



КЛИНИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

**Молекулярно-биологическое исследование для выявления ДНК и/или
РНК возбудителей инфекций, передаваемых половым путем
(*Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*,
Mycoplasma genitalium, *Trichomonas vaginalis*)**

Тип клинических рекомендаций:
Правила проведения клинических лабораторных исследований

Москва, 2014

Разработчики:

¹Гущин А.Е., ¹Рыжих П.Г., ¹Анисимова Н.С., ¹Творогова М.Г., ¹Шипулин Г.А., ²Иванов А.М.,
²Криворучко А.Б., ³Шипицына Е.В., ³Савичева А.М.

¹ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, г. Москва

²Военно-медицинская академия им С.М. Кирова, г. Санкт-Петербург,

³ФБГУ НИИАГ им. Д.О.Отта СЗО РАМН, г. Санкт-Петербург

Ключевые слова: молекулярно-биологические методы, методы амплификации нуклеиновых кислот, полимеразная цепная реакция, НАСБА, NASBA, ДНК, РНК, инфекции, передаваемые половым путем.

Настоящие клинические рекомендации устанавливают единые требования выполнению лабораторного исследования по выявлению нуклеиновых кислот (ДНК и/или РНК) *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium*, *Trichomonas vaginalis* в биологическом материале методами амплификации нуклеиновых кислот ПЦР и реакции НАСБА (NASBA) в клинико-диагностических лабораториях медицинских организаций.

Одобрены на XVII форуме «Национальные дни Лабораторной медицины России» Общероссийской научно-практической Конференции «Эффективная лабораторная медицина: методы и средства анализа, способы организации и стандарты практики» в г. Москве 02 октября 2013 года.

Утверждены Профильной комиссией Минздрава России по клинической лабораторной диагностике 15 февраля 2014 года. Представлены от Ассоциации специалистов и организаций лабораторной службы «Федерация лабораторной медицины».

Оглавление

1. Общие положения. Правомочность применения молекулярно-биологических методов для диагностики инфекций, вызванных <i>Neisseria gonorrhoeae</i> , <i>Chlamydia trachomatis</i> , <i>Mycoplasma genitalium</i> , <i>Trichomonas vaginalis</i>	5
1.1. Показания для проведения молекулярно-биологического исследования.....	6
2. Требования к обеспечению выполнения молекулярно-биологического исследования.	7
2.1. Требования к специалистам и вспомогательному персоналу.	7
2.2. Требования к обеспечению безопасности труда медицинского персонала.....	9
2.3. Требования к организации лаборатории, выполняющей молекулярно-биологическое исследование.	10
2.4. Материальные ресурсы, необходимые для выполнения молекулярно-биологического исследования.	11
2.4.1. Лабораторное оборудование, расходные материалы.	11
2.4.2. Реактивы, наборы реагентов.....	11
3. Характеристика методик выполнения молекулярно-биологического исследования.	11
3.1. Получение образцов биологического материала.	11
3.2. Идентификация образца.....	13
3.3. Приемлемость образца.....	13
3.4. Описание хода выполнения молекулярно-биологического исследования для выявления ДНК методом ПЦР и РНК методом НАСБА (NASBA) <i>N.gonorrhoeae</i> , <i>C.trachomatis</i> , <i>M.genitalium</i> , <i>T.vaginalis</i>	13
3.5. Описание стандартных операционных процедур. Принципы молекулярно-биологического исследования для выявления ДНК методом ПЦР и РНК методом НАСБА (NASBA) <i>N.gonorrhoeae</i> , <i>C.trachomatis</i> , <i>M.genitalium</i> , <i>T.vaginalis</i>	14
3.5.1. Выделение и очистка нуклеиновых кислот.	14
3.5.2. Принцип метода ПЦР.....	16
3.5.3. Принцип реакции транскрипционной амплификации НАСБА (NASBA).	18
3.5.4. Анализ результатов исследования.	19
3.5.5. Операционные характеристики.....	20
4. Регистрация и интерпретация результатов молекулярно-биологического исследования для выявления ДНК и/или РНК <i>N.gonorrhoeae</i> , <i>C.trachomatis</i> , <i>M.genitalium</i> , <i>T.vaginalis</i>	22
5. Обеспечения качества молекулярно-биологического лабораторного исследования.	23
5.1. Ведение регистрации контрольных мероприятий.....	23
5.2. Контроль качества материалов и оборудования.....	24
5.3. Внутрилабораторный контроль качества исследования.....	24
5.4. Внешняя оценка качества	25
5.5. Непрерывное образование специалистов.....	25
6. Трудозатраты на выполнение молекулярно-биологического исследования.....	25
<i>Приложение 1. Необходимое оборудования для проведения молекулярно-биологического исследования.</i>	<i>26</i>

Рабочая зона 1. Прием, регистрации, разбор и первичная обработка биологического материала:	26
Рабочая зона 2. Выделение и очистка нуклеиновых кислот:	26
Рабочая зона 3. Проведение реакции амплификации и учета ее результатов при использовании гибридизационно-флуоресцентного метода детекции:	27
Рабочая зона 4. Детекция и учет результатов реакции амплификации при использовании электрофоретического метода детекции.	28
<i>Приложение 2. Методики получения, транспортировки и хранения образцов биологического материала для последующего молекулярно-биологического исследования для выявления ДНК/РНК <i>N.gonorrhoeae</i>, <i>S.trachomatis</i>, <i>M.genitalium</i>, <i>T.vaginalis</i>.....</i>	29
Получение образцов мочи	29
Получение образцов биоматериала из ротоглотки	29
Получение образцов отделяемого конъюнктивы	30
Получение образцов из урогенитального тракта женщин. Получение образцов соскоба эпителия из цервикального канала.	30
Получение образцов отделяемого влагалища.....	30
Получение образцов отделяемого уретры женщин. Соскоб эпителиальных клеток из уретры женщин	31
Получение образцов из урогенитального тракта мужчин. Получение образцов отделяемого уретры мужчин. Соскоб эпителиальных клеток из уретры мужчин.	31
Получение образцов секрета предстательной железы	31
ЛИТЕРАТУРА	32

1. Общие положения. Правомочность применения молекулярно-биологических методов для диагностики инфекций, вызванных *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium*, *Trichomonas vaginalis*.

Инфекции, возбудители которых передаются половым путем (ИППП), согласно современной классификации, насчитывают несколько десятков нозологических форм. Среди них наиболее распространенными и оказывающими наибольшее негативное влияние на репродуктивную функцию человека являются:

- Гонококковая инфекция (возбудитель *Neisseria gonorrhoeae*), код МКБ-10 A54;
- Хламидийная инфекция (возбудитель *Chlamydia trachomatis*), код МКБ-10 A56;
- Урогенитальный трихомониаз (возбудитель *Trichomonas vaginalis*) код МКБ-10 A59;
- Урогенитальная инфекция, вызванная *Mycoplasma genitalium*, код МКБ-10 N34+B96.8; N72.+B96.8; N76.+B96.8

Несмотря на то, что перечисленные заболевания являются самостоятельными нозологическими формами, их объединяет общие факторы риска инфицирования, пути и способы передачи возбудителей, схожие симптомы и клинические проявления инфекции, локализация инфекционного процесса. В то же время отсутствие специфических для каждого заболевания клинических признаков и проявлений, часто бессимптомное течение инфекционного процесса затрудняет их диагностику и дифференциальную диагностику. При этом, в отсутствие своевременного и адекватного лечения инфицированные имеют высокие риск восходящей инфекции с развитием воспалительных заболеваний органов малого таза, риск развития бесплодия, осложнений беременности, рождения детей с низким весом и другой патологией [1,2]. Для постановки диагноза соответствующего заболевания требуется лабораторное подтверждение наличия возбудителя в биологическом материале пациента. Существующие рутинные методы лабораторной диагностики ИППП- микроскопические методы, культуральные (бактериологические), иммунологические методы (методы определения антител и/или антигенов возбудителей) обладают диагностической чувствительностью, не позволяющей установить наличие возбудителя у 20-40% инфицированных, в то время как молекулярно-биологические методы обладают диагностической чувствительностью, приближающейся к 100% [3-7]. Молекулярно-биологические методы (ПЦР, реакция НАСБА (NASBA) и другие) направлены на обнаружение генетического материала (ДНК и/или РНК) возбудителей, который является неотъемлемой и ключевой частью любого живого (микро-)организма. ДНК и РНК перечисленных возбудителей ИППП не могут существовать вне самих возбудителей за

исключением ситуаций (ограниченных по времени), когда данные микроорганизмы разрушаются под воздействием антимикробных препаратов или защитных механизмов организма человека. В связи с этим, наличие ДНК/РНК *N.gonorrhoeae*, *C.trachomatis*, *M.genitalium*, *T.vaginalis*, с учетом других клинических и лабораторных факторов, может рассматриваться в качестве специфических маркеров соответствующих инфекций и основанием для постановки диагноза заболевания. В настоящее время как в отечественных клинических руководствах [3], так и в зарубежных [4-7] молекулярно-биологические методы входят в перечень методов, рекомендованных для диагностики этих ИППП, а, согласно утвержденному порядку оказания медицинской помощи взрослому населению по профилю «дерматовенерология» в структуру клинко-диагностической лаборатории предусмотрено молекулярно-биологическое подразделение [8]. Однако в этих руководствах не определен порядок и другие организационные и нормативные вопросы проведения лабораторного исследования с помощью молекулярно-биологических методов. Настоящие клинические рекомендации устанавливают единые требования к выполнению лабораторного молекулярно-биологического исследования по выявлению нуклеиновых кислот (ДНК и/или РНК) методами амплификации нуклеиновых кислот - ПЦР и реакции НАСБА (NASBA) в клинко-диагностических лабораториях медицинских организаций.

1.1. Показания для проведения молекулярно-биологического исследования.

Целью молекулярно-биологического исследования служит выявление в биологическом материале, полученном от пациента, нуклеиновых кислот - ДНК и/или РНК возбудителей ИППП - *N.gonorrhoeae*, *C.trachomatis*, *M.genitalium*, *T.vaginalis*. Полученный результат используется при постановке диагноза соответствующего заболевания, а также при оценке результатов лечения.

Назначение данного исследование осуществляется врачом-дерматовенерологом, врачом-урологом, врачом-акушером-гинекологом, на основании данных анамнеза, жалоб пациента, клинических проявлений инфекционно-воспалительного процесса, а также других показаний.

В соответствии с действующими отечественными и международными клиническими рекомендациями [3-7] показаниями для назначения молекулярно-биологического исследования являются:

- 1) Жалобы и симптомы, свидетельствующие о наличии инфекционно-воспалительного процесса в уrogenитальном тракте:
 - Патологические выделения из половых органов.

- Признаки воспаления в области половых органов – гиперемия, отек, зуд, жжение, дизурия.
 - Болезненность при половых контактах.
 - Межменструальные и посткоитальные кровотечения.
 - Боли внизу живота (у женщин).
 - Боли в промежности (у мужчин).
- 2) Отягощенный акушерско-гинекологический анамнез:
- Бесплодие.
 - Невынашивание беременности.
 - Преждевременные роды.
 - Появление новорожденных с низким весом.
- 3) Предстоящие хирургические манипуляции в области половых органов и органов малого таза.
- 4) Эпидемиологический анамнез:
- Сексуальный контакт с инфицированным ИППП без использования барьерных средств контрацепции.
 - Случайный(-ые) сексуальный(-ые) контакт(-ы) без использования барьерных средств контрацепции.
 - Насилие сексуального характера.
- 5) Профилактическое обследование на урогенитальные инфекции в отсутствии клинических проявлений и жалоб:
- при прегравидарной подготовке.
 - во время беременности.
 - лиц, входящих в группы высокого риска инфицирования.

2. Требования к обеспечению выполнения молекулярно-биологического исследования.

2.1. Требования к специалистам и вспомогательному персоналу.

Молекулярно-биологическое исследование в соответствии с действующей номенклатурой специальностей [9] проводят:

- Специалисты с высшим медицинским и послевузовским образованием - врачи клинической лабораторной диагностики, врачи-лаборанты, врачи-бактериологи, врачи-вирусологи, врачи-лабораторные микологи, врачи-лабораторные генетики.

- Специалисты с высшим профессиональным (немедицинским) образованием: биологи.
- Специалисты со средним медицинским образованием: медицинские технологи, фельдшеры-лаборанты, лаборанты.

Уровень профессионального образования, дополнительного профессионального образования, требования к квалификации должны соответствовать действующему законодательству [10,11] и подкреплены документально (дипломы, сертификаты, свидетельства и др.). Кроме того, перечисленные специалисты должны пройти краткосрочные курсы тематического усовершенствования по ПЦР-диагностике инфекционных болезней и иметь соответствующее удостоверение государственного образца.

Квалификационные характеристики и должностные обязанности специалистов с высшим профессиональным образованием [11].

Врачи клинической лабораторной диагностики, врачи-лаборанты, врачи-бактериологи, врачи-вирусологи, врачи-лабораторные микологи, врачи-лабораторные генетики и биологи должны знать нормативные и правовые акты в Российской Федерации в сфере здравоохранения, действующие клинические рекомендации и порядок оказания медицинской помощи по профилю «дерматовенерология», документы, регламентирующие деятельность клиничко-диагностических лабораторий при работе с материалом, содержащим (подозрительным на содержание) инфекционные агенты, основы патоморфологии, патогенеза синдромов и заболеваний в том числе урогенитального, современные методы диагностики и лечения ИППП, клиническое значение лабораторных исследований, все этапы подготовительной работы и проведения молекулярно-биологического исследования, правила взятия биологического материала, причины и условия возникновения пре-аналитических и аналитических ошибок, правила техники безопасности при работе с потенциально инфицированным биологическим материалом, требования к доставке и хранению материала, критерии оценки результатов исследования и др.;

Врачи клинической лабораторной диагностики, врачи-лаборанты, врачи-бактериологи, врачи-вирусологи, врачи-лабораторные микологи, врачи-лабораторные генетики и биологи организуют рабочее место для проведения лабораторного молекулярно-биологического исследования; осуществляют мероприятия по обеспечению и контролю всего технологического процесса (пре-аналитического, аналитического и пост-аналитического этапов); принимают решение о необходимости повторного проведения повторного молекулярно-биологического исследования или повторного получения биологического материала; ведут медицинскую документацию в установленном порядке,

планируют и анализируют результаты своей работы, а так же работы специалистов со средним медицинским образованием, выдают лабораторное заключение на основании полученных результатов и консультируют врачей-дерматовенерологов, врачей-гинекологов, врачей-урологов по вопросам интерпретации результатов исследований и др.

Квалификационные характеристики и должностные обязанности специалистов со средним медицинским образованием.

Специалисты со средним медицинским образованием осуществляют подготовительную работу, необходимую для проведения молекулярно-биологического исследования - подготовку помещений, боксов биологической безопасности, ПЦР боксов, расходных материалов, утилизацию использованных расходных материалов и остатков использованных биологических образцов; проводят прием поступающих в лабораторию образцов и сопроводительных документов, регистрацию полученного биологического материала; проводят молекулярно-биологическое исследование или его отдельные этапы, а также регистрируют результаты исследования, ведут учетно-отчетную документацию, и др.

Специалисты со средним медицинским образованием должны знать нормативные и правовые акты в Российской Федерации в сфере здравоохранения, в том числе регламентирующие деятельность клинико-диагностических лабораторий при работе с материалом содержащим (подозрительным на содержание) инфекционных агентов, основы лабораторной диагностики заболеваний, включая ИППП, устройства и правила эксплуатации используемого оборудования, причины и условия возникновения пре-аналитических и аналитических ошибок, правила техники безопасности при работе с потенциально инфицированным биологическим материалом и др.

2.2. Требования к обеспечению безопасности труда медицинского персонала.

Все образцы биологического материала считают потенциально опасными, т.к. могут содержать патогенные микроорганизмы. Противоэпидемический режим в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологическое исследование биологического материала, содержащего (потенциально содержащего) эти микроорганизмы должен быть обеспечен в соответствии с действующими санитарными правилами [12].

Персонал, непосредственно участвующий в проведении молекулярно-биологического исследования, обязан соблюдать действующие правила работы в молекулярно-биологических лабораториях [13], строго придерживаться действующих стандартов по формированию и поддержанию безопасности рабочей среды в медицинских лабораториях при манипуляциях с

пробами пациентов, химическими реактивами и другими объектами потенциальной опасности для здоровья людей [14].

2.3. Требования к организации лаборатории, выполняющей молекулярно-биологическое исследование.

Молекулярно-биологическое исследование выполняется в организациях, имеющих санитарно-эпидемиологическое заключение о возможности работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности и лицензию на проведение клинических лабораторных исследований [15].

Организация помещений, требования к оборудованию и правила работы в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологическое исследование должны соответствовать действующим методическим указаниям [13].

В целях предотвращения загрязнения (контаминации) продуктами амплификации (ампликонами), препаратами нуклеиновых кислот или биоматериалом вновь исследуемых образцов, реагентов и расходных материалов, и, как следствие, появления ложноположительных результатов, лаборатория в соответствии с этапами проведения анализа должна включать набор последовательно расположенных помещений (рабочих зон) самостоятельных или отдельно выделенных в составе других функциональных помещений:

- Зона приема, регистрации, разбора и первичной обработки биологического материала (Рабочая зона 1);
- Зона выделения нуклеиновых кислот (Рабочая зона 2);
- Зона проведения реакции амплификации, в том числе амплификации с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов реакции (Рабочая зона 3);
- Зона электрофоретической детекции продуктов реакции амплификации и учета результатов (Рабочая зона 4).

Все сотрудники должны выполнять инструкции и правила техники безопасности, изложенные в технических паспортах к электрическим приборам, используемым в работе; персонал, работающий с реактивами, должен быть обучен обращению с ними, использовать средства персональной защиты, соблюдать правила личной гигиены.

Сбор, временное хранение, обеззараживание и транспортировка потенциально опасных отходов, загрязненных остатками биологического материала, образующихся в процессе выполнения технологии, должна проводиться в соответствии с действующими санитарными правилами и нормами [16]. Отходы, содержащие (потенциально содержащие) микроорганизмы (материалы и инструменты, предметы, загрязненные кровью и/или другими биологическими жидкостями) относятся к отходам класса Б, подлежат обязательному обеззараживанию (дезинфекции)/обезвреживанию. Выбор метода обеззараживания/обезвреживания определяется возможностями организации, осуществляющей медицинскую деятельность.

Отходы класса Б собираются в одноразовую мягкую (пакеты) или твердую (непрокальваемую) упаковку (контейнеры) желтого цвета или имеющие желтую маркировку. Выбор упаковки зависит от морфологического состава отходов. Реагенты, используемые для проведения экстракции нуклеиновых кислот и ПЦР, относятся к отходам класса Г. Отходы класса Г собираются в мягкую (пакеты) или твердую (непрокальваемую) упаковку (контейнеры) любого цвета, кроме красного и желтого. Выбор упаковки зависит от морфологического состава отходов. Вывоз и обезвреживание отходов должно производиться аккредитованной организацией.

2.4. Материальные ресурсы, необходимые для выполнения молекулярно-биологического исследования.

2.4.1 Лабораторное оборудование, расходные материалы.

Все электрические устройства и приборы должны быть зарегистрированы на территории РФ, иметь сертификат соответствия ГОСТ Р Госстандарта России и отвечать требованиям соответствующих нормативных документов.

Список оборудования и реагентов, необходимых для проведения молекулярно-биологического исследования с соответствии с действующими нормативными документами [8,13] представлен в **Приложении 1**. Более детальный список и особенности оснащения каждой из зон зависят от используемых медицинских изделий для диагностики *in vitro* (наборов реагентов) и должны быть представлены в инструкциях к ним.

2.4.2. Реактивы, наборы реагентов.

Для проведения молекулярно-биологического исследования для выявления ДНК и/или РНК возбудителей инфекций, передаваемых половым путем - *N.gonorrhoeae*, *S.trachomatis*, *M.genitalium*, *T.vaginalis* могут быть использованы только медицинские изделия для диагностики *in vitro* (наборы реагентов), зарегистрированные на территории РФ в установленном порядке. Набор реагентов должен содержать все реагенты, необходимые для проведения всех этапов исследования, (за исключением таких реагентов, как этанол, изопропанол), инструкцию на русском языке, описывающую все этапы исследования.

3. Характеристика методик выполнения молекулярно-биологического исследования.

3.1. Получение образцов биологического материала.

Взятие биологического материала следует осуществлять только с использованием рекомендуемых для этих целей одноразовых стерильных инструментов (зондов, тампонов, цитощеток и т.д.). Работать следует только в одноразовых стерильных перчатках.

Взятие биологического материала производится в пробирки с транспортной средой, предоставляемой или рекомендованной производителем наборов реагентов, в случаях, где использование транспортной среды предусмотрено инструкцией к набору реагентов. Не рекомендуется использование транспортной среды других производителей, если это противоречит инструкции к набору реагентов.

Учитывая, что биологический материал со слизистых оболочек содержит значительное количество слизи и вязких компонентов, то для его более полного смывания и равномерного распределения в транспортной среде, а также в целях стандартизации исследования рабочую часть зонда (тампона) рекомендуется обламывать и оставлять в пробирке с транспортной средой.

Сразу после взятия плотно закрывать пробирки, с биологическим материалом, не касаясь их внутренней поверхности и внутренней поверхности крышек.

При переносе биологического материала из пробирок в новые использовать только отдельные одноразовые стерильные наконечники с аэрозольными барьерами (фильтрами).

При работе с биологическим материалом, открывая пробирки, не производить резких движений и не допускать разбрызгивания и расплескивания, это может привести к контаминации биологического материала и рабочих поверхностей.

Строго соблюдать условия хранения и транспортирования биологического материала, описанные в инструкциях к транспортным средам.

Таблица 1. Виды биологического материала, исследуемого при выявлении возбудителей ИППП.

Вид биологического материала	Возбудитель
Моча	<i>N.gonorrhoeae, C.trachomatis, M.genitalium, T.vaginalis</i>
Соскобное отделяемое слизистой ротоглотки	<i>N.gonorrhoeae, C.trachomatis</i>
Отделяемое конъюнктивы глаз	<i>N.gonorrhoeae, C.trachomatis</i>
Соскобное отделяемое слизистых оболочек уrogenитального тракта	<i>N.gonorrhoeae, C.trachomatis, M.genitalium, T.vaginalis</i>
Секрет предстательной железы	<i>N.gonorrhoeae, C.trachomatis, M.genitalium, T.vaginalis</i>

Методики получения, хранения и транспортировки образцов биологического материала представлены в **Приложении 2**.

3.2. Идентификация образца.

При получении образца биологического материала пробирка с образцом должна иметь маркировку (кодировку), соответствующую маркировке (кодировке) направительного бланка и исключать ошибочное толкование. Возможно использование штрих-кодов.

В направлении на исследование должна быть включена следующая информация: фамилия и инициалы (код) пациента, возраст или дата рождения, пол, у женщин - день менструального цикла или срок беременности (недель), дата и время получения образца, тип биологического материала (например, моча, вагинальное отделяемое и др.), предварительный клинический диагноз, фамилию и инициалы врача, назначившего исследование.

3.3. Приемлемость образца.

После доставки образца в лабораторию сотрудник лаборатории, принимающий материал, должен проверить правильность оформления направления на исследование, маркировку пробирок с биологическим материалом, их целостность и зарегистрировать поступивший материал в рабочем журнале в бумажной или электронной форме. Нумерация образцов при регистрации должна быть идентична нумерации в бланках направлений на молекулярно-биологическое исследование.

Непригодными для исследования являются образцы:

- немаркированные или несущие неверную (нечитаемую) маркировку;
- для которых не указаны дата и время получения материала;
- хранившиеся и транспортировавшиеся с нарушением требований, установленных для данного типа биологического материала;
- с нарушенной целостностью и/или герметичностью пробирок (в т.ч. пролитые образцы).

В случае непригодности доставленного образца необходимо уведомить врача, назначившего исследование и рекомендовать повторное взятие материала с соблюдением всех перечисленных правил.

Если повторное взятие таких образцов материала невозможно, при оформлении результата молекулярно-биологического исследования необходимо отразить возможность влияния нарушения правил преаналитического этапа на полученный результат.

3.4. Описание хода выполнения молекулярно-биологического исследования для выявления ДНК методом ПЦР и РНК методом НАСБА (NASBA) *N.gonorrhoeae, C.trachomatis, M.genitalium, T.vaginalis*.

Полученный от пациентов биологический материал доставляется в клиничко-диагностическую лабораторию, в Рабочую зону 1, где проводится регистрация образцов

биологического материала, в случае необходимости проводится первичная обработка и/или аликвотирование. Далее пробирки с предобработанными или нативными образцами переносятся в Рабочую зону 2, где из биологического материал проводится выделение и очистка нуклеиновых кислот. После этого пробирки с очищенными препаратами ДНК и/или РНК переносятся в Зону 3, в которой проводится приготовление амплификационных смесей и добавление в них образцов очищенных препаратов нуклеиновых кислот. Микропробирки, содержащие реагенты для амплификации и анализируемые образцы нуклеиновых кислот помещаются в программируемый термоциклер (амплификатор), в котором по заданному режиму проводится реакция амплификации. Продукты реакции амплификации детектируются либо в процессе амплификации (ПЦР или НАСБА (NASBA) с гибридационно-флуоресцентной детекцией в реальном времени), либо после окончания реакции (ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией по конечной точке или ПЦР с электрофоретической детекцией). В случае использования методики ПЦР, предполагающей электрофоретический способ детекции, пробирки после окончания реакции переносятся в Рабочую зону 4, для проведения электрофореза в агарозном геле. По окончании детекции проводится анализ и регистрация полученных данных. Данные в электронной форме направляются в подразделение, где проводится интерпретация результатов и выдача лабораторного заключения.

Все этапы исследования проводятся в соответствии с инструкцией к используемым наборам реагентов.

3.5. Описание стандартных операционных процедур. Принципы молекулярно-биологического исследования для выявления ДНК методом ПЦР и РНК методом НАСБА (NASBA) *N.gonorrhoeae*, *C.trachomatis*, *M.genitalium*, *T.vaginalis*.

3.5.1. Выделение и очистка нуклеиновых кислот.

Биологический материал содержат большое количество веществ, ингибирующих ПЦР и реакцию НАСБА, кроме того молекулы ДНК и РНК в естественном состоянии находятся внутри клеток микроорганизмов, поэтому первым этапом молекулярно-биологического исследования является обработка биологического материала, направленная на получение нуклеиновых кислот, максимально очищенных от ингибиторов ПЦР и реакции НАСБА. Существует две основных группы методов очистки нуклеиновых кислот – методы сорбционной экстракции нуклеиновых кислот и методы термической обработки биоматериала. В основе методов сорбционной экстракции лежит лизис и денатурации компонентов биологического материала с помощью хаотропных агентов - высоко концентрированных растворов некоторых солей (например, гуанидин хлорида или гуанидин изоционата) с одновременной избирательной

сорбцией нуклеиновых кислот на твердой фазе (частицах силикагеля, нейлоновых или нитроцеллюлозных мембранах). С помощью спиртовых отмывок ингибиторы удаляются, а нуклеиновые кислоты в последствие снимаются с твердофазных носителей путем растворения их в воде или низкосолевого буфере. Данные методы очистки высокоэффективны, как в отношении ДНК, так и РНК. За счет высокой воспроизводимости результатов экстракции возможна количественная оценка содержания ДНК возбудителей в биологическом материале. Для наборов реагентов, включающих в составе сорбентов магнитные частицы или нитроцеллюлозные (нейлоновые) мембраны в составе микроколонок, разработаны автоматизированные варианты экстракции с использованием автоматизированных станций.

При использовании методов термической обработки биоматериала проводится нагревание и инкубация (от 5 до 15 минут) образцов биологического материала при температурах от 95 до 100°C, в присутствии детергентов. В результате этого происходит разрушение клеточных мембран, выход нуклеиновых кислот в раствор и инактивация (иногда обратимая и частичная) ингибиторов. Так как ингибиторы не удаляются из раствора, а некоторые из них, в первую очередь РНКзы, устойчивы к нагреванию, данный способ не может использоваться для очистки и экстракции РНК. Данные методы относятся к экспресс-методам экстракции, т.к. просты в исполнении и позволяют за короткое время обработать большое количество образцов. В связи с тем, что количество неинaktivированных ингибиторов может значительно варьировать от образца к образцу, эффективность очистки ДНК такими методами трудно стандартизовать, поэтому их не рекомендуется использовать в тех случаях, когда необходима количественная оценка содержания ДНК в биологическом материале.

Препараты ДНК, полученные при сорбционной экстракции, можно хранить в течение 1 недели при температуре от 2 до 8 °С или в течение года при температуре не выше минус 16 °С. Препараты ДНК, полученные с помощью методов термической обработки следует хранить при температуре не выше минус 16 °С. Препараты РНК не рекомендуется хранить после экстракции при комнатной температуре более 30 минут или более 2-3 часов при температуре от 2 до 8 °С из-за крайней нестабильности молекул РНК. Для более длительного хранения образцы РНК замораживают и хранят не выше минус 60°C.

Основные требования при проведении этапа выделения и очистки ДНК или РНК.

При работах по выделению и очистке нуклеиновых кислот из биологического материала на всех этапах необходимо использовать расходные материалы (пластиковые пробирки и наконечники с фильтрами) только с маркировкой «DNase, RNase- free» («свободные от ДНК-аз, РНК-аз»).

Очистку и выделения нуклеиновых кислот необходимо проводить с использованием контрольных образцов (КО):

- *Внутренний КО* - образец, содержащий рекомбинантный препарат ДНК или РНК в зависимости от типа исследуемой нуклеиновой кислоты микроорганизма и особенностей методики. *Внутренний КО* добавляется в каждую пробу на этапе выделения нуклеиновых кислот, и в результате проходит через все этапы молекулярно-биологического исследования в составе биологического образца.
Назначение: служит для контроля потерь нуклеиновых кислот в процессе пробоподготовки, а также качества очистки ДНК или РНК от ингибиторов реакции амплификации.
- *Отрицательный КО* – образец, заведомо не содержащий искомым возбудитель или его нуклеиновые кислоты.
Назначение: служит для контроля возможной контаминации во время выделения и очистки нуклеиновых кислот, а также при приготовлении амплификационных смесей. *Отрицательный КО* необходимо использовать при исследовании даже единичных биологических образцов.

3.5.2. Принцип метода ПЦР.

Принцип метода ПЦР - многократное увеличение числа копий (амплификация) специфического участка ДНК, катализируемое ферментом ДНК-полимеразой. Реакция происходит в буферном растворе с участием термостабильной ДНК-полимеразы, четырех типов нуклеотидов, двух синтетических олигонуклеотидных праймеров, каждый из которых комплиментарен специфическому для выявляемого микроорганизма участку одной из цепей ДНК. Реакция амплификации состоит из трех циклически повторяющихся этапов, которые включают: разделение (денатурацию) двухцепочечной молекулы ДНК на одиночные цепи; гибридизацию (отжиг) праймеров со специфическими участками своих цепей; полимеризацию - синтез ДНК-полимеразой новых цепей с присоединившихся праймеров и появлением новых двухцепочечных молекул ДНК. Реакция проводится в программируемых термоциклерах (амплификаторах). В результате повторяющихся 30-45 циклов амплификации концентрация специфических фрагментов увеличивается экспоненциально и достигает 10^9 - 10^{11} копий.

Детекция продуктов амплификации осуществляется одним из способов.

При электрофоретическом способе детекции продукты ПЦР анализируются с помощью электрофореза в агарозном геле. В лунки агарозного геля, помещенного в камеру с буферным раствором и интеркалирующим красителем, вносится аликвота продукта ПЦР. Электроды камеры подключаются к источнику постоянного тока, в поле которого в геле молекулы ДНК, заряженные отрицательно, движутся в направлении положительного электрода. Скорость

движения зависит от длины фрагмента ДНК. Присутствующий в растворе интеркалирующий краситель связывается с двухцепочечной ДНК и флуоресцирует оранжевым цветом в УФ-свете. Наличие специфического продукта ПЦР в исследуемых образцах определяется по наличию флуоресцирующей полосы, расположенной в геле на одном уровне с продуктом амплификации положительного контрольного образца, содержащего либо нативный, либо рекомбинантный препарат ДНК выявляемого микроорганизма.

При гибридизационно-флуоресцентной детекции продуктов амплификации реакция проводится в присутствии олигонуклеотидных ДНК-зондов, комплементарных специфическому участку ДНК микроорганизма, расположенному между праймеров. Данные зонды содержат флуоресцентную метку и тушитель флуоресценции, которые при накоплении специфического продукта амплификации и гибридизации зонда обеспечивают появление и накопление флуоресцентного сигнала заданной длины волны. Для амплификации и детекции флуоресцентного сигнала используют специальные приборы, которые позволяют регистрировать флуоресцентный сигнал. Использование флуоресцентных меток с разной длиной волны испускаемого сигнала в составе гибридизационных зондов и нескольких пар праймеров, каждая из которых направлена на амплификацию своего специфического фрагмента, позволяет проводить в одной реакции амплификацию фрагментов ДНК одновременно нескольких микроорганизмов (мультиплексная ПЦР). В этом случае регистрация сигнала флуоресценции происходит по одному из нескольких каналов детекции.

Существует два способа регистрации флуоресцентного сигнала – «по конечной точке» (ПЦР-КТ) или в «режиме реального времени» (ПЦР-РВ). В случае ПЦР-КТ регистрация флуоресцентного сигнала осуществляется после окончания реакции в флуоресцентном ПЦР-детекторе (согласно инструкции к используемому прибору). Результаты ПЦР-КТ интерпретируются автоматически с помощью программного обеспечения используемого прибора на основании отношения уровня флуоресцентного сигнала в исследуемом образце и уровнем фонового сигнала, в образце, не содержащем препарат ДНК.

В случае ПЦР-РВ регистрация флуоресцентного сигнала (-ов) осуществляется в процессе реакции, после каждого цикла амплификации. Реакция проводится в амплификаторах, имеющих модуль для регистрации флуоресцентного сигнала в режиме реального времени. При проведении мультиплексной ПЦР-РВ регистрация сигнала осуществляется по каждому из каналов детекции в соответствии с количеством выявляемых мишеней и длиной волны флуоресцентной метки. Появляющаяся в этом случае кривая, описывающая накопление флуоресцентного сигнала(-ов) отражает накопление специфических продуктов ДНК возбудителей. Результаты ПЦР-РВ анализируют на основании наличия (или отсутствия)

кривой флуоресцентного сигнала, пересекающей линию порога базовой флуоресценции с определением значения порогового цикла (*Ct*-цикла), при котором это пересечение происходит.

3.5.3. Принцип реакции транскрипционной амплификации НАСБА (NASBA).

Принцип метода НАСБА (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification, NASBA) основан на изотермической транскрипционной амплификации молекул РНК на матрице образующихся в процессе реакции промежуточных молекул ДНК. Реакция поддерживается каталитической активностью трех ферментов - AMV-RT (обратной транскриптазы вируса миобластомы птиц), РНКазы-Н и T7-РНК полимеразы, с участием четырех типов нуклеотидов, двух синтетических олигонуклеотидных праймеров, каждый из которых комплементарен специфическому для выявляемого микроорганизма участку 16S рибосомальной РНК. Один из праймеров содержит промоторную область, необходимую для инициации транскрипции ферментом T7-РНК полимеразой. При температуре 41°C в буферном растворе происходит гибридизация одного из праймеров с участком одноцепочечной молекулы рибосомальной 16S РНК и синтез с помощью AMV-RT цепи кДНК. После образования РНК-ДНК гибрида РНКазы-Н удаляет цепь РНК, а к оставшейся ДНК цепи гибридизуется второй специфический праймер, после чего AMV-RT достраивает вторую цепь ДНК с образованием активного промотора для T7-РНК полимеразы. Далее с помощью T7-РНК полимеразы происходит синтез молекул РНК транскриптов, каждая из которых включается в новый раунд амплификации с образованием новой генерации РНК-транскриптов. В итоге, в растворе накапливается до 10^{10} молекул РНК-продуктов транскрипционной амплификации.

При гибридизационно-флуоресцентной детекции продуктов НАСБА реакция, как и в случае с ПЦР, проводится в присутствии флуоресцентно-меченных специфических олигонуклеотидных ДНК-зондов. В случае реакции НАСБА это – «молекулярные маячки» («molecular beacons»), имеющие последовательность, которая комплементарна специфическому РНК-транскрипту и две короткие фланкирующие последовательности, комплементарные друг другу. С накоплением специфических РНК-транскриптов флуоресцентные зонды гибридизуются с ними с появлением флуоресцентного сигнала. Как и в случае с ПЦР, регистрация флуоресцентного сигнала проводится либо по конечной точке, либо в режиме реального времени в соответствующих приборах.

Основные требования при проведении ПЦР и НАСБА амплификации.

При работах по подготовке и проведению этапа амплификации на всех этапах необходимо использовать одноразовые стерильные расходные материалы (пластиковые пробирки и наконечники с фильтрами) только с маркировкой «DNase, RNase- free» («свободные от ДНК-аз, РНК-аз»).

При проведении этапа амплификации нуклеиновых кислот из образцов биологического материала помимо внутреннего КО необходимо использовать контрольные образцы:

- *Положительный КО* - образец, содержащий либо очищенную ДНК/РНК исследуемого микроорганизма, либо рекомбинантный препарат с детектируемым фрагментом генома исследуемого возбудителя.

Назначение: служит для контроля качества реактивов для амплификации, работы прибора, условий амплификации.

- *Отрицательный КО* амплификации - образец, заведомо не содержащий нуклеиновых кислот искомого возбудителя.

Назначение: служит для контроля возможной контаминации реактивов для амплификации ампликонами или нуклеиновыми кислотами исследуемых микроорганизмов.

3.5.4. Анализ результатов исследования.

Анализировать результаты исследования образцов биологического материала следует только с учетом результатов исследования контрольных образцов.

Результат тестирования КО (*Внутреннего, Отрицательных и Положительного*) при исследовании биологических образцов должны соответствовать параметрам, указанным в инструкции к набору реагентов.

Если по результатам исследования в образцах биоматериала не определяется ДНК (РНК) *Внутреннего КО*, и при этом не определяется ДНК (РНК) возбудителя, то необходимо повторить исследование соответствующих образцов. Данная ситуация может свидетельствовать о снижении эффективности экстракции, потерях нуклеиновых кислот, присутствию ингибиторов, а также в снижении эффективности амплификации из-за снижения качества реагентов или работы оборудования.

Если результат исследования положительного КО отрицательный, то необходимо повторно исследовать биологические образцы из данной постановки, в которых не было обнаружено ДНК (РНК) соответствующего микроорганизма. Данная ситуация может свидетельствовать о снижении эффективности амплификации из-за снижения качества реагентов или работы оборудования

Если по результатам исследования в *Отрицательных КО* обнаруживается ДНК выявляемого микроорганизма, но необходимо повторить молекулярно-биологическое исследование для всех биологических образцов, для которых зафиксирован положительный результат.

При невыполнении указанных условия результат исследования образцов биологического материала нельзя признать валидным и годным для клинической интерпретации.

3.5.5. Операционные характеристики.

Основными операционными характеристиками тестов для выявления нуклеиновых кислот *N.gonorrhoeae*, *C.trachomatis*, *M.genitalium*, *T.vaginalis* — является чувствительность (аналитическая и диагностическая) и специфичность (аналитическая и диагностическая) [17,18]:

Аналитическая чувствительность (АЧ) отражает минимальное количество аналита (ДНК или РНК) в образце биологического материала, которое должно воспроизводимо обнаруживаться тестом не менее, чем в 95% случаев повторных исследований образца.

АЧ определяется экспериментально в процессе разработки набора реагентов и зависит от:

- условий хранения и транспортировки биологического материала;
- количества потерь нуклеиновых кислот при обработке биологического материала;
- степени очистки от ингибиторов реакции амплификации;
- условия при хранении очищенных препаратов нуклеиновых кислот;
- эффективности амплификации, включающей качество реагентов и оптимизацию условия прохождения реакции;
- качества работы оборудования для амплификации и детекции;

В этой связи важным условием контроля АЧ является контролирование всего процесса молекулярно-биологического исследования, начиная с этапа выделения нуклеиновых кислот, с использованием *внутреннего КО*.

В настоящее время отсутствуют общепринятые международные требования к аналитической и диагностической чувствительности молекулярно-биологических тестов для выявления нуклеиновых кислот *N.gonorrhoeae*, *C.trachomatis*, *M.genitalium*, *T.vaginalis*. Концентрация возбудителя в очаге инфекции и, следовательно, в биологическом материале варьирует в значительных пределах в зависимости от стадии инфекции, реактивности организма человека, состояния его иммунной системы, приема лекарственных препаратов и других факторов. Однако учитывая, что указанные микроорганизмы рассматриваются, как безусловно-патогенные, аналитическая чувствительность тестов должна обеспечивать выявление нуклеиновых кислот при наличии их в биологическом материале в даже в низких концентрация. Соответственно, чем ниже концентрация ДНК/РНК, которая может быть

выявлена тестом, тем у большего количества инфицированных может быть установлена инфекция. В связи с этим, АЧ в значительной степени определяет другую операционную характеристику – диагностическую чувствительность.

Диагностическая чувствительность (ДЧ) отражает долю (%) положительных результатов молекулярно-биологического исследования (наличие ДНК/РНК) у обследованных инфицированных лиц.

ДЧ устанавливается в результате клинических испытаний, с использованием биологического материала от пациентов, у которых наличие инфекции установлено другими независимыми референсными методами или наборами реагентов с верифицированными ранее аналитическими и диагностическими характеристиками. В качестве референсных методов необходимо использовать те, у которых АЧ не ниже испытываемого метода.

Аналитическая специфичность (АС) – отражает отсутствие специфического продукта амплификации при наличии в биологическом материале нуклеиновых кислот других микроорганизмов, в первую очередь родственных видов (*Neisseriaceae*, кроме *N.gonorrhoeae*; *Chlamydiaceae* кроме *C.trachomatis*; *Mycoplasmataceae*, кроме *M.genitalium*; видов *Trichomonadidae*, кроме *T.vaginalis*), а также ДНК человека.

АС предварительно оценивается при разработке набора реагентов - конструировании олигонуклеотидных праймеров и гибридизационных зондов, оптимизации условий амплификации, а также экспериментально - при исследовании материала, содержащего ДНК/РНК родственных микроорганизмов. *АС* в значительной степени определяет и *диагностическую специфичность*, т.к. наличие перекрестной реакции с другими микроорганизмами, обитающими в том же, что и детектируемые возбудители ИППП приводит к ложноположительному результату и необоснованному лабораторному заключению.

Диагностическая специфичность (ДС) - отражает долю (%) отрицательных результатов (отсутствие ДНК/РНК) среди обследованных неинфицированных лиц. Также, как и *ДЧ*, *диагностическая специфичность* устанавливается экспериментально с использованием биологического материала, полученного от лиц, у которых было показано отсутствие инфекции на основании результатов лабораторных исследований, с использованием других независимых референсных методов или наборов реагентов с верифицированными ранее аналитическими и диагностическими характеристиками. В качестве референсных методов необходимо использовать те, у которых АЧ не ниже испытываемого метода.

Помимо *АС* для достижения высокой *ДС* имеют значение другие факторы, которые снижают риск получения ложно-положительных результатов:

- организация лаборатории с правильным делением на рабочие зоны и соблюдением санитарно-эпидемического режима;

- использование на всех этапах стерильных наконечников с аэрозольными барьерами (фильтрами), препятствующих распространению контаминации окружающей среды биологическим материалом или нуклеиновыми кислотами, получаемыми в процессе обработки биологического материала, а также попаданием в реагенты.
- использование *отрицательных КО*, обеспечивающих контроль за контаминацией.

4. Регистрация и интерпретация результатов молекулярно-биологического исследования для выявления ДНК и/или РНК *N.gonorrhoeae*, *C.trachomatis*, *M.genitalium*, *T.vaginalis*.

Порядок выдачи результатов исследования должен быть определен инструкцией, утвержденной руководителем медицинской организации. Результаты анализа регистрируют в лаборатории в рабочем журнале и в бланке, форма которого также утверждается руководителем медицинской организации. Бланк должен содержать название лаборатории и медицинской организации; информацию о пациенте, достаточную для его идентификации; название биологического материала и всех исследуемых показателей; дату получения и, если это необходимо, время получения образца; результаты исследования; фамилию и подпись сотрудника, выполнившего исследование.

Результат молекулярно-биологического исследования представляется как:

«ДНК (или РНК) <название возбудителя> обнаружена»

или

«ДНК (или РНК) <название возбудителя> не обнаружена».

Для постановки диагноза соответствующей инфекции врач-клиницист, направивший материал на исследование в соответствии с действующими клиническими рекомендациями и протоколами ведения больных, анализирует данные анамнеза пациента, жалобы, симптомы, данные физикального обследования, при необходимости данные других лабораторных методов исследования. При наличии данных, свидетельствующих о наличии у пациента урогенитальной инфекции, или данных эпиданамнеза, свидетельствующие о возможном риске инфицирования, при отсутствии приема лекарственных препаратов, активных в отношении этих возбудителей в период более чем за месяц до проведения данного исследования, обнаружение нуклеиновых кислот возбудителя (-ей), может интерпретироваться, как наличие инфекции, вызванной соответствующим возбудителем (-ми).

Обнаружение ДНК возбудителя(-лей) после проведенной специфической лекарственной терапии в срок до 1 месяца может быть результатом, как незавершившейся элиминации возбудителя или его ДНК, так и отсутствием ответа на проведенную терапию и продолжающуюся инфекцию.

Обнаружение ДНК возбудителя (-лей) после проведенной лекарственной терапии в срок более 1 месяца может быть результатом, как отсутствия ответа на проведенную терапию и рецидива инфекции, так и результатом повторного инфицирования.

РНК в отличие от ДНК менее стабильный в окружающей среде тип нуклеиновой кислоты, поэтому быстрее деградирует при гибели и разрушении микроорганизмов. Обнаружение РНК возбудителя (-лей) после проведенной лекарственной терапии в срок до 2 недель может быть результатом, как незавершившейся элиминации возбудителя или его РНК, так и отсутствием ответа на проведенную терапию и маркером продолжающейся инфекции.

Обнаружение РНК возбудителя (-лей) после проведенной лекарственной терапии в срок более 2 недель может быть результатом, как отсутствия ответа на проведенную терапию и рецидива инфекции. Обнаружение РНК возбудителя (-лей) после проведенной лекарственной терапии в срок более 1 месяца может быть результатом, как отсутствия ответа на проведенную терапию и рецидива инфекции, так и результатом повторного инфицирования.

5. Обеспечения качества молекулярно-биологического лабораторного исследования.

Проведение контроля качества лабораторных исследований, заключающегося в тестировании контрольных материалов (внутрилабораторный контроль качества и участие в программе внешней оценки качества) является одним из аспектов обеспечения качества. Программы обеспечения качества включают последовательный мониторинг каждого этапа молекулярно-биологического исследования. Контроль необходим на этапах сбора образца, хранения, доставки, ручной обработки, ведения регистрации, выдачи документов. Нуждается в контроле также и техническая компетентность персонала, непрерывное продолжение образования. Для успешного осуществления всех контрольных мероприятий необходимо следовать правилам, изложенным в действующих национальных стандартах [19, 20].

5.1. Ведение регистрации контрольных мероприятий.

Регистрация проведения контроля должна осуществляться на всех уровнях: преаналитическом, аналитическом и постаналитическом, для каждого этапа должны быть разработаны и документированы правила проведения всех процедур.

Для врачей-клиницистов должна быть разработана форма направления на исследование, включающая дату назначения и взятия пробы, информацию для идентификации пациента, диагноз, сведения о приеме лекарств.

Для персонала, осуществляющего взятие материала, должна быть разработана инструкция, содержащая условия подготовки пациента и процедуру взятия биоматериала. В инструкцию по доставке пробы должны быть включены условия и сроки хранения проб и правила безопасной транспортировки.

Для персонала лаборатории должны быть определены критерии для приема и отказа в приеме проб, требования по регистрации пробы, обработке, маркировке и хранению пробы до анализа.

Аналитический этап проводится в соответствии с инструкциями к наборам реагентов.

На постаналитическом этапе необходимо разработать правила оценки приемлемости результатов анализа, которые должны включать аналитическую достоверность по данным внутрилабораторного контроля качества, проверку правильности регистрации. Форма выдачи результатов должна быть утверждена в учреждении и согласована с лечебными отделениями.

Регистрация должна также охватывать контрольные материалы и оценку приборов.

5.2. Контроль качества материалов и оборудования.

Контроль за качеством материалов и оборудования включает:

- постоянное тщательное соблюдение сроков годности реактивов и наборов реагентов, что предотвращает использования испорченных или просроченных реактивов и является важной составляющей обеспечения качества;

- наличие на рабочем месте инструкции по эксплуатации каждого прибора;

- наличие журналов регистрации сервисного обслуживания и ремонта оборудования.

5.3. Внутрилабораторный контроль качества исследования.

Внутрилабораторный контроль представляет собой систему повседневного слежения за точностью получаемых в лаборатории результатов. Для этого в каждой серии (постановке) тестируются контрольные образцы: *Внутренний*, *Отрицательные* (выделения нуклеиновых кислот и амплификации), *Положительный*. Для внутри лабораторного контроля качества исследований рекомендуется использовать контрольные образцы, содержащие выявляемые организмы или их нуклеиновые кислоты, прошедшие государственную регистрацию в установленном порядке и разрешенные к применению на территории РФ (при их наличии).

Для контроля за контаминацией лаборатории продуктами амплификации необходимо проводить тестирование смывов с поверхностей лабораторного оборудования, рабочих столов, ручек дверей и т.д. не реже 1 раза в неделю [14].

5.4. Внешняя оценка качества

Внешняя оценка качества необходима для подтверждения правильности результатов лабораторных исследований и сопоставимости результатов, полученных в разных лабораториях. Каждая лаборатория обязана участвовать в программах внешней оценки качества. Специальными организациями, имеющими лицензию на проведение межлабораторной оценки качества выполнения лабораторных исследований, в том числе молекулярно-биологических исследований, между лабораториями периодически (несколько раз в год) распределяются контрольные образцы с установленным содержанием нуклеиновых кислот возбудителей ИППП для контроля правильности проводимых исследований. Полученные лабораториями результаты регистрируются, и заключения рассылаются участвующим лабораториям для сравнительной оценки правильности выполнения исследования. В случае неудовлетворительной оценки результатов лаборатория должна принимать соответствующие меры для исправления своих ошибок.

5.5. Непрерывное образование специалистов

Для обеспечения качества анализа квалификация персонала должна соответствовать нормативным требованиям. Весь персонал лаборатории должен периодически (раз в пять лет) проходить обучение на циклах усовершенствования, которые проводятся медицинскими образовательными учреждениями, имеющими соответствующую лицензию. Каждый специалист должен заниматься самообразованием. Лаборатория должна иметь доступную для пользования современную литературу, включая периодические издания по лабораторной диагностике. Специалистам лаборатории необходимо участвовать в конференциях и семинарах.

Все этапы молекулярно-биологических исследований должен выполнять только специально обученный персонал.

6. Трудозатраты на выполнение молекулярно-биологического исследования.

Вид исследования	Трудозатраты в минутах*	
	Специалиста со средним образованием	Врача клинической лабораторной диагностики, биолога
Регистрация поступившего материала	5	
Этапы молекулярно-биологического исследования		
Выделение и очистка НК		20-60
Проведение реакции амплификации		20
Регистрация, оценка, расчет,		10

интерпретация результатов		
------------------------------	--	--

* Реальный расход времени зависит от использования конкретной методики и требует подтверждения с помощью хронометража в каждом лечебном учреждении:

Приложение 1. Необходимое оборудования для проведения молекулярно-биологического исследования.

Рабочая зона 1. Прием, регистрации, разбор и первичная обработка биологического материала:

- Компьютер, подключенный к лабораторной информационной системе и дополнительное оборудование для регистрации образцов.
- Бокс биологической безопасности II или III класса биологической защиты.
- Набор автоматических пипеток переменного объема.
- Центрифуга для пробирок объемом 5-100 мл до 3 тыс. об/мин.
- Настольная центрифуга для микропробирок объемом 1.5 -2 мл, до 10000g.
- Микроцентрифуга-встряхиватель.
- Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся микропробирки объемом 1.5 мл или 2.0 мл.
- Штативы для микропробирок объемом 1.5-2.0 мл.
- Одноразовые стерильные наконечники для пипеток переменного объема с фильтрами объемом до 200 и до 1000 мкл в штативах.
- Комбинированный холодильник с камерами, поддерживающими температуру от 2 до 8⁰С и не выше минус 16⁰С.
- Емкость с регламентируемым дезинфицирующим раствором.

Емкость для сброса отработанных расходных материалов класса Б.

Рабочая зона 2. Выделение и очистка нуклеиновых кислот:

- Бокс биологической безопасности II или III класса биологической защиты.
- Твердотельный термостат для пробирок объемом 1.5 мл с диапазоном рабочих температур 25-100⁰С.
- Настольная центрифуга для микропробирок объемом 1.5 -2.0 мл, до 10000g.
- Микроцентрифуга-встряхиватель.

- Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости.
- Набор автоматических пипеток переменного объема.
- Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся микропробирки объемом 1.5-2.0 мл.
- Штативы для микропробирок объемом 1.5-2.0 мл.
- Одноразовые стерильные наконечники с фильтрами для пипеток переменного объема до 200 и до 1000 мкл в штативах.
- Комбинированный холодильник с камерами, поддерживающими температуру от 2 до 8⁰С и не выше минус 16⁰С (для хранения компонентов наборов, предназначенных для выделения нуклеиновых кислот).
- Комбинированный холодильник с камерами, поддерживающими температуру от 2 до 8⁰С и не выше минус 16⁰С (для хранения препаратов нуклеиновых кислот). *Не допускается хранение препаратов нуклеиновых кислот в одном холодильнике с компонентами набора для выделения нуклеиновых кислот!*
- Емкость с регламентированным дезинфицирующим раствором.
- Емкость для сброса отработанных расходных материалов класса Б.

Рабочая зона 3. Проведение реакции амплификации и учета ее результатов при использовании гибридационно-флуоресцентного метода детекции:

- Бокс биологической безопасности II и III класса или настольный бокс с бактерицидной лампой (ПЦР-бокс; УФ-бокс).
- Микроцентрифуга-встряхиватель.
- Набор автоматических пипеток переменного объема.
- Штативы для микропробирок объемом 0.5 и/или 0.2 мл.
- Одноразовые полипропиленовые микропробирки для ПЦР объемом 0.5 и/или 0.2 и/или 0.1 мл.
- Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с фильтром до 10 мкл, 100 мкл и 200 мкл, с маркировкой «DNase, RNase – free» в штативах.
- Программируемый термоциклер (амплификатор) и флуоресцентный ПЦР-детектор, либо Программируемый термоциклер (амплификатор) с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени».
- Компьютер с программным обеспечением, необходимым для обработки результатов детекции флуоресцентного сигнала, соединенный с флуоресцентным

ПЦР-детектором или программируемым термоциклером (амплификатором) с системой детекции сигнала в режиме «реального времени».

- Комбинированный холодильник с камерами, поддерживающими температуру от 2 до 8⁰С и не выше минус 16⁰С (для хранения наборов, предназначенных для проведения амплификации нуклеиновых кислот).
- Емкость для сброса отработанных расходных материалов класса Г.

Рабочая зона 4. Детекция и учет результатов реакции амплификации при использовании электрофоретического метода детекции.

- Камера для горизонтального электрофореза.
- Источник постоянного тока с напряжением 150 - 460 В.
- Ультрафиолетовый трансиллюминатор с кабинетом для просмотра гелей.
- Видеосистема с цифровой видеокамерой для регистрации результатов.
- Компьютер (должен быть связан через компьютерную сеть с компьютером, располагающимся в чистой зоне и предназначенным для анализа результатов электрофореза).
- Аквадистиллятор.
- Микроволновая печь или другой нагревательный прибор для плавления агарозы.
- Колба коническая из термостойкого стекла для плавления агарозы объемом 250 мл.
- Мерные цилиндры объемом 100 мл и 1000 мл.
- Столик и набор гребенок для приготовления геля.
- Штатив для микропробирок на 0,5 мл.
- Отдельная автоматическая пипетка переменного объема до 100 мкл.
- Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема до 200 мкл в штативе.
- Холодильник с камерой, поддерживающей температуру от 2 до 8⁰С (для хранения наборов электрофоретической детекции).
- Емкость с дезинфицирующим раствором для сброса отработанных расходных материалов.
- Пластиковая емкость объемом 5 л для дезактивации буфера и гелей, содержащих бромид этидия.

Возможно использование специального оборудования и наборов реагентов для автоматизации процедур первичной обработки материала, выделения нуклеиновых кислот, приготовления реакционных смесей для амплификации в соответствии с инструкциями к наборам реагентов и оборудованию.

Приложение 2. Методики получения, транспортировки и хранения образцов биологического материала для последующего молекулярно-биологического исследования для выявления ДНК/РНК *N.gonorrhoeae*, *C.trachomatis*, *M.genitalium*, *T.vaginalis*.

Получение образцов мочи

Для молекулярно-биологического исследования следует собирать первую порцию утренней мочи в количестве 20-30 мл в специальный сухой стерильный флакон.

Условия хранения материала:

Образец мочи следует доставить в лабораторию в течение 6 часов после взятия. При невозможности доставки мочи в лабораторию в указанные сроки – разрешается хранить образец при температуре 2-8°C в течение 24 часа с момента получения. Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала.

Образцов мочи, как правило, требуют предварительную обработку, направленную на концентрирование клеток микроорганизмов. Для этого взболтать флакон с мочой. Перенести 1 мл мочи в стерильную одноразовую пробирку объемом 1,5 мл, используя отдельный наконечник с фильтром для каждого образца. Центрифугировать 5 мин при 10000 g. При наличии большого количества солей ресуспендировать только верхний слой осадка солей в объеме 1 мл транспортной среды и затем снова центрифугировать. Удалить надосадочную жидкость, не захватывая осадок и используя для каждого образца отдельный наконечник. К осадку добавить транспортную среду до конечного объема 0,2 мл. Тщательно перемешать содержимое пробирки на встряхивателе. Далее полученный материал использовать для экстракции нуклеиновых кислот.

Получение образцов биоматериала из ротоглотки

Отделяемое слизистой оболочки ротоглотки следует забирать сухими стерильными ватными (вискозными, велюровыми) тампонами на пластиковой основе вращательными движениями с поверхности миндалин, небных дужек и задней стенки ротоглотки. После получения материала, не касаясь внешних поверхностей пробирок и перчаток, поместить рабочую часть зонда в пробирку с транспортной средой. Прикрывая крышкой пробирку и придерживая ей зонд, аккуратно обломить пластиковый стержень, оставив рабочую часть зонда в транспортной среде. Пробирку плотно закрыть, не допуская зазора и смятия внутренней части крышки, и промаркировать.

Условия хранения материала: согласно инструкции к рекомендуемой транспортной среде.

Получение образцов отделяемого конъюнктивы

Материал следует получать сухим стерильным ватным (вискозным, велюровым) тампоном на пластиковой основе под местной анестезией (2 капли раствора декаина). Оттянув нижнее веко, вращающими движениями провести тампон 4-5 раз по конъюнктиве, захватывая внешний и внутренний углы глаза. После получения материала, не касаясь внешних поверхностей пробирок и перчаток, поместить рабочую часть зонда в пробирку с транспортной средой. Прикрывая крышкой пробирку и придерживая ей зонд, аккуратно обломить пластиковый стержень, оставив рабочую часть зонда в транспортной среде. Пробирку плотно закрыть, не допуская зазора и смятия внутренней части крышки, и промаркировать.

Условия хранения материала: согласно инструкции к рекомендуемой транспортной среде.

Получение образцов из урогенитального тракта женщин. Получение образцов соскоба эпителия из цервикального канала.

Получение материала производить с помощью универсального зонда или цервикальной цитощетки в пробирку с транспортной средой. Допустимо присутствие примесей в виде цервикальной слизи и крови.

Удалить слизь с поверхности шейки матки отдельным стерильным тампоном, ввести рабочую часть зонда или цитощетки в цервикальный канал и несколькими вращательными движениями собрать соскобное отделяемое цервикального канала. После получения материала, не касаясь внешних поверхностей пробирок и перчаток, поместить рабочую часть зонда в пробирку с транспортной средой. Прикрывая крышкой пробирку и придерживая ей зонд, аккуратно обломить пластиковый стержень, оставив рабочую часть зонда в транспортной среде. Пробирку плотно закрыть, не допуская зазора и смятия внутренней части крышки, и промаркировать.

Условия хранения материала: согласно инструкции к рекомендуемой транспортной среде.

Получение образцов отделяемого влагалища

Получение материала следует производить с помощью универсального зонда или велюрового (вискозного) тампона на пластиковой основе в пробирку с транспортной средой.

Ввести рабочую часть зонда или тампона в область задненижнего свода влагалища и, вращая, провести по поверхности слизистой. После получения материала, не касаясь внешних поверхностей пробирок и перчаток, поместить рабочую часть зонда в пробирку с транспортной средой. Прикрывая крышкой пробирку и придерживая ей зонд, аккуратно обломить пластиковый стержень, оставив рабочую часть зонда в транспортной среде. Пробирку плотно закрыть, не допуская зазора и смятия внутренней части крышки, и промаркировать.

Условия хранения материала: согласно инструкции к транспортной среде.

Получение образцов отделяемого уретры женщин. Соскоб эпителиальных клеток из уретры женщин

Получение отделяемого уретры следует производить с помощью уретрального зонда в пробирку с транспортной средой. Допустимо присутствие примесей в виде слизи и крови.

Перед взятием соскоба из уретры необходимо обработать наружное отверстие уретры тампоном, смоченным стерильным физиологическим раствором, чтобы удалить отделяемое из влагалища. Ввести рабочую часть зонда в уретру, несколькими вращательными движениями собрать отделяемое уретры. После получения материала, не касаясь внешних поверхностей пробирок и перчаток, поместить рабочую часть зонда в пробирку с транспортной средой. Прикрывая крышкой пробирку и придерживая ей зонд, аккуратно обломить пластиковый стержень, оставив рабочую часть зонда в транспортной среде. Пробирку плотно закрыть, не допуская зазора и смятия внутренней части крышки, и промаркировать.

Условия хранения материала: согласно инструкции к рекомендуемой транспортной среде.

Получение образцов из уrogenитального тракта мужчин. Получение образцов отделяемого уретры мужчин. Соскоб эпителиальных клеток из уретры мужчин.

Получение отделяемого уретры следует производить с помощью уретрального зонда в пробирку с транспортной средой. Допустимо присутствие примесей в виде слизи и крови.

Перед взятием соскоба из уретры необходимо обработать головку полового члена в области наружного отверстия уретры отдельным тампоном, смоченным стерильным физиологическим раствором. При наличии свободно стекающих из уретры выделений удаляют их сухим тампоном. Вводят зонд в уретру на глубину 1-2 см, несколькими вращательными движениями собрать отделяемое уретры. После получения материала, не касаясь внешних поверхностей пробирок и перчаток, поместить рабочую часть зонда в пробирку с транспортной средой. Прикрывая крышкой пробирку и придерживая ей зонд, аккуратно обломить пластиковый стержень, оставив рабочую часть зонда в транспортной среде. Пробирку плотно закрыть, не допуская зазора и смятия внутренней части крышки, и промаркировать.

Условия хранения материала: согласно инструкции к рекомендуемой транспортной среде.

Получение образцов секрета предстательной железы

Перед получением секрета простаты головку полового члена обработать стерильным ватным тампоном. Секрет простаты следует собирать после предварительного массажа простаты через прямую кишку. Врач проводит массаж с надавливанием несколькими энергичными движениями от основания к верхушке. После окончания массажа предстательной

железы ее секрет в количестве 0,5-1 мл следует собрать в одноразовую стерильную сухую пробирку объемом 1,5-2,0 мл. Пробирку плотно закрыть крышкой, не допуская зазора и смятия внутренней части крышки, и промаркировать. При невозможности получить секрет – сразу после массажа простаты – следует собрать первую порцию мочи (в которой содержится секрет предстательной железы) в количестве 20-30 мл (см. правила забора мочи).

Условия хранения: Образец секрета предстательной железы следует доставить в лабораторию в течение 6 часов после взятия. При невозможности доставки в лабораторию в указанные сроки – разрешается хранить образец при температуре 2-8°C в течение 24 ч. с момента взятия. При температуре минус 20°C образец может храниться в течение 1 недели. Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

Перечисленные условия хранения и транспортировки биологического материала могут не совпадать с условиями производителя транспортных сред и/или наборов реагентов или с процедурами, принятыми в медицинской организации. В таком случае производитель транспортных сред (наборов реагентов) должен проинформировать и согласовать с медицинской организацией процедуру получения, хранения и транспортировки образцов биоматериала.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ross J., Judlin P, Jensen JS. 2012 European guideline for the management of pelvic inflammatory disease. *Int J STD AIDS* 2014 25: 1-7.
2. Street EJ, Portman MD, Kopa Z, et al., 2012 European guideline on the management of epididymo-orchitis. *IUSTI EO Guideline 2012v1 1.8.2012*
3. Клинические рекомендации по ведению больных инфекциями, передаваемыми половым путем и уrogenитальными инфекциями Российского общества дерматовенерологов и косметологов. Москва 2012.
4. Bignel C., Unemo M., 2012 European Guideline on the Diagnosis and Treatment of Gonorrhoea in Adults. (http://www.iusti.org/regions/Europe/pdf/2012/Gonorrhoea_2012.pdf).
5. Lanjouw E., Ossewaarde J.M., Stry A., et al. European Guideline for the management of Chlamydia trachomatis infection. (http://www.iusti.org/regions/Europe/pdf/2010/Euro_Guideline_Chlamydia_2010.pdf).
6. Sherrard J., Donders G., White D., 2011 European (IUSTI/WHO) Guideline on the Management of Vaginal Discharge. (http://www.iusti.org/regions/Europe/pdf/2011/Euro_Guidelines_Vaginal_Discharge_2011.Intl_Jrev.pdf).

7. Shahmanesh M., Moi H., Lassau F., 2009 European Guideline on the management of non-gonococcal urethritis. (http://www.iusti.org/regions/Europe/pdf/2009/euro_ngu_0409.pdf).
8. Порядок оказания медицинской помощи взрослому населению по профилю "дерматовенерология". Приказ Министерства здравоохранения РФ от 15 ноября 2012 г. № 924н.
9. «Об утверждении номенклатуры должностей медицинских работников и фармацевтических работников» Приказ Министерства здравоохранения РФ от 20 декабря 2012г. № 1183н.
10. Квалификационные требования к специалистам с высшим и послевузовским медицинским и фармацевтическим образованием в сфере здравоохранения. Приказ Минздравсоцразвития РФ от 7 июля 2009г. № 415.
11. "Единый квалификационный справочник должностей руководителей, специалистов и служащих, раздел "Квалификационные характеристики должностей работников в сфере здравоохранения" Приказ Минздравсоцразвития РФ от 23 июля 2010 г. N 541н.
12. «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных заболеваний». Санитарно-эпидемиологические правила СП 1.3.2322-08.
13. «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности». Методические указания МУ 1.3.2569-09.
14. ГОСТ Р 52905-2007 «Требования безопасности».
15. Федеральный закон от 4 мая 2011 г. N 99-ФЗ "О лицензировании отдельных видов деятельности".
16. СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».
17. ГОСТ Р 53022.3-2008 «Технологии лабораторные клинические. Требования к качеству клинических лабораторных исследований. Часть 3. Правила оценки клинической информативности лабораторных тестов».
18. Burd E.M. Validation of Laboratory-Developed Molecular Assays for Infectious Diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, July 2010, vol.23, №3. p 550-576.
19. ГОСТ Р 53079.1-2008 «Технологии лабораторные клинические. Обеспечение качества клинических лабораторных исследований. Часть 1. Правила описания методов исследования».
20. ГОСТ Р ИСО 15189-2009 «Лаборатории медицинские. Частные требования к качеству и компетентности».