

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель Министра

_____ Р.А. Часнойть
18 сентября 2007 г.
Регистрационный № 168-1206

МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ХЛАМИДИОЗА: ТРЕБОВАНИЯ ПО КАЧЕСТВУ И ОШИБКИ ДИАГНОСТИКИ

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования», УО «Гродненский государственный медицинский университет»

АВТОРЫ: д-р мед. наук, проф. В.М. Цыркунов, канд. мед. наук С.А. Костюк, канд. мед. наук Д.Ф. Хворик

Минск 2007

Инструкция имеет целью повышение качества лабораторной диагностики хламидийной и других урогенитальных инфекций, верифицированных методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), улучшение диагностической точности и специфичности метода ПЦР, исключение ошибок методического порядка на всех этапах выполнения метода посредством введения оценки дополнительных лабораторно-диагностических показателей (число пар нуклеотидов, интенсивность свечения, молекулярная масса фрагмента ДНК и концентрации ДНК).

Применение данного метода будет полезным для специалистов фундаментального и прикладного профиля: врачей лабораторной диагностики, иммунологов, дерматовенерологов, инфекционистов, других смежных специалистов, а также студентов всех факультетов медицинских вузов, изучающих вопросы молекулярно-биологической диагностики.

Рекомендуется для использования в лечебно-профилактических учреждениях стационарного и амбулаторно-поликлинического типа: венерических, инфекционных, урологических и других смежных отделениях городских, областных и республиканских стационаров (диспансеров), консультативных диагностических центрах, в которых метод ПЦР имеет активную сферу применения.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, ПРЕПАРАТОВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

1. Стерильные одноразовые гинекологические зонды или цитощетки.
2. Стерильный одноразовый гинекологический набор, куда входят салфетка, перчатки, зеркало Куско.
3. Пинцет.
4. Стерильные марлевые тампоны.
5. Морозильная камера, в которой поддерживается температура не ниже -20° .
6. Специальные термоконтейнеры, термосы для хранения и транспортировки пробирок с биологическим материалом.
7. Твердофазный термостат для пробирок типа «Eppendorf» $25-100^{\circ}\text{C}$.
8. Микроцентрифуги-вортексы (5000-12000 об/мин).
9. Центрифуга/вортекс (1500-3000 об/мин).
10. Вакуумный отсасыватель с колбой-ловушкой.
11. Отдельный набор автоматических пипеток переменного объема.
12. Отдельный халат и одноразовые резиновые перчатки.
13. Одноразовые полипропиленовые микроцентрифужные пробирки с плотно закрывающимися крышками объемом 1,5 и 0,5 мл.
14. Штативы для микропробирок и наконечников.
15. Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема до 200 и 1000 мкл.
16. Одноразовые наконечники с аэрозольным барьером до 200 и 1000 мкл.
17. Холодильники с рабочей температурой $+2-8^{\circ}\text{C}$ с морозильной

камерой.

18. Емкости с дезинфицирующим раствором.
19. Амплификатор (программируемый микротермостат).
20. Амплификатор для количественного ПЦР-анализа.
21. УФ-трансиллюминатор.
22. Видеокамера для регистрации гелей с программным обеспечением.
23. Камера для горизонтального электрофореза с источником питания.
24. СВЧ-печь.
25. Специализированные ПЦР-боксы с бактерицидной лампой.
26. Комплект реагентов на проведение 100 реакций по выделению ДНК.
27. Комплект реагентов на проведение 100 реакций амплификации ДНК *Chlamydia trachomatis* с качественной детекцией.
28. Комплект реагентов для проведения 100 реакций амплификации ДНК *Chlamydia trachomatis* с количественной детекцией.
29. Комплект реагентов для проведения электрофоретического разделения продуктов амплификации.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

1. Воспалительные заболевания половых путей:
 - 1.1. У женщин: уретрит, кольпит, цервицит, эндометрит, сальпингит, оофорит, бартолинит, гнойные тубоовариальные образования, пельвиоперитонит, посткоитальные или межменструальные кровянистые выделения из половых путей, дизурия и другие признаки воспалительного заболевания органов малого таза.
 - 1.2. У мужчин: клинические и лабораторные признаки уретрита, эпидидимита или простатита, парауретрит, кольцевидный баланит и баланопостит, деферентит, фуникулит, куперит.
2. Осложнения, которые могут быть вызваны возбудителями ИППП (воспалительные заболевания малого таза, реактивный артрит, хронические боли в области малого таза, трубное бесплодие, орхоэпидидимит).
3. Скрининг женщин, которым ранее проводилось лечение влагиалищной части шейки матки (консервативное, тот или иной вид коагуляции, хирургическое лечение) без предварительного углубленного обследования.
4. Скрининг женщин с сексуальным ранним дебютом (до 17 лет).
5. Скрининг лиц, ведущих половую жизнь с частой сменой половых партнеров (3 и более половых партнера в течение последнего года, более 6 половых партнеров на протяжении жизни).
6. Скрининг лиц, у которых в анамнезе есть сведения о перенесенных ИППП и ранее проведенном лечении без предварительного углубленного обследования.
7. Исключение инфекции перед медицинским вмешательством: прерывание беременности, искусственное оплодотворение, введение внутриматочных контрацептивов.

8. Самопроизвольные и искусственные аборты.
9. Удаление внутриматочных контрацептивов.
10. Другие внутриматочные вмешательства.
11. Хронический цистит.
12. Реактивный артрит неясной этиологии.
13. Беременные с отягощенным акушерским анамнезом: невынашивание и недонашивание беременности, инфекционные осложнения предыдущей беременности, родов и послеродового периода.
14. Беременные с отягощенным гинекологическим анамнезом: кольпит, цервицит, сальпингоофорит, бартолинит, эндометрит, кандилломатоз.
15. Беременные с хроническими инфекционными процессами мочевыводящей системы: цистит, пиелонефрит, мочекаменная болезнь.
16. Беременные, у которых течение беременности осложнилось кольпитом, циститом, пиелонефритом, кандилломатозом, угрозой прерывания, истмико-цервикальной недостаточностью, хориоамнионитом, преждевременным излитием околоплодных вод.
17. Пациенты, у которых обнаружен антиген *Chlamydia trachomatis* методом прямой иммунофлюоресценции (ПИФ) и/или иммуноферментным анализом (ИФА), иммуноглобулины классов М, А, G методом ИФА.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Абсолютных и относительных противопоказаний к применению метода не выявлено.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

I. Преаналитический этап

1. Взятие биологического материала для исследования

Материал	Правила забора
Соскоб эпителиальных клеток из уrogenитального тракта женщин	<p>Соскобы произвести из трех различных точек: цервикальный канал, уретра, заднебоковой свод влагалища. При необходимости материал для исследования взять из эрозивно-язвенных поражений. Забор материала произвести отдельными одноразовыми, стерильными зондами или цитощетками.</p> <p><i>Цервикальный канал.</i> Во влагалище вводят зеркало Куско, фиксируют. Тампоном необходимо удалить слизь с поверхности шейки матки, ввести зонд (цитощетка) в цервикальный канал на 1-1,5 см и вращать в течение 3-5 с. Извлекают зонд (цитощетка), избегая касания стенок влагалища, и помещают в стерильную одноразовую пробирку с транспортной средой. Погрузив рабочую часть зонда (цитощетки) в транспортную среду, вращают в течение 10-15 с, избегая разбрызгивания раствора. Вынуть зонд (цитощетка) из раствора, прижимая к стенке</p>

<p>Соскоб эпителиальных клеток из уретры мужчин</p> <p>Секрет предстательной железы</p>	<p>пробирки и, отжав избыток жидкости, удалить и закрыть пробирку.</p> <p><i>Заднебоковой свод влагалища.</i> В случае избытка слизи и обильных выделений удалить их стерильным ватным тампоном. Проводить зондом (цитощеткой) по поверхности слизистой оболочки в области заднебокового свода влагалища и эктоцервикса и перенести в пробирку с транспортной средой. Погрузив рабочую часть зонда (цитощетки) в транспортную среду, вращать в течение 10-15 с, избегая разбрызгивания раствора. Вынуть зонд (цитощетку) из раствора, прижимая к стенке пробирки и, отжав избыток жидкости, удалить и закрыть пробирку.</p> <p><i>Уретра.</i> Перед забором соскоба из уретры необходимо обработать ее наружное отверстие тампоном, смоченным стерильным физиологическим раствором. Произвести массаж уретры пальцем со стороны влагалища, прижимая ее к лобковой кости. Ввести зонд (цитощетку) в уретру на глубину 1-1,5 см и аккуратно, не поранив слизистую оболочку, несколькими вращательными движениями произвести соскоб эпителиальных клеток и перенести в пробирку с транспортной средой. Погрузив рабочую часть зонда (цитощетки) в транспортную среду, вращать в течение 10-15 с, избегая разбрызгивания раствора. Вынуть зонд (цитощетку) из раствора, прижимая к стенке пробирки и, отжав избыток жидкости, удалить и закрыть пробирку.</p> <p>Перед забором соскоба из уретры необходимо 4 ч не мочиться. Обработать головку полового члена в области наружного отверстия уретры тампоном, смоченным стерильным физиологическим раствором. Произвести массаж уретры. При наличии свободно стекающих из уретры выделений удалить их сухим тампоном. Ввести зонд (цитощетку) в уретру на глубину 3-4 см. Несколько вращательными движениями произвести соскоб эпителиальных клеток и перенести зонд (цитощетку) в пробирку с транспортной средой. Погрузив рабочую часть зонда (цитощетки) в транспортную среду, вращать в течение 10-15 с, избегая разбрызгивания раствора. Вынуть зонд (цитощетку) из раствора, прижимая к стенке пробирки и, отжав избыток жидкости, удалить и закрыть пробирку.</p> <p>1. После окончания массажа предстательной железы ее секрет в количестве 0,5-1 мл собрать в одноразовую</p>
---	--

Сперма	<p>стерильную пробирку объемом 1,5 мл.</p> <p>2. При невозможности получить секрет сразу после массажа собрать первую порцию мочи (в которой содержится секрет предстательной железы) в количестве 10 мл (см. правила забора мочи).</p> <p>Забор спермы осуществлять в стерильные одноразовые флаконы или пробирки.</p>
Моча	<p>Для анализа отобрать первую порцию утренней мочи в количестве не меньше 20–40 мл в специальный сухой стерильный флакон или сухую стерильную пробирку.</p>
Мазки с конъюнктивы	<p>Забор мазка осуществить сухими стерильными ватными тампонами под местной анестезией (2 капли раствора дикаина или инокаина). Оттянув нижнее веко, вращающими движениями провести зонд 4-5 раз по конъюнктиве, захватывая внешний и внутренний углы глаза. После забора материала тампон (рабочую часть зонда с ватным тампоном) поместить в стерильную одноразовую пробирку с транспортной средой. Погрузив рабочую часть зонда в транспортную среду, вращать зонд в течение 10-15 с, избегая разбрызгивания раствора. Извлечь зонд из раствора, прижимая его к стенке пробирки и, отжав избыток жидкости, удалить зонд и закрыть пробирку.</p>
Мазки с поверхности ротоглотки	<p>Мазки взять сухими стерильными ватными тампонами вращательными движениями с поверхности миндалин, небных дужек и задней стенки ротоглотки. После забора материала тампон (рабочую часть зонда с ватным тампоном) поместить в стерильную одноразовую пробирку с транспортной средой. Погрузив рабочую часть зонда в транспортную среду, вращать зонд в течение 10-15 с, избегая разбрызгивания раствора. Вынуть зонд из раствора, прижимая его к стенке пробирки и, отжав избыток жидкости, удалить зонд и закрыть пробирку.</p>

Примечание – Накануне проведения забора материала местные лечебные мероприятия отменяют.

2. Хранение и доставка биологического материала

Пробирки с биологическим материалом должны быть доставлены в течение 2 ч в ПЦР-лабораторию. Полученные пробы (соскобы эпителиальных клеток) могут храниться при температуре 2-8°C в течение 2-х

дней. При необходимости более длительного хранения соскобы замораживают при -20°C и хранят в течение 1 недели. Если необходимо хранить пробы еще более длительный срок, их замораживают при температуре -70°C . Замораживание образцов с ликвором, спермой, мочой и венозной кровью не допускается. Не допускается также повторное замораживание-оттаивание биологического материала.

Транспортировка клинического материала должна осуществляться в специальных термоконтейнерах с охлаждающими элементами или термосах со льдом в течение 1 суток. Каждый образец, для исключения взаимной контаминации, хранят и транспортируют в отдельном полиэтиленовом пакете.

II. Аналитический этап

1. Выделение ДНК из биологического материала, амплификация ДНК *Chlamydia trachomatis*, электрофоретическое разделение продуктов амплификации проводят с использованием комплекта реагентов в соответствии с инструкцией производителя на имеющемся в диагностической лаборатории оборудовании для проведения полимеразной цепной реакции.

2. Для проведения количественного ПЦР-исследования по оценке относительной концентрации ДНК *Chlamydia trachomatis* следует провести амплификацию 2-кратного титрования ДНК-стандарта криптической плазмиды *Chlamydia trachomatis* в диапазоне от $1,5 \times 10^4$ до 500 копий/мл для построения стандартной кривой. Каждую из ДНК-концентраций проамплифицировать в дублях. Также проамплифицировать два контрольных отрицательных образца, реактив которых состоит из сложной ДНК амплификационной смеси, где мишень ДНК-стандарта заменяется водой. Корреляция между значением цикла, при котором пороговая линия и кривая амплификации пересекаются, и \log_{10} концентрации копий ДНК криптической плазмиды *Chlamydia trachomatis* в мл должна составлять не менее 0,9.

III. Постаналитический этап

1. Идентификацию результатов электрофоретического разделения ДНК *Chlamydia trachomatis* осуществлять по следующим критериям:

- выявление в исследуемых биологических пробах специфического ПЦР-продукта *Chlamydia trachomatis*;
- соответствие размера ДНК-продукта в клиническом образце размеру ДНК-продукта *Chlamydia trachomatis* контрольной пробы;
- соответствие молекулярной массы ДНК-продукта в клиническом образце размеру ДНК-продукта *Chlamydia trachomatis* контрольной пробы;
- соответствие интенсивности свечения ДНК-продукта в клиническом образце размеру ДНК-продукта *Chlamydia trachomatis* контрольной пробы.

При анализе биологические пробы считать положительными на наличие ДНК *Chlamydia trachomatis*, если молекулярные характеристики

ДНК-продукта в клиническом образце соответствуют молекулярным характеристикам ДНК-продукта *Chlamydia trachomatis* контрольной пробы.

Результаты анализа биологического материала от пациентов считать отрицательными, если в пробе, содержащей клинический образец, специфических ДНК-продуктов не обнаружено или они выявлены, но их молекулярные характеристики не соответствуют таковым фрагментам молекулы контрольной ДНК *Chlamydia trachomatis*.

2. Идентификацию результатов качественного исследования ДНК *Chlamydia trachomatis* методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени следует осуществлять следующим образом:

- образец считать положительным, если по каналу детекции специфического фрагмента ДНК *Chlamydia trachomatis* для него определяется значение порогового цикла, не превышающее пороговый уровень (см. инструкцию производителя);

- образец считать отрицательным, если по каналу детекции специфического фрагмента ДНК *Chlamydia trachomatis* для него не определяется значение порогового цикла (кривая флуоресценции не пересекает пороговую линию), по каналу детекции фрагмента ДНК внутреннего контроля для него определяется значение порогового цикла, не превышающее пороговый уровень (см. инструкцию производителя).

- образцы, для которых отсутствует значение порогового цикла как по каналу детекции специфического фрагмента ДНК *Chlamydia trachomatis*, так и по каналу фрагмента ДНК внутреннего контроля, или получено значение порогового цикла более указанного производителем, требуют повторного выполнения ПЦР и детекции. Если повторно получается аналогичный результат, требуется повторить анализ образца, начиная с этапа выделения. Повторение этапа возможно не более двух раз.

3. Идентификацию результатов количественного ПЦР-исследования по оценке относительной концентрации ДНК *Chlamydia trachomatis* осуществляют следующим образом:

3.1. Построить стандартную кривую корреляции между значениями порогового цикла (СТ) и \log_{10} концентрации копий ДНК-стандарта криптоической плазмиды *Chlamydia trachomatis* (рисунок).

3.2. Вычислить значения относительной концентрации ДНК *Chlamydia trachomatis* в исследуемых биологических образцах по формуле: концентрация = $10^{(-0,297 \times \text{СТ} + 13,819)}$.

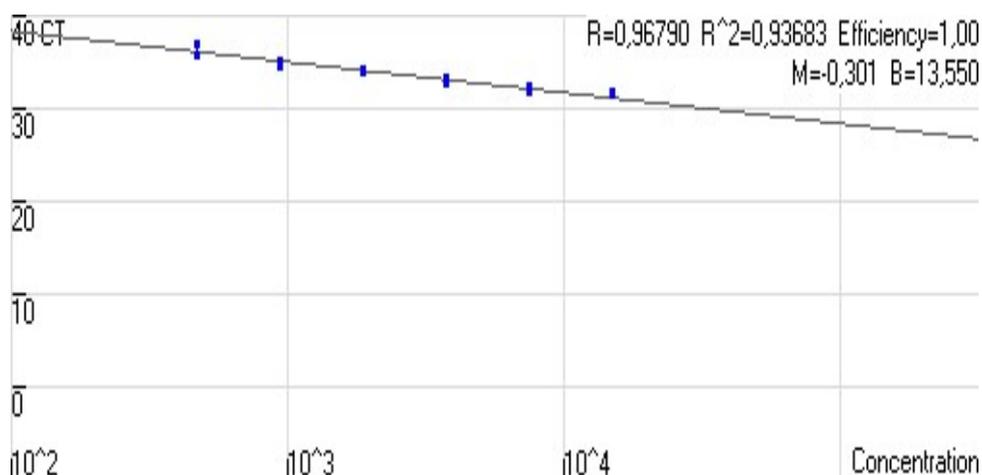


Рисунок – Стандартная кривая корреляции между СТ и log10 концентрации копий ДНК-стандарта крипточеской плазмиды *Chlamydia trachomatis*

3.3. Диагностически значимой относительной концентрацией ДНК крипточеской плазмиды *Chlamydia trachomatis* следует считать интервал от $1,5 \times 10^4$ до 469 копий/мл, которая является основанием для установления этиологического фактора развития инфекционного процесса урогенитального тракта и назначения адекватного этиотропного лечения.

3.4. При относительной концентрации ДНК крипточеской плазмиды *Chlamydia trachomatis* 100-468 копий/мл и сомнительных результатах ИФА и ПИФ следует провести культуральные исследования для подтверждения/опровержения хламидиоза. В случае подтверждения диагноза следует начать этиотропную терапию, в случае опровержения рекомендуется динамическое наблюдение у гинеколога, уролога, дерматовенеролога с последующим проведением исследований через 3 месяца.

3.5. Выявление ДНК крипточеской плазмиды *Chlamydia trachomatis* в высоких относительных концентрациях в $1,51 \times 10^4$ - $4,7 \times 10^7$ копий/мл независимо от результатов ИФА и ПИФ требует незамедлительного назначения этиотропной и иммунокорректирующей терапии.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

1. Попадание крови и большого количества слизи, выделений в пробирку с биологическим материалом. Для устранения необходимо стерильным марлевым тампоном с влажной поверхностью шейки матки и уретры снять слизь и влажные выделения. При взятии биологического материала нельзя прилагать физические усилия.

2. Несоблюдение стерильных условий на преаналитическом этапе. Манипуляция взятия биологического материала должна проводиться в стерильных перчатках, стерильным тампоном.

3. Использование многоразового медицинского инструментария. Забор материала произвести отдельными одноразовыми, стерильными зондами.

4. Неправильный выбор места и вида биологического материала для исследования неадекватно очагу поражения.

5. Несоблюдение условий транспортировки пробирок с биологическим материалом, без контейнеров или термосов с охлаждающими элементами. Транспортировка проб должна осуществляться в термосах со льдом или термоконтейнерах с охлаждающими элементами. Каждый образец, для исключения взаимной контаминации, хранят и транспортируют в отдельном полиэтиленовом пакете.

6. Нарушение сроков хранения пробирок с биологическим материалом. Пробирки с биологическим материалом должны быть доставлены в течение 2 ч в ПЦР-лабораторию. Полученные пробы (соскобы эпителиальных клеток) могут храниться при температуре 2-8°C в течение 2 дней. При необходимости более длительного хранения соскобы замораживают при -20°C и хранят в течение 1 недели. Если необходимо хранить пробы еще более длительный срок, их замораживают при температуре -70°C. Замораживание образцов с ликвором, спермой, мочой и венозной кровью не допускается.

7. Несоблюдение технологии удаления супернатанта – захват осадка, содержащего ДНК на аналитическом этапе выделения ДНК.

8. Несоблюдение последовательности раскапывания опытных и контрольных пробирок. Вначале следует раскапать отрицательный контрольный образец, затем исследуемые пробы, в конце положительный контрольный образец.

9. Несоблюдение технологии использования отработанных наконечников и пробирок. Обязательно менять наконечники при переходе от пробы к пробе, желательно использовать наконечники с фильтром – аэрозольным барьером для предотвращения попадания микрокапель раствора в пипетку. Использованные пробирки и наконечники должны сбрасываться в специальные контейнеры или емкости, содержащие дезинфицирующий раствор (1 н соляная кислота, 10%-й гипохлорит натрия или 10%-я хлорная известь).

10. Отсутствие положительного сигнала в пробе с положительным контролем выделения ДНК может свидетельствовать о неэффективном выделении ДНК. В таком случае необходимо провести ПЦР еще раз, и при вторичном отсутствии положительного сигнала в пробе с положительным контролем выделения ДНК следует повторно выделить ДНК и выполнить ПЦР.

11. Отсутствие положительного сигнала в пробе с положительным контролем ПЦР (К+) может свидетельствовать о неправильно выбранной программе амплификации, неверно приготовленной верхней ПЦР-смеси, а также других ошибках, допущенных на этапе постановки ПЦР. В этом случае необходимо провести ПЦР еще раз.

12. Использование трансиллюминатора со слабыми флюоресцентными лампами. Лампы необходимо менять 1 раз в 3 года при их использовании 5 ч в неделю.

13. Неправильное формирование карманов на планшетке с агарозным гелем, когда происходит совмещение близрасположенных карманов и подтекание амплификата.

14. Неправильное размещение планшетки в камере для электрофореза. Планшетку необходимо располагать от катода к аноду, т. е. от «-» или черного электрода к «+» или к красному электроду.

15. Появление любого значения порогового цикла в таблице результатов для отрицательного контрольного образца свидетельствует о наличии контаминации реактивов или проб. В этом случае результаты анализа по всем пробам считаются недействительными. Требуется повторить анализ проб, а также предпринять меры по выявлению источника контаминации.

16. При значении коэффициента корреляции менее 0,9 необходима перестановка всех проб, начиная с первого этапа анализа.

Диагностический алгоритм исследований при урогенитальном хламидиозе

