольных материалов;

- соблюдение технологии выполнения процедуры в соответствии с инструкцией производителя тест-систем;

- учет результатов с контрольным материалом и испытуемым образцом в соответствии с официально признанными критериями.

Мероприятия постаналитического этапа:

- правильности внесения результатов в бланк исследования;

- своевременное доведение информации до врача, назначившего исследование.

Внутренний контрольный образец, добавляемый на стадии выделения нуклеиновой кислоты, позволяет судить о наличии в пробах веществ, ингибирующих ПЦР, а также о качестве пробоподготовки.

Технология проведения реакции амплификации подразумевает обязательную постановку наряду с опытными пробами положительных и отрицательных контрольных образцов. Положительный контроль этапа амплификации включает в себя все компоненты реакции, но вместо материала клинического образца прошедшего пробоподготовку вносится контрольный препарат нуклеиновой кислоты. Отрицательный контроль включает в себя все компоненты реакции, но вместо материала клинического образца прошедшего пробоподготовку вносится буфер или деионизованная вода. Отрицательный контроль необходим для проверки компонентов реакции на отсутствие в них нуклеиновой кислоты *N.gonorrhoeae* или клеток возбудителя вследствие контаминации, и для

	<p>исключения получения ложноположительных результатов. Внутрелабораторный контроль качества проводят не реже 1 раза в квартал путем исследования шифрованных контрольных панелей содержащих «положительные» и «отрицательные» пробы. Контрольные панели могут быть приготовлены в лаборатории или используются стандартизированные референс-панели.</p> <p>При подозрении и для выявления возможной контаминации лаборатории нуклеиновыми кислотами, контроль следует проводить путем взятия и исследования смывов с поверхностей.</p> <p>Для обеспечения внешнего контроля качества проводимых исследований используются стандартизированные референс-панели, разрешенные к применению на территории Республики Беларусь.</p>
--	---