

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

«УТВЕРЖДАЮ»

Первый заместитель Министра

Д.Л. Пиневич

2015 г.

Регистрационный № 070-0714



**МЕТОД ДИАГНОСТИКИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ПРИ
ЭКТОПИИ ШЕЙКИ МАТКИ**
Инструкция по применению

Учреждение - разработчик:

Учреждение образования «Витебский государственный ордена Дружбы
народов медицинский университет»

Авторы: д.м.н., доцент Семенов Д.М., д.м.н. профессор Семенов В.М.,
Огризко И.Н., Веремей И.С.

Витебск, 2015

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

_____ Д. Л. Пиневиц
07.05.2015

Регистрационный № 070-0714

**МЕТОД ДИАГНОСТИКИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ПРИ
ЭКТОПИИ ШЕЙКИ МАТКИ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: УО «Витебский государственный ордена
Дружбы народов медицинский университет»

АВТОРЫ: д-р мед. наук, доц. Д. М. Семенов, д-р мед. наук, проф. В. М. Семенов,
И. Н. Огрязко, И. С. Веремей

Витебск 2015

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен метод диагностики бактериальных осложнений при эктопии шейки матки, основанный на определении D-лактата в биологическом материале, полученном из влагалищной части шейки матки и сводов влагалища.

Инструкция предназначена для врачей-акушеров-гинекологов, врачей клинической лабораторной диагностики, иных врачей-специалистов, оказывающих медицинскую помощь женщинам, страдающим воспалительными заболеваниями нижнего отдела половых органов.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

1. Фотометр планшетного типа с набором фильтров 300–600 нм.
2. Тест-система D-ЛАКТАМ.
3. Гинекологическое зеркало.
4. Шпатель Эйра.
5. Пробирки пластиковые типа «эппендорф».
6. Стерильные перчатки.
7. Холодильная установка.
8. Термостат (37 ± 1 °С).
9. Центрифуга.
10. Дозаторы пипеточные переменного объема 1,0–100 и 100–1000 мкл.
11. Весы лабораторные электронные с дискретностью взвешивания 0,01 г.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Воспалительные заболевания влагалища и шейки матки.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Метод основан на ферментативной конверсии D-лактата в пируват с последующим образованием интенсивно окрашенного хромогена, имеющего максимум поглощения в области (фильтр 570–600 нм).

Забор исследуемого материала

При инструментальном осмотре в зеркалах женщин на гинекологическом кресле производится забор влагалищного субстрата шпателем Эйра с влагалищной части шейки матки и заднего свода влагалища, который помещают в предварительно взвешенные пластиковые пробирки типа «эппендорф».

Пробирки взвешивают повторно, по разнице определяют массу биологического материала и замораживают.

Приготовление рабочих растворов

Приготовление стандартного раствора лития D-лактата (Стандарт) — Флакон 1 осторожно вскрыть, внести 1000 мкл воды очищенной и перемешать до полного растворения. Данный раствор допускается хранить в морозильной камере при -18 °С в течение 3 мес. Приготовление буферного раствора — во Флакон 2 добавить 2,30 мл воды очищенной, интенсивно перемешать до полного растворения. Приготовление рабочего раствора ферментного микста — во Флакон 3 поместить:

810,0 мкл воды очищенной для формата на 8 определений или
 630 мкл воды очищенной для формата на 4 определения или
 495 мкл воды очищенной для формата на 1 определение, осторожно перемешать до растворения субстрата-хромогена. Данный раствор допускается хранить в морозильной камере при $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 3 мес.

Приготовление рабочего раствора субстратного микста — во Флакон 4 поместить:

2,24 мл буферной смеси для формата на 8 определений или
 1,60 мл для формата на 4 определения или
 1,12 мл для формата на 1 определение.

Данный раствор допускается хранить в морозильной камере при $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 3 мес.

Ход определения

Пробоподготовка — в пробирки с биологическим материалом внести по 1,00 мл дистиллированной воды, встряхнуть на вортексе в течение 1–2 мин и центрифугировать при 1000–2000 g 10 мин. Надосадочную жидкость использовать в дальнейших исследованиях. Для приготовления градуировочного графика в лунки иммунологического планшета внести 0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5; 15,0; 17,5 мкл Стандарта и довести водой очищенной до 25 мкл. Для приготовления опытных образцов и контролей мутности в лунки иммунологического планшета внести 25 мкл биологического субстрата. В калибровочные и опытные образцы внести по 45 мкл ферментного микста. В контрольные образцы внести по 45 мкл воды очищенной. Во все исследуемые образцы добавить 80 мкл субстратного микста. Инкубировать в термостате ($37^{\circ}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$) в течение 30 мин. Измерить оптическую плотность на планшетном ридере (светофильтр 570–600 нм против воздуха).

Наименование образца	Биологический субстрат (мкл)	Стандарт (мкл)	Вода дистиллированная (мкл)	Ферментный микст (мкл)	Субстратный микст (мкл)
Испытуемый образец (О)	25	-	-	45	80
Контроль мутности (К)	25	-	45	-	80
Калибровочный образец	-	2,5 – (шаг 2,5) – 17,5	17,5 – (шаг 2,5) – 2,5	45	80

Учет результатов

От значения оптической плотности каждой калибровочной ячейки отнять оптическую плотность реagentного бланка (нулевого калибратора — $(A_i - A_0)$, соответственно разность для реagentного бланка будет равняться нулю.

Построить калибровочную зависимость полученной разности от концентрации D-лактата в диапазоне 0; 0,3; 0,6; 0,9; 1,2; 1,5; 1,8; 2,1; mM, откладывая по оси абсцисс концентрацию, а по оси ординат — $(A_i - A_0)$.

От оптической плотности каждого опытного образца отнять разницу оптической плотности контроля мутности и пустой ячейки $\delta A = A_0 - (A_k - A_{\text{п.я}})$.

Для каждого образца рассчитать концентрацию по калибровочному графику с учетом коэффициентов уравнения линейной регрессии, массы образца и фактора разведения. Например, если уравнение линейной регрессии имеет вид:

$$\delta A = aC + b, \text{ следовательно, } C = (\delta A - b) / a.$$

где С — концентрация D-лактата (ммоль/л);
а — наклон регрессионной прямой;
b — отрезок регрессионной прямой.

Далее для каждого образца рассчитать концентрацию с учетом массы образца и фактора разведения С (ммоль/г).

Оценка результатов

Концентрация D-лактата более или равная 19,59 ммоль/(л*г) со 100 % вероятностью свидетельствует о нормальном состоянии микробиоценоза влагалища и отсутствии явлений воспаления.

Концентрация D-лактата во влагалищном субстрате на уровне 16,4 ммоль/(л*г) и менее обладает 100 % специфичностью, что следует расценивать как нарушение микробиоценоза влагалища с развитием дисбиоза и/или воспаления. Снижение концентрации D-лактата 16,4 ммоль/(л*г) и ниже является показанием для противовоспалительной терапии, отсутствие восстановления уровня D-лактата до уровня нормальных значений в течение 2 сут после лечения свидетельствует о недостаточном эффекте терапии, отсутствии восстановления микробиоценоза влагалища или рецидиве воспалительного процесса.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Несвоевременная заморозка биологического материала для исследования может привести к ложному результату.