



МІНІСТЭРСТВА  
АХОВЫ ЗДАРОЎЯ  
РЭСПУБЛІКІ БЕЛАРУСЬ

МИНИСТЕРСТВО  
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

ЗАГАД

ПРИКАЗ

20.05.2009 № 486

г. Минск

г. Минск

Об утверждении инструкции по  
лабораторной диагностике хламидиоза

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 хламидиоза (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 хламидиоза

### ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

1. На территории Республики Беларусь лабораторная диагностика хламидийной инфекции осуществляется в клинико-диагностических, микробиологических, бактериологических и молекулярно-биологических лабораториях.

2. Данная инструкция разработана для решения следующих задач:  
- определения показаний к обследованию на хламидийную инфекцию;  
- определения спектра диагностических методов, используемых для диагностики хламидийной инфекции;  
- установления единых требований к порядку диагностики хламидийной инфекции.

3. Основным методом диагностики хламидийной инфекции являются методы амплификации нуклеиновых кислот (МАНК). Применение методов иммуноферментного анализа, направленного на выявление антител к возбудителю *Chlamydia trachomatis*, посева на живые клеточные культуры допустимо при проведении научно-исследовательских работ. Методика реакции прямой иммунофлуоресценции, направленная на выявление антигенов *Chlamydia trachomatis*, может использоваться в качестве отборочного теста.

4. Инструкция включает в себя следующие приложения:

Приложение 1. Показания к обследованию на хламидийную инфекцию;

Приложение 2. Взятие, транспортировка и хранение клинического материала;

Приложение 3. Молекулярно-биологическая диагностика хламидийной инфекции;

Приложение 4. Диагностика хламидийной инфекции с использованием реакции прямой иммунофлуоресценции.

Приложение 5. Культуральная диагностика хламидийной инфекции.

Приложение № 1  
к приказу Министерства здравоохранения  
Республики Беларусь  
20.05.2009 № 486

Перечень медицинских показаний для обследования на хламидийную  
инфекцию

Показания	Рекомендуемый вид исследований
<b>МУЖЧИНЫ</b>	
воспалительные заболевания половых путей (уретрит, эпидидимит, простатит, парауретрит, дизурия, кольцевидный баланит и баланопостит, деферентит, фуникулит, куперит; везикулит; колликулит; проктит и/или проктоколит).	МАНК
бесплодие, эпидидимит, орхит, орхоэпидидимит, простатит	МАНК
плановые оперативные вмешательства на органах мочеполовой системы	МАНК
воспалительные заболевания суставов	МАНК
длительно текущий конъюнктивит неустановленной этиологии.	МАНК
длительно текущий назофарингит неустановленной этиологии.	МАНК
<b>ЖЕНЩИНЫ</b>	
воспалительные заболевания половых путей (выделения из мочеполовых органов; уретрит, вульвовагинит, цервицит, ВЗОМТ, бартолинит, пельвиоперитонит,	МАНК

посткоитальные или межменструальные кровянистые выделения из половых путей, дизурия).	
воспалительные заболевания малого таза, хронические боли в области малого таза, бесплодие.	МАНК
женщины, которым ранее проводилось лечение влагалищной части шейки матки (консервативное, хирургическое лечение) без предварительного углубленного обследования.	МАНК
женщины с ранним сексуальным дебютом (до 17 лет).	МАНК
перед проведением медицинских вмешательств: прерывание беременности, проведение репродуктивных технологий (ЭКО, ИКСИ, инсеминация донорской спермой), проведение внутриматочных вмешательств, введение внутриматочных систем, плановыми операциями на органах мочеполовой системы.	МАНК
женщины с отягощенным акушерско-гинекологическим анамнезом, планирующие беременность.	МАНК
беременные женщины при постановке на учет.	МАНК
беременные с осложненным течением настоящей беременности: кольпит, цистит, пиелонефрит, кондиломатоз, угроза прерывания, истмико-цервикальная недостаточность, хориоамнионит, преждевременное излитие околоплодных вод.	МАНК
воспалительные заболевания суставов неустановленной этиологии.	МАНК

длительно текущий конъюнктивит неустановленной этиологии.	МАНК
длительно текущий назофарингит неустановленной этиологии.	МАНК
<b>НОВОРОЖДЕННЫЕ</b>	
длительно текущий конъюнктивит неустановленной этиологии.	МАНК
длительно текущий назофарингит неустановленной этиологии.	МАНК
новорожденные с осложнением перинатального периода: внутриутробная инфекция, конъюнктивит, заболевания органов дыхания, заболевания ЛОР–органов.	МАНК
<b>ЛИЦА</b>	
предполагающие у себя наличие хламидийной инфекции.	МАНК
имевшие половой контакт с лицом с установленной хламидийной инфекцией.	МАНК
при обследовании на другие ИППП.	МАНК
подвергшиеся половому насилию.	МАНК или культуральное исследование
группы риска: MSM, лица, занимающиеся коммерческим сексом.	МАНК

Приложение № 2  
к приказу Министерства здравоохранения  
Республики Беларусь  
20.05.2009 № 486

Правила отбора, транспортировки и хранения первичных проб

Метод исследования	Материалы и оборудование, инструментарий	Обследуемый очаг/биоматериал	Правила взятия	Сроки и условия хранения и транспортировки	Примечания
МАНК	Зонд универсальный; стерильный марлевый (ватный) тампон; стерильный контейнер для мочи; вагинальное зеркало; ложка Фолькмана; одноразовые пробирки с транспортной	Уретра, мужчины	Подготовка к взятию проб: помассировать уретру 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 ложку Фолькмана в наружное отверстие мочеиспускательного канала (на глубину 3-4 см) и слегка нажимая на переднюю стенку уретры собрать материал.	Непосредственно после взятия материал помещается в пробирку с транспортной средой. Пробы из уретры и цервикального канала могут храниться при комнатной температуре +18-+22 °С в течение 6 часов, при +2-+8°С в течение 2-х недель, при -	Взятие проб осуществляется следуя инструкции только стерильными одноразовыми инструментами. Детям препубертатного возраста мазки берутся из наружного
		Предстательная	Сбор материала: - получение материала		

	средой.	железа	<p>рекомендуется проводить после мочеиспускания;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- провести ректальный массаж предстательной железы;</li> <li>- материал для исследования собрать из наружного отверстия уретры.</li> </ul>	<p>20°С – 1 месяц, если иное не предусмотрено Производителем тест-систем.</p> <p>Секрет предстательной железы хранится при комнатной температуре (+18-+22 °С) в течение 6 часов, при +2-+8°С в течение 1-х суток, при -20°С – 1 неделя, если иное не предусмотрено Производителем тест-систем.</p> <p>Моча хранится при комнатной температуре +18-+22 °С в течение 6 часов, при +2-+8°С в течение 1-х суток.</p>	<p>отверстия мочеиспускательного канала мягким зондом или собирается моча. Допускается однократное размораживание образца.</p>
		Сперма	Забор спермы осуществлять в стерильные одноразовые флаконы или пробирки.		
		Уретра, женщины	<p>Подготовка к взятию образцов: наружное отверстие очистить с помощью стерильного тампона, при отсутствии свободных выделений провести легкий массаж уретры.</p> <p>Взятие материала: осторожно ввести универсальный зонд или ложку Фолькмана в наружное отверстие мочеиспускательного канала (на глубину 1-2 см) и слегка нажимая на переднюю стенку уретры собрать материал.</p>		
		Цервикальный канал	Подготовка к взятию образцов: ввести гинекологическое зеркало и очистить наружное отверстие цервикального канала от выделений при помощи стерильного тампона.		

			<p>Взятие материала: осторожно ввести универсальный зонд или ложку Фолькмана цервикальный канал (на глубину 2 см) и вращая его, собрать материал.</p>	<p>Отделяемое конъюнктивы хранится при комнатной температуре в течение 6 часов, при +2-8°C в течение 3-х суток, при -20°C – 1 месяц. Клинический материал, помещенный, в транспортную среду, должен транспортироваться при +18-+22°C в течение 2 часов, свыше 2 часов +2-+8°C в сумке-холодильнике. Моча должна быть доставлена в лабораторию в течение 3 часов без</p>
	Задний свод влагалища	<p>В случае избытка слизи и обильных выделений удалить их стерильным ватным тампоном. Проводят универсальным зондом или ложкой Фолькмана по поверхности слизистой в области заднего свода влагалища и эктоцервикса и переносят в пробирку с транспортной средой.</p>		
	Влагалище (у девочек препубертатного возраста)	<p>Взятие материала: Универсальный зонд или ложка Фолькмана осторожно вводится через гименальное отверстие во влагалище и вращательными движениями производится взятие материала.</p>		
	Моча	<p>Для исследования собирается первые 10-20 мл мочи (первая порция), выпущенной в стерильный контейнер.</p>		
	Конъюнктива	<p>Взятие материала: отводят нижнее веко и универсальным</p>		



			зондом или стерильным тампоном проводят по поверхности конъюнктивы нижнего века по направлению к внутреннему углу глаза. Исследование из каждого глаза проводят отдельным тампоном.	дополнительного замораживания или охлаждения. Пробирка с клиническим материалом помещается в герметичную емкость для транспортировки в сопровождении соответствующего направления.	
		Ротоглотка	Мазки взять универсальными зондами вращательными движениями с поверхности миндалин, небных дужек и задней стенки ротоглотки.		
	Иглы Паркер-Пирсона; стерильные медицинские перчатки; стерильные ватные шарики; спирт этиловый 70%; маркер.	Синовиальная жидкость	Получение синовиальной жидкости производится методом стандартной биопсии с использованием иглы Паркер-Пирсона.		
Метод прямой иммунофлуоресценции	Зонд универсальный; стерильный	Уретра, мужчины	Подготовка к взятию проб: помассировать уретру от основания пениса к его головке перед взятием уретрального материала, область	Непосредственно после взятия материала готовят мазок-	В случае несоблюдения правил взятия и

ресцен- ции	марлевый тампон; ложка Фолькмана; вагинальное зеркало; предметные стекла трехлуночные; покровные стекла.		наружного отверстия уретры очистить с помощью стерильного марлевого тампона, крайнюю плоть отвести назад. Взятие материала: осторожно ввести универсальный зонд или ложку Фолькмана в наружное отверстие мочеиспускательного канала (на глубину 3-4 см) и слегка нажимая на переднюю стенку уретры собрать материал.	отпечаток, касаясь поверхности лунки предметного стекла. Приготовленный мазок высушивают на воздухе. Высушенный мазок фиксируют холодным ацетоном в течение 1-2 мин. Стекло с фиксированным мазком может храниться при температуре +4°C в течение 3 суток, при -20 °C - в течение 1 месяца. Каждое стекло с образцом	условий доставки образцов (разбитые, непромар- кированные, склеенные друг с другом стекла, отсутствие материала на стекле) образцы не подлежат исследова- нию методом прямой иммуно- флуоресцен- ции.
		Уретра, женщи- ны	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 ложку Фолькмана в наружное отверстие мочеиспускательного канала (на глубину 0,5-2 см) и слегка нажимая на переднюю стенку уретры собрать материал вращательными движениями зонда.		
		Цервик альный	Подготовка к взятию образцов: ввести гинекологическое зеркало и		

		канал	очистить наружное отверстие цервикального канала от выделений при помощи стерильного тампона. Взятие материала: осторожно ввести универсальный зонд или ложку Фолькмана в цервикальный канал (на глубину 1-2 см), собрать материал вращательным движением зонда и извлечь, избегая соприкосновения инструмента со стенками влагалища.	маркируется и помещается в контейнер для транспортировки в сопровождении направления.	
Культуральный метод	Зонд универсальный; стерильный марлевый тампон; ложка Фолькмана; вагинальное зеркало; контейнер для мочи; стерильные медицинские перчатки;	Уретра, мужчины	Подготовка к взятию проб: помассировать уретру 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 ложку Фолькмана в наружное отверстие мочеиспускательного канала (на глубину 3-4 см) и слегка нажимая на переднюю стенку уретры собрать материал.	Сразу после взятия материал помещается в транспортную среду. В транспортной среде материал от больного может храниться при температуре +4°C - +8°C в течение 24-х часов. Промаркированная пробирка с	Взятие проб осуществляется строго следуя инструкции только стерильным и одноразовыми инструментами.

	транспортная среда.	Уретра, женщин	<p>Подготовка к взятию образцов: наружное отверстие очистить с помощью стерильного тампона, при отсутствии свободных выделений провести легкий массаж уретры.</p> <p>Взятие материала: осторожно ввести универсальный зонд или ложку Фолькмана в наружное отверстие мочеиспускательного канала (на глубину 0,5-2 см) и слегка нажимая на переднюю стенку уретры собрать материал вращательными движениями зонда.</p>	транспортной средой доставляется в лабораторию в сумке-холодильнике.	
		Цервикальный канал	<p>Подготовка к взятию образцов: ввести гинекологическое зеркало и очистить наружное отверстие цервикального канала от выделений при помощи стерильного тампона.</p> <p>Взятие материала: осторожно ввести универсальный зонд или ложку Фолькмана в цервикальный канал (на глубину 1-2 см), собрать материал вращательным движением зонда и извлечь, избегая соприкосновения тампона со стенками влагалища.</p>		

		Влагалище (у девочек препубертатного возраста)	Взятие материала: Универсальный зонд или ложка Фолькмана осторожно вводится через гименальное отверстие во влагалище и вращательными движениями производится взятие материала.		
		Конъюнктив	Взятие материала: отводят нижнее веко и универсальным зондом или стерильным тампоном проводят по поверхности конъюнктивы нижнего века по направлению к внутреннему углу глаза. Исследование из каждого глаза проводят отдельным тампоном.		
		Ротоглотка	Мазки взять универсальными зондами вращательными движениями с поверхности миндалин, небных дужек и задней стенки ротоглотки.		
	Иглы Паркер-Пирсона; стерильные медицинские перчатки; стерильные	Синовиальная жидкость	Получение синовиальной жидкости производится методом стандартной биопсии с использованием иглы Паркер-Пирсона.		

	ватные шарики; спирт этиловый 70%; маркер.				
--	---	--	--	--	--

Приложение № 3  
к приказу Министерства здравоохранения  
Республики Беларусь  
20.05.2009 № 486

Методика молекулярно-биологической диагностики хламидийной инфекции

Название	Метод амплификации нуклеиновых кислот МАНК
Принцип	<p>Диагностика <i>Chlamydia trachomatis</i> посредством обнаружения в образцах первичных проб нуклеиновых кислот возбудителя.</p> <p>Основные принципы организации ПЦР-лабораторий и проведения молекулярно-биологического метода диагностики изложены в инструкции МЗ РБ «Организация работ в лабораториях, использующих метод полимеразной цепной реакции (ПЦР)» рег. № 090-1008 от 13.11.2008г.</p>
Биологический материал для исследования	<ul style="list-style-type: none"> <li>- соскоб эпителиальных клеток из уретры;</li> <li>- соскоб эпителиальных клеток из цервикального канала;</li> <li>- отделяемое из заднего свода влагалища;</li> <li>- сперма;</li> <li>- секрет предстательной железы;</li> <li>- моча;</li> <li>- соскоб из конъюнктивы;</li> <li>- соскоб из ротоглотки;</li> <li>- синовиальная жидкость.</li> </ul>
Подготовка проб к исследованию	<p>В случае хранения проб в морозильной камере, пробирки с образцами первичных проб следует выдержать при комнатной температуре до их полного оттаивания.</p> <p>Не допускается повторное замораживание-оттаивание проб.</p>
Оборудование, инструменты и материалы	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. ПЦР- боксы для проведения ПЦР-исследований (не менее 2 шт.);</li> <li>2. холодильники на 2-8 °С с морозильной камерой (не менее 3 шт.);</li> <li>3. твердотельные термостаты для микропробирок (не менее 2 шт.);</li> </ol>

4. высокоскоростная (до 14000 об/мин) микроцентрифуга для пробирок типа «Eppendorf»;
5. микроцентрифуги-вортексы для микропробирок (не менее 3 шт.);
6. амплификатор (термоциклер) или амплификатор с детекцией результатов амплификации в режиме реального времени;
7. ПЦР-детектор флуоресценции;
8. источник постоянного тока для электрофореза;
9. камера для горизонтального электрофореза с плашками и гребенками для приготовления геля;
10. трансиллюминатор для детекции продуктов амплификации в агарозном геле;
11. видеосистема для регистрации изображений;
12. компьютер;
13. микроволновая печь для приготовления агарозного геля или магнитная плитка-мешалка;
14. одноразовые пластиковые микропробирки типа «Eppendorf» 1,5 мл;
15. одноразовые пластиковые микропробирки 0,5 или 0,2 мл;
16. наборы автоматических дозаторов переменного объема (отдельно для этапа выделения, амплификации выделенной нуклеиновой кислоты и детекции продуктов амплификации методом гель-электрофореза);
17. одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема, тестированные на отсутствие ДНК/РНК;
18. одноразовые наконечники с аэрозольным барьером для дозаторов переменного объема, тестированные на отсутствие ДНК/РНК;
19. стеклянные стаканы;
20. стеклянные колбы;
21. стеклянные палочки;
22. штативы для микропробирок;
23. штативы для автоматических дозаторов;
24. емкости для дезинфекции;
25. дезинфицирующие средства;



	<p>26. бактерицидные облучатели;</p> <p>27. контейнеры для транспортировки образцов первичных проб;</p> <p>28. средства индивидуальной защиты (одноразовые перчатки, маски и др).</p>
Реагенты	<ul style="list-style-type: none"> <li>- набор реагентов, зарегистрированных в МЗ РБ, для выделения нуклеиновых кислот из проб первичных образцов;</li> <li>- набор реагентов, зарегистрированных в МЗ РБ, для проведения амплификации нуклеиновых кислот с детекцией методом гель-электрофореза;</li> <li>- набор реагентов, зарегистрированных в МЗ РБ, для проведения амплификации нуклеиновых кислот с детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени;</li> <li>- набор реагентов, зарегистрированных в МЗ РБ, для детекции продуктов амплификации методом гель-электрофореза;</li> <li>- дистиллированная вода;</li> <li>- 70% этиловый спирт.</li> </ul>
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 анализа	<p>Процедура включает в себя следующие этапы:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- пробоподготовка (выделение нуклеиновых кислот и удаление ингибиторов ПЦР) из образцов первичных проб или чистой культуры микроорганизма;</li> <li>- проведение амплификации;</li> <li>- детекция и учет продуктов амплификации.</li> </ul> <p>Технология проведения этапов анализа описана в соответствующих инструкциях и рекомендациях Производителей тест-систем.</p> <p>Организацию работ на всех этапах, а также обеззараживание проб необходимо проводить в соответствии с инструкцией МЗ РБ «Организация работ в лабораториях, использующих метод полимеразной цепной реакции (ПЦР)» рег. № 090-1008 от 13.11.2008г.</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. Проведение учета и оценки полученных результатов осуществляется согласно инструкциям Производителей тест-систем.</p>
Заключение лабораторного исследования	<p>Нуклеиновая кислота, специфичная для <i>Chlamydia trachomatis</i>, обнаружена.  Нуклеиновая кислота, специфичная для <i>Chlamydia trachomatis</i>, не обнаружена.</p>
Контроль качества	<p>На преаналитическом этапе оценивается:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- взятие биологического материала в соответствии с требованиями;</li> <li>- выполнение требований хранения и доставки материала в лабораторию;</li> <li>- выполнение требований маркировки проб и соответствия маркировки пробы маркировке направления;</li> <li>- контроль реагентов (внешнее состояние, срок годности), условия и сроки хранения;</li> <li>- качество лабораторной посуды.</li> </ul> <p>Мероприятия аналитического этапа:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- включение официально зарегистрированных контрольных материалов;</li> <li>- соблюдение технологии выполнения процедуры в соответствии с инструкцией производителя тест-систем;</li> <li>- учет результатов испытуемого образца в сравнении с контрольным материалом.</li> </ul> <p>Внутренний контрольный образец, добавляемый на стадии выделения нуклеиновой кислоты, позволяет судить о наличии в пробах веществ, ингибирующих ПЦР, а также о качестве пробоподготовки.</p> <p>Технология проведения реакции амплификации подразумевает обязательную постановку наряду с опытными пробами положительных и отрицательных контрольных образцов. Положительный контроль этапа</p>

	<p>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 специфической нуклеиновой кислоты или клеток возбудителя вследствие контаминации, и для исключения получения ложноположительных результатов.</p> <p>Внутрилабораторный контроль качества проводят не реже 1 раза в месяц путем исследования шифрованных контрольных панелей содержащих «положительные» и «отрицательные» пробы. Контрольные панели могут быть приготовлены в лаборатории или использованы референс-панели, зарегистрированные в МЗ РБ.</p> <p>В рамках внутрилабораторного контроля качества 1 раз в месяц, а также при подозрении и для выявления возможной контаминации лаборатории нуклеиновыми кислотами, следует проводить исследования смывов с рабочих поверхностей и оборудования.</p> <p>Для обеспечения внешнего контроля качества проводимых исследований используются референс-панели, разрешенные к применению на территории РБ.</p> <p>Мероприятия постаналитического этапа:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- правильность внесения результатов в бланк исследования и формулировка лабораторного заключения;</li> <li>- своевременное доведение информации до врача, назначившего исследование.</li> </ul>
<p>Перечень возможных ошибок при выполнении и пути их</p>	<p>Появление специфической полосы в отрицательном контроле свидетельствует о наличии контаминации реактивов или проб. В этом случае результаты анализа по всем пробам считаются недействительными. Контаминация может быть спорадическая (появление</p>

устранения	<p>ложноположительных результатов в некоторых пробах) и тотальная (появление ложноположительных результатов в каждой пробе) Требуется повторить анализ проб, а также предпринять меры по выявлению источника контаминации.</p> <p>Появление неспецифических продуктов амплификации при их детекции методом электрофореза: дополнительные полосы, «шмеры». Появление в дорожках неспецифических полос на разных уровнях свидетельствует о неверном температурном режиме в ячейках амплификатора, или об отсутствии «горячего старта». При этом необходимо отрегулировать температурный режим в ячейках амплификатора и использовать «горячий старт» до начала циклов амплификации.</p> <p>Отсутствие в пробе полос внутреннего контроля и специфического фрагмента амплификации ДНК свидетельствует об ошибке в процедуре подготовки клинического материала, а результаты, полученные по данной пробе, считаются недействительными. Требуется повторить анализ пробы, начиная с этапа выделения.</p> <p>При проведении детекции в режиме реального времени значение порогового цикла в пробе выше параметра указанного Производителем тест-системы свидетельствует об ошибке. Следует повторить анализ пробы, начиная с этапа пробоподготовки.</p>
Противопоказания для применения	Противопоказаний для применения метода нет.

Приложение № 4  
к приказу Министерства здравоохранения  
Республики Беларусь  
20.05.2009 № 486

Методика диагностики хламидийной инфекции с использованием реакции  
прямой иммунофлуоресценции

Название	Диагностика хламидийной инфекции с использованием реакции прямой иммунофлуоресценции (РИФ)
Принцип	Метод основан на взаимодействии хламидийных антител, меченых ФИТЦ, с поверхностным антигеном <i>Chlamydia trachomatis</i> .
Материал для исследования	- соскоб из уретры; - соскоб из цервикального канала; - отделяемое из заднего свода влагалища у девочек.
Необходимое оборудование и материалы	1. Люминисцентный микроскоп (или оптический микроскоп с люминисцентной насадкой) с системой фильтров для ФИТЦ (возбуждающий свет длиной волны <490 нм и эмиссией 520 нм); 2. термостат; 3. влажная камера; 4. перчатки медицинские; 5. емкости для сбора и обработки стекол; 6. предметные стекла трехлуночные; 7. покровные стекла; 8. дозаторы переменного объема; 9. карандаш для маркировки стекол.
Реагенты	- ацетон или 96° этиловый спирт; - дистиллированная вода; - буферный раствор рН 7-8,5; - нефлуоресцирующее иммерсионное масло; - дезинфицирующие растворы; - коммерческий набор для проведения реакции прямой иммунофлуоресценции, зарегистрированный в МЗ РБ.
Подготовка к проведению анализа	Высушенный на воздухе мазок фиксируют холодным ацетоном или 96° этиловым спиртом в течение 1-2 мин. Стекло с фиксированным мазком может храниться при

	<p>температуре +4°C в течение 3 суток, при -20 °С - в течение 1 месяца.</p> <p>Приготовление реагентов проводится в соответствии с инструкцией Производителя.</p>
<p>Постановка реакции прямой иммунофлуоресценции</p>	<p>Постановка реакции прямой иммунофлуоресценции проводится в соответствии с инструкцией Производителя.</p> <p>Рекомендуется использовать масляную иммерсию с объективом МИ 90х и окулярами 4-7х, либо водно-иммерсионную систему с объективами ВИ 60-70х и окулярами 7х. Используют микроскоп с фильтрами, обеспечивающими возбуждающий свет с длиной волны не более 490 нм и эмиссию с длиной волны 520 нм.</p>
<p>Учет и оценка результатов</p>	<p>Для оценки качества взятия материала просматривают не менее 10 полей зрения, используя увеличение люминисцентного микроскопа х400. В одном поле зрения должно быть не менее 5 клеток цилиндрического эпителия.</p> <p>Результат считается положительным, если в мазке регистрируют ярко-зеленое свечение в виде кофейного зерна (элементарные тельца – основной критерий положительного результата). Эпителиальные клетки окрашены в красно-оранжевый цвет.</p> <p>Результат считается отрицательным, если в мазке отсутствует специфическое свечение при обязательном наличии не менее 50 эпителиальных клеток.</p>
<p>Заключение лабораторного исследования</p>	<p>Антиген, специфичный для <i>Chlamydia trachomatis</i>, выявлен.</p> <p>Антиген, специфичный для <i>Chlamydia trachomatis</i>, не выявлен.</p>
<p>Контроль качества</p>	<p>На преаналитическом этапе оценивается:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- взятие биологического материала;</li> <li>- выполнение требований хранения и доставки материала в лабораторию;</li> <li>- выполнение требований маркировки проб и соответствия маркировки пробы маркировке направления;</li> <li>- контроль приготовления реагентов, условия и сроки</li> </ul>

	<p>хранения;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- качество лабораторной посуды.</li> </ul> <p>Мероприятия аналитического этапа:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- включение официально зарегистрированных контрольных материалов;</li> <li>- соблюдение технологии постановки реакции прямой иммунофлуоресценции в соответствии с инструкцией Производителя;</li> <li>- учет результатов в соответствии с официально признанными критериями.</li> </ul> <p>Мероприятия постаналитического этапа:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- правильность внесения результатов в бланк исследования и формулировка лабораторного заключения;</li> <li>- своевременное доведение информации до врача, назначившего исследование.</li> </ul>
<p>Перечень возможных ошибок при выполнении и пути их устранения</p>	<p>Нарушение техники взятия, правил хранения и транспортировки клинического материала.</p> <p>Неудовлетворительное техническое состояние оборудования. Оборудование, используемое для проведения реакции прямой иммунофлуоресценции, должно иметь соответствующие сертификаты о государственной поверке и метрологической аттестации.</p> <p>Нарушение методики проведения реакции иммунофлуоресценции. Постановка реакции РИФ для выявления антигена, специфичного для возбудителя <i>Chlamydia trachomatis</i>, должна проводиться в строгом соответствии с данной инструкцией</p>
<p>Противопоказания для применения</p>	<p>Данный метод не может быть использован в решении спорных вопросов.</p> <p>Метод не может быть использован в качестве критерия излеченности.</p> <p>Метод не может применяться для исследования биологического материала, полученного неинвазивным способом (моча, сперма).</p>

Приложение № 5  
к приказу Министерства здравоохранения  
Республики Беларусь  
20.05.2009 № 486

Методика культуральной диагностики хламидийной инфекции

Название	Культуральный метод диагностики хламидийной инфекции
Принцип	Метод основан на выделении культуры <i>Chlamydia trachomatis</i> с использованием специальных питательных сред.
Биологический материал для исследования	<ul style="list-style-type: none"> <li>- соскоб из уретры;</li> <li>- соскоб из цервикального канала;</li> <li>- отделяемое из заднего свода влагалища;</li> <li>- сперма;</li> <li>- секрет предстательной железы;</li> <li>- соскоб из конъюнктивы;</li> <li>- соскоб из ротоглотки;</li> <li>- синовиальная жидкость.</li> </ul>
Оборудование, инструменты и материалы	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Камера Горяева;</li> <li>2. светооптический микроскоп с иммерсионным объективом;</li> <li>3. инвертный микроскоп;</li> <li>4. стерильные пенфлаконы или культуральные панели;</li> <li>5. водяная баня;</li> <li>6. шейкер;</li> <li>7. центрифуга с горизонтальным ротором;</li> <li>8. эксикатор или CO<sub>2</sub>-инкубатор;</li> <li>9. автоклав;</li> <li>10. влажная камера или чашка Петри с увлажненным фильтром;</li> <li>11. средства индивидуальной защиты персонала;</li> <li>12. предметные стекла;</li> <li>13. карандаш для маркировки стекол.</li> </ol>
Реагенты	<ul style="list-style-type: none"> <li>- культура клеток McCoу; линии L-929, Hela и др.</li> <li>- ростовая среда;</li> </ul>



	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 0,02% раствор Версена;</li> <li>- 0,25% раствор трипсина;</li> <li>- раствор трипанового синего;</li> <li>- среда роста: среда Игла с 3% глутамина, содой, NERES, 5-7% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) и гентамицином (20 мкг/мл);</li> <li>- изолирующая среда: среда Игла с 3% глутамина, содой, NERES, гентамицином (20 мкг/мл), эмбриональная телячья сыворотка (ЭТС) в количестве 10% от общего объема, 40% раствор глюкозы (1,25 мл на 100 мл среды);</li> <li>- транспортная среда на основе сахарозо-фосфатного буфера;</li> <li>- раствор Хенкса;</li> <li>- метанол или формалин;</li> <li>- дистиллированная вода;</li> <li>- HCl для корректирования pH;</li> <li>- изолирующая среда.</li> </ul>
<p>Подготовка к проведению анализа</p>	<p>Ведение культуры клеток</p> <p>Для ведения культуры McCoу, L-929, Hela и др. используется ростовая среда. Пересев клеток проводится на 4 сутки.</p> <p>Для более быстрого и полного снятия клеток со стекла к 0,02% раствору Версена добавляют 0,25% раствор трипсина в соотношении 2:1.</p> <p>Контроль качества культуры клеток проводится прижизненно под светоптическим микроскопом. В работу берутся клетки с отсутствием зернистости в цитоплазме и четкими границами. Подсчет клеток выполняют по общепринятой методике в камере Горяева с использованием трипанового синего.</p> <p>Приготовление клеточного монослоя.</p> <p>Суспензия клеток McCoу, линии L-929, Hela и др. в ростовой среде в концентрации 50-100 тыс./мл разливается по 2 мл в стерильные пенфлаконы, содержащие на дне подложки (покровные стекла), или по 1 мл – в лунки специальных 24-луночных культуральных панелей типа «Costar» с подложками</p>

	<p>или без них.</p> <p>Монослой на поверхности покровных стекол должен стать слитным через 2 суток. Его следует оценивать в инвертном микроскопе. Нельзя работать с культурой, если среда мутная, щелочная или контаминирована. Следует подобрать концентрацию клеток таким образом, чтобы формирование монослоя происходило через 2 суток. Если крышки культуральных панелей не обеспечивают герметичность, культуру инкубируют во влажной атмосфере CO<sub>2</sub> (около 5%) с тем, чтобы регулировать pH.</p> <p>Клеточный монослой можно формировать непосредственно на дне лунки панели. Отсутствие подложки увеличивает площадь монослоя, упрощает процесс его снятия при проведении пассажей. При наличии погружного объектива индикацию хламидий можно выполнять в лунках панелей.</p>
Процедура анализа	<p>Образцы биологического материала, если они были заморожены, оттаивают на водяной бане при 37°C. Во флаконы, содержащие клинический материал, добавляют по 2-3 мл изолирующей среды.</p> <p>Для придания образцам однородности их встряхивают на шейкере.</p> <p>Маркируют лунки панелей.</p> <p>Перед заражением из лунок с монослоем McCoу линии L-929, HeLa и др. удаляют ростовую среду. Для повышения чувствительности культуры клеток к хламидиям можно проводить предварительную обработку клеток DEAE-декстраном.</p> <p>После удаления ростовой среды проводят инокуляцию образцов и контролей на монослой в количестве 0,5 мл на лунку панели. Панель помещают в центрифугу с горизонтальным ротором и центрифугируют при 2500-3000 g в течение 1 часа. Необходимая температура (33-35°C) в центрифуге обычно достигается от выделения тепла самим ее механизмом при такой скорости. Центрифуга может</p>

	<p>быть подогрета холостым ходом или обдувом горячим воздухом.</p> <p>После центрифугирования зараженную культуру на 2 часа помещают в CO<sub>2</sub>-инкубатор (или эксикатор) при 37°C.</p> <p>Удаляют инокулят, после чего в каждую лунку или флакон вносят по 1-2 мл изолирующей среды с циклогексимидом. Панели инкубируют в CO<sub>2</sub>-инкубаторе в течение 24-72 часов, а флаконы помещают в обычный термостат на этот же период.</p> <p>Исследование зараженной культуры проводится после 24-часового инкубирования при использовании иммунофлуоресцентного метода и спустя 48-72 часа при использовании окраски по Романовскому-Гимзе.</p>
<p>Учет и оценка результатов</p>	<p>Оценка полученных результатов может проводиться одним из следующих методов:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- окраска по Романовскому-Гимзе.</li> </ul> <p>Готовый жидкий краситель перед окрашиванием мазков разводят из расчета 1-2 капли красителя на 1 мл дистиллированной воды.</p> <p>Мазки, фиксированные в метиловом спирте, окрашивают раствором (1 мл готовой жидкой краски + 2 мл основного буферного раствора + 47 мл дистиллированной воды) в течение 40—120 мин (продолжительность окрашивания подбирают эмпирически) при 37°C во влажной камере (закрытая чашка Петри с увлажнённым фильтром на дне). После окрашивания мазки промывают в проточной воде и высушивают на воздухе.</p> <p>Препарат микрокопируют, начиная с малого увеличения (объектив x10), затем переводят на большое увеличение (объектив x40), затем используют иммерсию (объектив x100 иммерсионный), окуляр x7 или x10.</p> <p>При детекции с использованием окраски по Романовскому-Гимзе в зараженной культуре выявляются включения элементарных телец хламидий в виде нескольких, обычно зернистых, микроколоний</p>

	<p>сине-фиолетового цвета;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- выявление хламидий с помощью иммунофлуоресцентного метода проводится согласно инструкции Производителя к прилагаемой тест-системе.</li> </ul>
Заключение лабораторного исследования	<p>Возбудитель Chlamydia trachomatis выявлен. Возбудитель Chlamydia trachomatis не выявлен.</p>
Контроль качества	<p>На преаналитическом этапе оценивается:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- взятие биологического материала в соответствии с требованиями;</li> <li>- выполнение требований хранения и доставки материала в лабораторию;</li> <li>- выполнение требований маркировки проб и соответствия маркировки пробы маркировке направления;</li> <li>- контроль растворов красителей (внешнее состояние, срок годности), условия и сроки хранения;</li> <li>- контроль транспортных и питательных сред, реагентов (внешнее состояние, срок годности), условия и сроки хранения;</li> <li>- качество лабораторной посуды.</li> </ul> <p>Мероприятия аналитического этапа:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- включение официально зарегистрированных контрольных материалов;</li> <li>- соблюдение технологии окраски в соответствии с инструкцией производителя;</li> <li>- контроль качества среды;</li> <li>- учет результатов в соответствии с официально признанными критериями.</li> </ul> <p>Мероприятия постаналитического этапа:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- правильность внесения результатов в бланк исследования и формулировка лабораторного заключения;</li> <li>- своевременное доведение информации до врача, назначившего исследование.</li> </ul>
Перечень возможных	<p>Нарушение техники взятия, правил хранения и транспортировки клинического материала. Техника</p>

<p>ошибок при выполнении и пути устранения</p>	<p>взятия материала, правила хранения и транспортировки биологического материала должны проводиться в строгом соответствии с Приложением 2 настоящей инструкции.</p> <p>Неудовлетворительное техническое состояние оборудования. Оборудование, используемое для проведения культуральных исследований, должно иметь соответствующие сертификаты о государственной поверке и метрологической аттестации.</p> <p>Нарушение методики проведения культурального исследования, окраски по Романовскому-Гимзе, реакции прямой иммунофлуоресценции. Проведение культурального исследования с последующей окраской по Романовскому-Гимзе или постановкой реакции прямой иммунофлуоресценции для выявления возбудителя <i>Chlamydia trachomatis</i> должно проводиться в строгом соответствии с инструкцией производителя тест-системы, а также настоящей инструкцией.</p>
<p>Противопоказания для применения</p>	<p>Противопоказаний для применения нет.</p>