



МІНІСТЭРСТВА
АХОВЫ ЗДAROЎ'Я
РЭСПУБЛІКІ БЕЛАРУСЬ

МИНИСТЕРСТВО
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

ЗАГАД

ПРИКАЗ

20.05.2009 № 487

г. Минск

г. Минск

Об утверждении инструкции по
лабораторной диагностике
трихомонадной инфекции

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 трихомонадной инфекции (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
трихомонадной инфекции

ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

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

2. Данная инструкция разработана для решения следующих задач:

- определения показаний к обследованию на трихомонадную инфекцию;
- определения спектра диагностических методов, используемых для диагностики трихомонадной инфекции;
- установления единых требований к порядку диагностики трихомонадной инфекции.

3. Диагноз трихомонадной инфекции устанавливается на основании положительных результатов микроскопического, культурального или молекулярно-биологического исследования при исследовании материалов из мочеполовых путей.

4. Контроль излеченности трихомонадной инфекции проводится тем же методом, с помощью которого устанавливался первичный диагноз: микроскопическим методом - не ранее чем через 10-14 дней после окончания лечения, методом амплификации нуклеиновых кислот (МАНК) - не ранее, чем через 4 недели после окончания лечения, культуральным методом - через 10-14 дней после окончания лечения.

5. Инструкция включает в себя следующие приложения:

Приложение 1. Показания к обследованию на трихомонадную инфекцию;

Приложение 2. Взятие, транспортировка и хранение клинического материала;

- Приложение 3. Микроскопическая диагностика трихомонадной инфекции;
- Приложение 4. Культуральная диагностика трихомонадной инфекции;
- Приложение 5. Молекулярно-биологическая диагностика трихомонадной инфекции.

Приложение № 1
к приказу Министерства здравоохранения
Республики Беларусь
20.05.2009 № 487

Перечень медицинских показаний для обследования на трихомонадную инфекцию

Показания	Рекомендуемый вид исследования
ЖЕНЩИНЫ	
наличие жалоб на выделения из мочеполовых путей, зуд, жжение, дискомфорт в области мочеполовых органов, боли внизу живота, усиление белей	микроскопический метод и\или МАНК
гиперемия, отечность слизистой оболочки вульвы, влагалища; вагинальные выделения серого, серо-желтого, желто-зеленого цвета, пенистые с неприятным запахом	микроскопический метод и\или МАНК
эрозивно-язвенные поражения слизистой оболочки наружных половых органов и (или) кожи внутренней поверхности бедер; петехиальные кровоизлияния на слизистой влагалищной части шейки матки («клубничная шейка матки»)	микроскопический метод и\или МАНК
наличие симптомов воспалительных заболеваний органов малого таза (ВЗОМТ)	микроскопический метод и\или МАНК
бесплодие, невынашивание беременности	МАНК или культуральное исследование
направляемые на прерывание беременности, внутриматочные	МАНК

манипуляции	
беременные женщины*	микроскопический метод и\или МАНК двукратно: 1-ое - при постановке на учет; 2-е - 36-40 недель
роженицы без обменных карт в родильных домах	микроскопический метод
родильницы с осложненным течением послеродового периода	МАНК
МУЖЧИНЫ	
наличие жалоб на выделения из уретры, зуд, жжение в области уретры, дизурия	микроскопический метод или МАНК
воспаление в области наружного отверстия уретры, парауретральных ходов	микроскопический метод или МАНК
наличие симптомов восходящей инфекции (простатит, эпидидимит, орхоэпидидимит и др.)	МАНК или культуральное исследование
эрозивно-язвенные поражения кожи головки и крайней плоти полового члена	микроскопический метод или МАНК
Бесплодие	МАНК или культуральное исследование
ДЕТИ (ДЕВОЧКИ)	
Вульвовагинит	микроскопический метод и\или МАНК
наличие симптомов ВЗОМТ	микроскопический метод и\или МАНК
ЛИЦА	
вступавшие в половой контакт с больным трихомонадной инфекцией	микроскопический метод или МАНК
проходящие скрининговое обследование на другие ИППП* или с установленным диагнозом ИППП	микроскопический метод или МАНК

декретированных профессий при проведении обязательных медицинских осмотров*	микроскопический метод
подвергшиеся сексуальному насилию	МАНК
При проведении репродуктивных технологий (ЭКО, ИКСИ, донорская инсеминация)	МАНК или культуральное исследование, при каждом обращении

*При выявлении признаков воспалительных изменений мочевого тракта дальнейшее обследование проводится в соответствии с клиническими показаниями.

Приложение № 2
к приказу Министерства здравоохранения
Республики Беларусь
20.05.2009 № 487

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

Метод исследо- вания	Материалы и оборудо- вание, инструмен- тарий	Обслед уемый очаг/ биома- териал	Правила взятия	Сроки, условия хранения и транспортировки	Примечания
----------------------------	--	--	----------------	---	------------

Микроскопический: нативный препарат	Зонд универсальный; одноразовая бактериологическая петля (1мкл, 10 мкл); стерильный ватный/ дакроновый тампон; стерильный марлевый (ватный) тампон;	Отделяемое уретры у мужчин	Подготовка к взятию проб: перед взятием уретрального материала пациент массирует уретру от основания пениса к его головке, область наружного отверстия уретры очистить с помощью стерильного марлевого тампона, крайнюю плоть отвести назад. Взятие материала: осторожно ввести инструмент для взятия материала в наружное отверстие мочеиспускательного канала (на глубину 4-6 см) и слегка нажимая на переднюю стенку уретры собрать материал. При наличии свободно стекающих выделений материал получают без предварительного массажа уретры.	1) при наличии микроскопа в кабинете врача проба микроскопируется немедленно; 2) Для транспортировки в лабораторию приготовленный препарат помещается во влажную камеру, в контейнер для транспортировки и немедленно транспортируется	
---	---	----------------------------	--	---	--

ложка Фолькмана; зеркало вагинальное; стекла предметные; стекла покровные; изотонический раствор хлорида натрия стерильный; контейнер для сбора мочи стерильный; пробирки с транспортной средой; маркер по стеклу	Отделяемое заднего свода влагалища Секрет предстательной железы	Подготовка к взятию образцов: Стерильным ватным тампоном очистить слизистую наружных половых органов, ввести гинекологическое зеркало. Взятие материала: инструментом для взятия материала собрать отделяемое заднего свода и стенок влагалища (после гистерэктомии материал берётся из боковых сводов влагалища). У девочек и женщин, не имевших в анамнезе половых контактов, при отсутствии выделений инструмент для взятия материала осторожно вводится через гименальное отверстие во влагалище и материал берется из заднего свода влагалища. Сбор материала: - получение материала рекомендуется проводить после мочеиспускания; - провести ректальный массаж предстательной железы; - материал для исследования собрать из наружного отверстия уретры.	в лабораторию
---	--	--	---------------

стекла покровные; изотонический раствор хлорида натрия стерильный ; контейнер для сбора мочи стерильный ; пробирки с транспортной средой; маркер по стеклу; спирт этиловый 96°.	Отделяемое влагалища	Подготовка к взятию образцов: Стерильным ватным тампоном очистить слизистую наружных половых органов, ввести гинекологическое зеркало. Взятие материала: инструментом для взятия материала собрать отделяемое заднего свода и стенок влагалища (после гистерэктомии материал берётся из боковых сводов влагалища). У девочек и женщин, не имевших в анамнезе половых контактов при отсутствии выделений инструмент для взятия материала осторожно вводится через гименальное отверстие во влагалище и материал берётся из заднего свода влагалища.	проведенную фиксацию препарата.	
--	-----------------------------	---	--	--

Культуральный (бактериологический)	Зонд универсальный; одноразовая бактериологическая петля (1мкл, 10 мкл); стерильный ватный/ дакроновый тампон; стерильный марлевый (ватный) тампон; ложка Фолькмана; зеркало вагинальное; контейнер для сбора мочи	Отделяемое уретры у мужчин	Подготовка к взятию проб: перед взятием уретрального материала пациент массирует уретру от основания пениса к его головке, область наружного отверстия уретры очистить с помощью стерильного марлевого тампона, крайнюю плоть отвести назад. Взятие материала: осторожно ввести инструмент для взятия материала в наружное отверстие мочеиспускательного канала (на глубину 4-6 см) и слегка нажимая на переднюю стенку уретры собрать материал. При наличии свободно стекающих выделений материал получают без предварительного массажа уретры. Сбор материала:	Материал поместить в маркированную пробирку транспортной средой или жидкой питательной средой (в случае возможности доставки пробы в лабораторию в течение 2 ч), направление поместить отдельно, транспортировать в лабораторию при температуре 25-37°C в течение 18-24 часов.	Материал для культурального исследования берется до начала этиологического лечения или не ранее 24-48 часов после приёма антипротозойных препаратов.
------------------------------------	--	----------------------------	---	--	--

	стерильный; пробирки с транспортной средой; маркер по стеклу; питательная среда.	Отделяемое влагалища	Подготовка к взятию образцов: Стерильным ватным тампоном очистить слизистую наружных половых органов, ввести гинекологическое зеркало. Взятие материала: инструментом для взятия материала собрать отделяемое заднего свода и стенок влагалища (после гистерэктомии материал берётся из боковых сводов влагалища). У девочек и женщин, не имевших в анамнезе половых контактов, при отсутствии выделений инструмент для взятия материала осторожно вводится через гименальное отверстие во влагалище и материал берётся из заднего свода влагалища.		
--	---	-------------------------	--	--	--

МАНК	Зонд универсальный для исследования на МАНК; стерильный марлевый (ватный) тампон; стерильный контейнер для мочи; вагинальное зеркало одноразовые пробирки с транспортной средой.	Отделяемое уретры у мужчин	Подготовка к взятию проб: перед взятием уретрального материала пациент массирует уретру от основания пениса к его головке, область наружного отверстия уретры очистить с помощью стерильного марлевого тампона, крайнюю плоть отвести назад. Взятие материала: осторожно ввести инструмент для взятия материала в наружное отверстие мочеиспускательного канала (на глубину 4-6 см) и слегка нажимая на переднюю стенку уретры собрать материал. При наличии свободно стекающих выделений материал получают без предварительного массажа уретры. Сбор материала: - получение материала рекомендуется проводить после мочеиспускания; - провести ректальный массаж предстательной железы; - материал для исследования собрать из наружного отверстия уретры.	Материал доставляется в предназначенных для этого пробирках с транспортной средой согласно инструкции производителя тест-систем. Пробы могут храниться при комнатной температуре (+18-22°C) в течение 6 часов; при 2-8°C – в течение 2 недель; при -20°C – 1 месяц, если иное не предусмотрено производителем тест-систем. Клинический материал, помещенный, в	Описана типовая процедура взятия, хранения и транспортировки материала. В случае расхождения с требованиями производителя тест-систем необходимо следовать инструкции производителя. Детям препубертатного возраста брать материал из уретры не рекомендуется
------	--	----------------------------	---	--	---

		Отделяемое влагалища	Подготовка к взятию образцов: Стерильным ватным тампоном очистить слизистую наружных половых органов, ввести гинекологическое зеркало. Взятие материала: инструментом для взятия материала собрать отделяемое заднего свода и стенок влагалища (после гистерэктомии материал берётся из боковых сводов влагалища). У девочек и женщин, не имевших в анамнезе половых контактов с пенетрацией, при отсутствии выделений инструмент для взятия материала осторожно вводится через гименальное отверстие во влагалище и материал берётся из заднего свода влагалища.	транспортную среду, транспортируется при температуре +18-22°C в течение 2 часов, свыше 2 часов при температуре + 2-8°C (в термоконтейнере, сумке-холодильнике). Моча должна быть доставлена в лабораторию в течение 3 часов без дополнительного	я. В этом случае берутся мазки из наружного отверстия мочеиспускательного канала или собирается моча. Допускается однократное размораживание образца.
--	--	----------------------	--	---	---

		Моча	Исследуется первая порция свободно выпущенной мочи после задержки мочеиспускания не менее 3 часов в объёме 10-20 мл, которая отбирается в стерильный маркированный контейнер.	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 № 487

Методика микроскопической диагностики трихомонадной инфекции:

1) Микроскопическое исследование нативного препарата

Название	Микроскопическое исследование нативного препарата
Принцип	Выявление воспалительных изменений в первичных образцах, поиск и обнаружение <i>Trichomonas vaginalis</i>
Материал для исследования	отделяемое из уретры; отделяемое заднего свода влагалища
Необходимое оборудование и материалы	1. Биноккулярный микроскоп с возможностью увеличения до $\times 1000$ с обычным или темнопольным конденсором; 2. пипетки пластиковые или дозатор полуавтоматический с наконечниками; 3. перчатки медицинские; 4. емкости для сбора и обработки стекол; 5. предметные стекла; 6. покровные стекла; 7. маркер
Реагенты	- изотонический раствор хлорида натрия стерильный; - антисептические и дезинфицирующие средства, разрешенные к применению.
Подготовка к проведению анализа	Приготовление препарата: На предметное стекло поместить каплю теплого (+18-22°C) изотонического раствора хлорида натрия стерильного; Поместить инструмент с исследуемым материалом на поверхность капли и перемешать содержимое; Взвесь накрыть покровным стеклом и

	микроскопировать при увеличении x100, x400 с опущенным конденсором или в темном поле зрения.
Учет и оценка результатов	При увеличении микроскопа x100 оценивают: - наличие и состояние клеток вагинального эпителия (эпителия уретры); - количество и морфологию лейкоцитов; - наличие и морфологию микрофлоры; - наличие <i>Trichomonas vaginalis</i>. При увеличении микроскопа x400 оценивают морфологию и движение <i>Trichomonas vaginalis</i>: размер <i>Trichomonas vaginalis</i> приблизительно равен размеру ядра эпителиальной клетки или сегментоядерного нейтрофила, форма грушевидная, овальная, реже - округлая, движения - толчкообразные, поступательные и вращательные за счет жгутиков и ундулирующей мембраны. Необходимо дифференцировать движение <i>Trichomonas vaginalis</i> от пассивного (броуновского) движения клеток во влажной среде. Критерием для лабораторного заключения о наличии <i>Trichomonas vaginalis</i> является обнаружение хотя бы одного организма с четко различимыми жгутиками. <i>Trichomonas vaginalis</i> может быть обнаружена при общеклиническом исследовании осадка мочи.
Заключение лабораторного исследования	1) подвижные организмы, сходные с <i>Trichomonas vaginalis</i> обнаружены; 2) подвижные организмы, сходные с <i>Trichomonas vaginalis</i> не обнаружены.
Контроль качества	На преаналитическом этапе оценивается: - взятие биологического материала в соответствии с требованиями, наличие материала в препарате, наличие в исследуемом материале клеток многослойного плоского эпителия; - выполнение требований хранения и доставки

	материала в лабораторию; наличие в препарате кристаллов свидетельствует о его подсыхании; - выполнение требований маркировки проб и соответствия маркировки пробы маркировке направления; Мероприятия аналитического этапа: - соблюдение технологии приготовления нативного препарата; - учет результатов с контрольным материалом в соответствии с официально признанными критериями. Мероприятия постаналитического этапа: - правильности внесения результатов в бланк исследования; - своевременное доведение информации до врача, назначившего исследование.
Источники ошибок	- нарушение техники взятия клинического материала; - использование холодного физиологического раствора; - нарушение условий транспортировки клинического материала в лабораторию (неоптимальная температура и высыхание образца); - неудовлетворительное техническое состояние микроскопа; - нарушение методики проведения микроскопического анализа; - недостаточная квалификация персонала.

2) Микроскопическое исследование окрашенного препарата

Название	Микроскопическое исследование окрашенного препарата
Принцип	Выявление воспалительных изменений в пробах, поиск и обнаружение <i>Trichomonas vaginalis</i>
Материал для исследования	отделяемое из уретры; отделяемое заднего свода влагалища
Необходимое оборудование и материалы	1. Бинокулярный микроскоп с возможностью увеличения до $\times 1000$; 2. пипетки пластиковые; 3. песочные часы на 1 и 3 минуты или таймер; 4. приспособление для окраски мазков; 5. перчатки медицинские; 6. емкости для сбора и обработки стекол; 7. предметные стекла; 8. стеклянный стакан; 9. фильтровальная бумага; 10. маркер.
Реагенты	1. Иммерсионное масло; 2. 1% водный раствор метиленового синего 3. 1% спиртовой раствор метиленового синего (по Леффлеру); 4. спирт этиловый 96°; 5. антисептические и дезинфицирующие растворы.
Подготовка к проведению анализа	Перед окрашиванием препараты фиксировать 96% этиловым спиртом (погружением на 1-2 мин), при окраске по Леффлеру предварительная фиксация не требуется. Зафиксированные препараты можно хранить при комнатной температуре в течение нескольких дней. Приготовление растворов красителей: - 1% водный раствор метиленового синего: растворить 1 г метиленового синего в 100 мл дистиллированной воды, фильтровать через бумажный фильтр;

	- метиленовый синий (по Леффлеру) 1% спиртовой раствор метиленового синего: растворить 1 г метиленового синего в 100 мл 96% этилового спирта
Проведение анализа:	Окраска мазков водным раствором метиленового синего: на фиксированный препарат нанести 1% водный раствор метиленового синего на 1 – 2 мин (в зависимости от толщины мазка). Тщательно смыть оставшийся краситель струей холодной воды. Препарат высушить на воздухе. Окраска мазков спиртовым раствором метиленового синего по Леффлеру: высушенный препарат опустить в стакан с 1% метиленовым синим по Леффлеру на 10-15 сек., промыть погружением в другой стакан с водопроводной водой, препарат высушить на воздухе.
Учет и оценка результатов	Оценка мазков, окрашенных водным и спиртовым раствором метиленового синего: - при микроскопии препарата видны: ядра клеток, окрашенные в синий цвет; цитоплазма, окрашенная в голубой цвет разной интенсивности; бактериальная микрофлора, окрашенная в синий цвет разной интенсивности; - <i>Trichomonas vaginalis</i> в препарате, окрашенном метиленовым синим, имеет различную форму - грушевидную, овальную или округлую, контуры клетки хорошо выражены, ядро, как правило, расположено эксцентрично, овальное или вытянутое, имеет вид «сливовой косточки» окрашено интенсивнее, чем «пенистая» цитоплазма.
Заключение лабораторного исследования	- организмы, сходные с <i>Trichomonas vaginalis</i> обнаружены; - организмы, сходные с <i>Trichomonas vaginalis</i> не обнаружены.
Контроль	На преаналитическом этапе оценивается:

качества	- 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. Мероприятия аналитического этапа: - соблюдение технологии окраски препарата. Проведение визуального анализа качества окрашивания препарата по Грамму включает оценку интенсивности окрашивания клеток, при этом ядра эпителиальных клеток и лейкоцитов окрашены в фиолетовый цвет, а цитоплазма – в розовый цвет. Каждая новая серия реактивов для окрашивания по Граму должна быть проверена на качество при помощи грамположительных и грамотрицательных штаммов бактерий; -учет результатов в соответствии с официально признанными критериями. Мероприятия постаналитического этапа: - правильности внесения результатов в бланк исследования; - своевременное доведение информации до врача, назначившего исследование.
Источники ошибок	-неудовлетворительное техническое состояние микроскопа; -нарушение правил получения биологического материала для исследования; - использование загрязненной лабораторной посуды, старых, поцарапанных стекол; - нарушение методики приготовления препарата -

	слишком толстый препарат; - нарушение методики окраски препаратов; - нарушение методики проведения микроскопического анализа;
Устранение ошибок	- поддержание микроскопа в надлежащем техническом состоянии; - следование данной инструкции; - при неправильной окраске надо повторить взятие материала и окраску мазка.

Методика культуральной диагностики трихомонадной инфекции.

Название	Культуральный (бактериологический) метод диагностики трихомонадной инфекции
Принцип	Выделение культуры <i>Trichomonas vaginalis</i> с использованием специальных питательных сред с последующей идентификацией по морфологическим признакам.
Биологический материал для исследования	отделяемое из уретры; отделяемое заднего свода влагалища; центрифугат первой порции мочи
Подготовка проб к исследованию	Дополнительная подготовка проб, полученных из уретры, цервикального канала, влагалища не проводится. Первичную пробу первой порции мочи центрифугировать при скорости вращения ротора 1000-1500 оборотов в минуту в течение 10 минут. Надосадочную жидкость удалить, осадок центрифугата подлежит дальнейшему исследованию.
Оборудование, инструменты и материалы	1. Термостат на $36 \pm 1^\circ\text{C}$; 2. анаэроостат или пакеты для создания анаэробных условий культивирования; 3. бактериологический анализатор; 4. спиртовка или газовая горелка; 5. световой микроскоп; 6. средства индивидуальной защиты персонала; 7. предметные стекла; 8. покровные стекла; 9. бактериологические петли; 10. пробирки или флаконы для среды; 11. маркер; 12. емкость для сбора отходов.

Реагенты	Транспортные и питательные среды или коммерческие наборы для выделения и идентификации <i>Trichomonas vaginalis</i>, зарегистрированные в установленном порядке на территории страны. Вазелиновое масло Красители для микроскопического исследования окрашенных препаратов (1% водный или спиртовый раствор метиленового синего)
Подготовка к проведению анализа	Культивирование <i>Trichomonas vaginalis</i> следует проводить во флаконах или пробирках с количеством среды не менее 5 мл. Возможно использование коммерческих тест-систем, не требующих специальной подготовки. Хранение и приготовление сред осуществляют в соответствии с инструкцией производителя.
Процедура анализа	Пробу биологического материала засевают с помощью бактериологической петли в питательную среду. При использовании транспортных сред посев проводится тампоном, извлеченным из флакона (пробирки) с транспортной средой. Поверхность среды заливают стерильным вазелиновым маслом или используют другой способ для создания анаэробных условий (анаэроостат, тест-пакеты и др.). Пробирки с посевами инкубируют при +37°C. Просмотр посевов производят через 24 часа и далее ежедневно. При использовании коммерческих культуральных систем руководствуются инструкцией производителя.
Учет и оценка результатов	Оценка вида колоний. <i>Trichomonas vaginalis</i> при культивировании в жидкой питательной среде дает придонный рост в виде плотного или рыхлого беловатого осадка, напоминающего «облачко». При отсутствии роста посевы инкубируют до 7 суток, прежде чем окончательно выдать отрицательный результат. В случае сильного загрязнения посева может потребоваться повторный пассаж (пересев) на

	питательную среду для снижения контаминации После каждого просмотра культуры необходимо производить ее микроскопическое исследование. Приготовление мазка из культуры и его исследование и учет результатов производится в соответствии с требованиями данной инструкции по микроскопическому исследованию. Форма лабораторного заключения культурального (бактериологического) исследования: - <i>Trichomonas vaginalis</i> выделена; - <i>Trichomonas vaginalis</i> не выделена.
Контроль качества	На преаналитическом этапе оценивается: - 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 качества транспортных и питательных сред (стерильность, ростовые свойства, способность подавлять рост контаминирующей флоры, сроки и условия хранения); - проверка среды на стерильность осуществляется путем инкубации образца среды в термостате при +37°C в течение 48 часов; - контроль ростовых свойств проводится путем посева референс-штамма <i>Trichomonas vaginalis</i>; - контроль среды на способность подавлять рост контаминирующей флора проводится путем посева референс-штаммов <i>E. coli</i>, <i>St. epidermidis</i>, <i>N. sicca</i>, <i>C. albicans</i>. - контроль качества реагентов (внешнее состояние, срок годности), условия и сроки хранения ; - качество лабораторной посуды; - своевременность проведения метрологической

	поверки средств измерения, используемых в лаборатории Мероприятия аналитического этапа: - выполнение методики в соответствии с настоящей инструкцией или инструкцией производителя тест-систем; - соблюдение технологии окраски в соответствии с инструкцией; - учет результатов в соответствии с официально признанными критериями. Мероприятия постаналитического этапа: - правильности внесения результатов в бланк исследования; - своевременное доведение информации до врача, назначившего исследование.
Источники ошибок и пути их устранения	Нарушение сроков и температурного режима при доставке материала. Использование некачественных сред и реактивов. Неудовлетворительное состояние оборудования. Средства измерения, используемые для проведения исследования должны иметь сертификат о государственной поверке. Нарушение методики посева и кратности просмотра. Проведение исследования должно выполняться в соответствии с требованиями настоящей инструкции и производителя тест-систем.
Противопоказания для применения метода	Данный метод для широкого использования не рекомендуется, предлагается для использования в научных целях и судебной практике

Приложение № 5
к приказу Министерства
здравоохранения
Республики Беларусь
20.05.2009 № 487

Методика молекулярно-биологической диагностики трихомонадной инфекции

Название	Молекулярно-биологический метод диагностики хламидийной инфекции (ПЦР)
Принцип	Диагностика <i>Trichomonas vaginalis</i> посредством обнаружения в образцах первичных проб нуклеиновых кислот возбудителя. 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.
Биологический материал для исследования	- соскоб эпителиальных клеток из уретры; - отделяемое из заднего свода влагалища; - моча.
Подготовка проб к исследованию	В случае хранения проб в морозильной камере, пробирки с образцами первичных проб следует выдержать при комнатной температуре до их полного оттаивания. Не допускается повторное замораживание-оттаивание проб.
Оборудование, инструменты и материалы	1. ПЦР- боксы для проведения ПЦР-исследований (не менее 2 шт.); 2. холодильники на 2-8 °С с морозильной камерой (не менее 3 шт.); 3. твердотельные термостаты для микропробирок (не менее 2 шт.); 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. цилиндры; 22. стеклянные палочки; 23. штативы для микропробирок; 24. штативы для автоматических дозаторов; 25. емкости для дезинфекции; 26. дезинфицирующие средства; 27. бактерицидные облучатели; 28. контейнеры для транспортировки образцов первичных проб; 29. средства индивидуальной защиты
Реагенты	- набор реагентов, зарегистрированных в МЗ РБ, для выделения нуклеиновых кислот из проб первичных образцов; - набор реагентов, зарегистрированных в МЗ РБ, для проведения амплификации нуклеиновых кислот с

	детекцией методом гель-электрофореза; - набор реагентов, зарегистрированных в МЗ РБ, для проведения амплификации нуклеиновых кислот с детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени; - набор реагентов, зарегистрированных в МЗ РБ, для детекции продуктов амплификации методом гель-электрофореза; - дистиллированная вода; - 70% этиловый спирт.
Подготовка к проведению анализа	Все работы проводятся с использованием одноразовых расходных материалов, спецодежда меняется при переходе из одного помещения (зоны) в другое.
Процедура анализа	Процедура включает в себя следующие этапы: - пробоподготовка (выделение нуклеиновых кислот и удаление ингибиторов ПЦР) из образцов первичных проб или чистой культуры микроорганизма; - проведение амплификации; - детекция и учет продуктов амплификации. Технология проведения этапов анализа описана в соответствующих инструкциях и рекомендациях Производителей тест-систем. 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.
Учет и оценка результатов	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.
Заключение лабораторного исследования	Нуклеиновая кислота, специфичная для <i>Trichomonas vaginalis</i>, обнаружена. Нуклеиновая кислота, специфичная для <i>Trichomonas vaginalis</i>, не обнаружена.
Контроль качества	На преаналитическом этапе оценивается: - 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. 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 специфической нуклеиновой кислоты или клеток возбудителя вследствие контаминации, и для исключения получения ложноположительных результатов. 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. 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. Для обеспечения внешнего контроля качества проводимых исследований используются референс-панели, разрешенные к применению на территории РБ. Мероприятия постаналитического этапа: - правильность внесения результатов в бланк исследования и формулировка лабораторного заключения; - своевременное доведение информации до врача, назначившего исследование.
11. Перечень возможных ошибок при выполнении и пути их устранения	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 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. 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. 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. При проведении детекции в режиме реального времени значение порового цикла в пробе выше параметра указанного Производителем тест-системы. Следует повторить анализ пробы, начиная с этапа пробоподготовки.
--	---