



МІНІСТЭРСТВА
АХОВЫ ЗДАРОЎЯ
РЭСПУБЛІКІ БЕЛАРУСЬ

МИНИСТЕРСТВО
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

ЗАГАД

ПРИКАЗ

20.10.2020 № 1105

г. Мінск

г. Минск

Об утверждении Инструкции по
лабораторной диагностике сифилиса

На основании Положения о Министерстве здравоохранения Республики Беларусь, утвержденного постановлением Совета Министров Республики Беларусь от 28 октября 2011 г. № 1446, в целях совершенствования организации оказания медицинской помощи населению

ПРИКАЗЫВАЮ:

1. Утвердить Инструкцию по лабораторной диагностике сифилиса (прилагается).
2. Признать утратившим силу приказ Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 20 мая 2009 г. № 488 «Об утверждении Инструкции по лабораторной диагностике сифилиса».
3. Контроль за исполнением настоящего приказа возложить на заместителя Министра Богдан Е.Л.

Исполняющий обязанности Министра

Д.Л. Пиневиц

УТВЕРЖДЕНО
Приказ
Министерства
здравоохранения
Республики Беларусь
20.10.2020 № 1105

ИНСТРУКЦИЯ по лабораторной диагностике сифилиса

ГЛАВА 1 ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

1. Настоящая Инструкция определяет порядок лабораторной диагностики сифилиса в организациях здравоохранения Республики Беларусь.

2. На территории Республики Беларусь лабораторная диагностика сифилитической инфекции осуществляется в Республиканской референс-лаборатории по диагностике сифилиса (далее – РРЛ по диагностике сифилиса), в клиничко-диагностических и серологических лабораториях государственных и негосударственных организаций здравоохранения, осуществляющих медицинскую деятельность в порядке, установленном законодательством.

3. Данная инструкция разработана для решения следующих задач:

- определение показаний к обследованию на сифилитическую инфекцию;
- определение спектра диагностических методов, используемых для диагностики сифилитической инфекции;
- установление единых требований к порядку диагностики сифилитической инфекции.

ГЛАВА 2 ДИАГНОСТИКА СИФИЛИСА

4. Для лабораторной диагностики сифилиса применяются прямые и непрямые методы.

Прямые методы диагностики выявляют самого возбудителя или его генетический материал.

Абсолютным доказательством наличия у пациента заболевания является обнаружение *Treponema pallidum* (*T. pallidum*) в образцах, полученных из очагов поражений, при микроскопическом исследовании в

темном поле зрения и/или иммуногистохимическом исследовании с использованием моноклональных или поликлональных антител.

Прямые методы используются для диагностики ранних форм заболевания (первичный и вторичный сифилис) с клиническими проявлениями (эрозивно-язвенные элементы), а также для подтверждения врожденного сифилиса (ткань пуповины, плаценты, органы плода, отделяемое слизистой оболочки носа, содержимое пузырей, отделяемое с поверхности папул).

Непрямые (серологические) методы диагностики сифилиса позволяют выявить антитела к возбудителю сифилиса в сыворотке крови и ликворе и делятся на две группы:

Нетрепонемные тесты (далее – НТТ):

тест быстрых плазменных реагинов (Rapid Plasma Reagins) (далее – RPR);

тест Исследовательской лаборатории венерических заболеваний (Venereal Disease Research Laboratory test) (далее – VDRL).

Трепонемные тесты (далее – ТТ):

иммуноферментный анализ (далее – ИФА);

реакция пассивной гемагглютинации (далее – РПГА);

реакция иммунофлюоресценции (непрямой иммунофлюоресценции) (далее – РИФ (РНИФ), в том числе в модификациях РИФ-абс, РИФ-200, РИФ-ц);

иммуоблоттинг (исследование проводится на базе РРЛ по диагностике сифилиса на бюджетной основе, по направлениям от учреждений здравоохранения Республики Беларусь).

5. Материалами для исследования на сифилис являются сыворотка крови, спинномозговая жидкость.

6. Клинический диагноз первичного сифилиса подтверждается обнаружением *Treponema pallidum* в нативном препарате и/или положительными результатами одного трепонемного и одного нетрепонемного теста.

Клинический диагноз вторичного и скрытого раннего сифилиса подтверждается положительными результатами одного трепонемного и одного нетрепонемного теста.

Клинический диагноз позднего сифилиса подтверждается положительными результатами не менее чем в двух трепонемных тестах.

Клинический диагноз нейросифилиса подтверждается положительными результатами не менее чем двух трепонемных тестов со спинномозговой жидкостью; результатами комплексной оценки изменений ликвора, с определением степени выраженности показателей воспалительного компонента: морфологический состав (количественный и

качественный цитоз), биохимические показатели (общий белок, глобулины/альбумины), расчетные индексы и коэффициенты (альбуминовый коэффициент; IgG-коэффициент; IgG-индекс; РПГА-индекс), а также степени выраженности специфического компонента (нетрепонемный и трепонемный тесты).

ГЛАВА 3

ОБСЛЕДОВАНИЕ ПАЦИЕНТОВ НА СИФИЛИТИЧЕСКУЮ ИНФЕКЦИЮ ПРИ ОБРАЩЕНИИ ЗА МЕДИЦИНСКОЙ ПОМОЩЬЮ

7. Для обязательного клинико-лабораторного обследования на сифилитическую инфекцию в зависимости от клинической ситуации и контингентов, подлежащих обследованию, используются НТТ и ТТ в соответствии с алгоритмом согласно приложению 1.

8. При проведении диагностики сифилиса чувствительность и специфичность ТТ (ИФА, РПГА, РИФ) для диагностики сифилиса должна быть не менее 98,0%.

9. Если в инструкции по применению не введено понятие «серой зоны», то рекомендуется учитывать возможное влияние ошибок дозирования пипеткой (5%) и измерение оптической плотности спектрофотометра (5%). Таким образом, сыворотки, оптическая плотность (далее – ОП) которых после постановки ИФА отличается не более чем на 10% от ОП критического, следует признать неопределенными. Пробы с положительным и неопределенным результатами ИФА повторно тестируются не менее чем в 2-х лунках планшета независимо от инструкции производителя, предпочтительнее – на тест-системе другого производителя, а также проводится параллельное с ИФА исследование НТТ (RPR/VDRL) в качественном и количественном вариантах. Далее пациенты консультируются врачом-дерматовенерологом для решения вопроса о проведении углубленного обследования с использованием специфического подтверждающего ТТ (РПГА, РИФ-абс, РИФ-200).

10. В сомнительных или противоречивых результатах других ТТ, а также для диагностики раннего и позднего врожденного сифилиса на базе РРЛ по диагностике сифилиса проводится иммуноблоттинг.

11. Спинномозговая жидкость исследуется в день доставки ТТ (ИФА, РПГА, РИФ-ц) и НТТ (RPR / VDRL).

12. Сведения о положительных результатах вносятся в «сигнальный журнал» и подаются в опергруппу под роспись.

13. На базе РРЛ по диагностике сифилиса проводятся арбитражные исследования для учреждений и организаций здравоохранения

Республики Беларусь.

14. Учет результатов реакций, проводимых для диагностики сифилиса, осуществляет врач. При неукомплектованности центральных районных больниц (далее – ЦРБ) врачом лабораторной диагностики исследования на сифилис согласно Постановлению Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 19 февраля 2008 г. № 38 проводит и учитывает фельдшер-лаборант, прошедший стажировку на рабочем месте не менее 5 рабочих дней в централизованных серологических лабораториях.

15. Все положительные пробы подлежат хранению. Хранятся сыворотки крови в холодильнике при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ не более 7 суток. Замораживание при температуре -20°C позволяет хранить образцы в течение 1 месяца, при температуре -70°C срок хранения не лимитируется. Не допускается оттаивание и повторное замораживание образцов сыворотки крови. При необходимости хранения сыворотки крови в течение более длительного срока проводят замораживание сыворотки при разделении ее на несколько дублирующих аликвот по 0,5-1 мл в пробирки типа «Эппендорф». Для гомогенизации содержимого пробирки после оттаивания ее в обязательном порядке несколько раз перемешивают до начала исследования.

16. При выявлении положительных результатов скрининговых серологических тестов у пациентов с клинической картиной парезов, параличей, эпилептиформных припадков, невритов и других признаков поражений нервной системы, врачом-дерматовенерологом проводится консультация для назначения специфического обследования и лечения по его результатам. Пациентам определяется лечение стационарно в специализированных отделениях неврологического / психиатрического / дерматовенерологического профиля. При проведении лечения стационарно в условиях специализированных отделений неврологического (психиатрического) профиля, - лечение пациента осуществляет врач-невролог (врач-психиатр), консультирует врач-дерматовенеролог.

17. До этапа транспортировки материал должен быть сортирован в зависимости от планируемого метода (сочетания методов), которыми должно быть проведено исследование. При доставке проб в лаборатории на каждую группу методов исследования должна заполняться отдельная ведомость ф. №201/у-07 и направление ф. №222/у-07.

18. Ответственность за забор, назначение методов исследования, сортировку биоматериала, заполнение направлений и общих ведомостей, доставку биоматериала в лаборатории возлагается на направляющее учреждение.

19. Централизованные лаборатории должны осуществлять мониторинг организаций здравоохранения и организаций, осуществляющих забор биоматериала для диагностики сифилиса, а также организаций здравоохранения и организаций, осуществляющих диагностику сифилиса.

20. Централизованные серологические лаборатории (или врачи лабораторной диагностики, ответственные за работу по контролю качества в области диагностики сифилиса) должны осуществлять внешний контроль качества всех применяемых серологических реакций в лабораториях организаций здравоохранения и организаций, осуществляющих диагностику сифилиса. Внешний контроль качества серологических исследований осуществляется в соответствии с приказом Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 10 сентября 2009 г. № 873.

21. Стажировка специалистов по серодиагностике сифилиса должна осуществляться в централизованных серологических лабораториях областных и городских кожно-венерологических диспансеров не менее 5 рабочих дней.

ГЛАВА 4

ОТБОР, ТРАНСПОРТИРОВКА И ХРАНЕНИЕ ПЕРВИЧНЫХ ПРОБ ПРИ ОБСЛЕДОВАНИИ ПАЦИЕНТОВ НА СИФИЛИТИЧЕСКУЮ ИНФЕКЦИЮ

22. Отбор, транспортировка и хранение первичной пробы серозного отделяемого с поверхности эрозий, язв, мацерированных, эрозированных, изъязвленных папул, пустул производится согласно приложению 2.

23. Отбор, транспортировка и хранение первичной пробы пунктата лимфатического узла производится согласно приложению 3.

24. Отбор, транспортировка и хранение первичной пробы венозной крови производится согласно приложению 4.

25. Отбор, транспортировка и хранение первичной пробы спинномозговой жидкости производится согласно приложению 5.

ГЛАВА 5

МЕТОДИКИ, ИСПОЛЬЗУЮЩИЕСЯ В ДИАГНОСТИКЕ СИФИЛИСА

26. Для выполнения исследования на *Treponema pallidum* в темном поле зрения используется методика согласно приложению 6.

27. Для выполнения реакции быстрых плазменных реактивов*

используется методика согласно приложению 7.

28. Для выявления суммарных антител (или антител одного класса) к *Treponema pallidum* в сыворотке крови, спинномозговой жидкости методом иммуноферментного анализа* используется методика согласно приложению 8.

29. Для выявления суммарных антител (или антител одного класса) к *Treponema pallidum* методом реакции пассивной гемагглютинации* используется методика согласно приложению 9.

30. Для выявления суммарных антител к *Treponema pallidum* в сыворотке крови, спинномозговой жидкости методом непрямой иммунофлюоресценции* используется методика согласно приложению 10.

31. Для выявления антител к отдельным антигенам возбудителя сифилиса методом иммунного блоттинга с использованием рекомбинантных антигенов* используется методика согласно приложению 11.

ГЛАВА 6

ПОРЯДОК ВКЛЮЧЕНИЯ ВЫПОЛНЕННЫХ ЛАБОРАТОРИЕЙ ИССЛЕДОВАНИЙ В СТАТИСТИЧЕСКИЙ ОТЧЁТ

32. При составлении статистического отчёта о количестве выполненных исследований в лаборатории необходимо руководствоваться следующими нормами:

33.1. исследование на бледную трепонему в тёмном поле – 1 исследование;

33.2. RPR качественный вариант – 1 исследование;

33.3. RPR количественный вариант – 1 исследование;

33.4. ИФА качественный вариант – 1 исследование;

33.5. РПГА качественный вариант – 1 исследование;

33.6. РПГА количественный вариант – 1 исследование;

33.7. РИФ абс. + РИФ-200 качественный вариант – 2 исследования;

33.8. РИФ абс. + РИФ-200 количественный вариант – 2 исследования;

33.9. иммуноблоттинг (Ig G) – 1 исследование;

33.10. иммуноблоттинг (Ig M) – 1 исследование;

33.11. исследование ликвора в одной серореакции – 1 исследование (в двух – 2 исследования и т.д.);

33.12. общеклиническое исследование ликвора: цитоз – 1 исследование;

общий белок – 1 исследование;

33.13. биохимическое исследование ликвора: 1 показатель – 1 исследование.

Приложение 1
к Инструкции
по лабораторной диагностике
сифилиса

1. ИФА (или РПГА) + РИФ-абс, РИФ-200 + RPR (или VDRL)

| №п/п | Контингенты, подлежащие обследованию | Кратность |
|------|---|--|
| 1 | Лица, имевшие контакт (половой или тесный бытовой) с больным сифилисом. | Исследование проводится дважды: 1) при первичном обращении; 2) через 6 недель (при контакте с больными ранними формами сифилиса и проведенном превентивном лечении). |

2. ИФА (или РПГА) + RPR (или VDRL)

| №п/п | Контингенты, подлежащие обследованию | Кратность |
|------|---|--|
| 1 | Беременные женщины. | Исследование проводится трижды: 1) при 1-ой явке; 2) в сроке 28-30 недель беременности; 3) при поступлении в роддом. |
| 2 | Невынашивание беременности, преждевременные роды, мертворождение. | При первичном обращении. |
| 3 | Доноры крови, плазмы и других биологических жидкостей и тканей. | При каждом обращении. |
| 4 | Лица, подвергшиеся сексуальному насилию. | Исследование проводится дважды: 1) при первичном обращении; 2) через 6 недель. |
| 5 | Медицинские работники в случае контакта с биологическим материалом пациента, возникающем в результате | Исследование проводится дважды: 1) при первичном |

| | | |
|---|--|--|
| | аварийной ситуации (порез, укол и т.д.). | обращении; 2) через 6 недель. |
| 6 | Мягкий шанкр, паховый лимфогранулематоз, донованоз, эрозивно-язвенные поражения кожи и слизистых любой локализации*. | При первичном обращении. |
| 7 | Психические заболевания. | При первичном обращении и далее 1 раз в год. |
| 8 | Иностранцы граждане при оформлении вида на жительство. | При первичном обращении. |

*дополнительно проводится темнопольная микроскопия отделяемых эрозивных или язвенных дефектов кожи и слизистых оболочек (при отсутствии положительного результата исследования и отрицательных серологических реакциях – не менее 3-х раз)

3. ИФА

| | | |
|---|--|-----------------------------------|
| 1 | Поражение органов слуха (тугоухость, нарушение функций вестибулярного аппарата)*. | При первичном обращении. |
| 2 | Миокардит, аортит, аневризма аорты, приобретенные пороки сердца, воспалительные изменения паренхиматозных органов неясной этиологии*. | При первичном обращении. |
| 3 | Остеомиелиты, остеоperiоститы, синовиты*. | При первичном обращении. |
| 4 | Менингоневриты, менингиты, энцефалиты, миелиты, полирадикулоневриты, менинговаскулиты по типу ишемических и геморрагических инсультов, васкулиты спинного мозга, объемные процессы головного и спинного мозга, мононевриты, полиневриты, плекситы, клинические проявления табеса*. | При первичном обращении. |
| 5 | Носительство вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-инфекция), носительство | При первичном обращении и далее 1 |

| | | |
|----|--|---|
| | маркеров парентеральных гепатитов. | раз в год. |
| 6 | Скрининговое обследование лиц с целью выявления инфекций, передающихся половым путем, в том числе, лица с установленным диагнозом инфекций, передающихся половым путем, при анонимном обследовании*. | При первичном обращении. |
| 7 | Чесотка, педикулез (кроме детей в возрасте до 14 лет)*. | При первичном обращении. |
| 8 | Воспалительные изменения в области миндалин при одностороннем процессе, наличии на них эрозий и язв, отсутствии температуры, глоссит, ларингит, сопровождающийся дисфонией*. | При первичном обращении. |
| 9 | Геморрой, трещины заднего прохода, проктит, парапроктит*. | При первичном обращении. |
| 10 | Высыпания на коже и слизистых оболочках, сопровождающиеся лимфангитом, лимфаденитом (кроме детей в возрасте до 14 лет)*. | При первичном обращении. |
| 11 | Алопеция (кроме детей в возрасте до 14 лет)*. | При первичном обращении. |
| 12 | Температурная реакция на прием антибактериальных лекарственных средств*. | При первичном обращении. |
| 13 | Злокачественные новообразования*. | При первичном обращении. |
| 14 | Подростки, состоящие на учете в инспекции по делам несовершеннолетних. | При взятии на учет. |
| 15 | Лица из «групп риска» (мужчины, имеющие секс с мужчинами (МСМ), работники коммерческого секса)*. | При первичном обращении. |
| 16 | Женщины, направляемые на прерывание беременности или другие внутриматочные манипуляции*. | При первичном обращении. |
| 17 | Пациенты, за которыми установлено диспансерное наблюдение в наркологических диспансерах. | При взятии на учет и далее 1 раз в год. |
| 18 | Лица в возрасте от 14 лет и до 70 лет при госпитализации (кроме | При отсутствии данных достоверного |

| | | |
|----|---|---|
| | клинических показаний, указанных выше). | результата обследования за последний 1 месяц |
| 19 | Граждане при призыве в Вооруженные силы*. | При первичном обращении. |
| 20 | Лица, подлежащие обязательным и внеочередным медицинским осмотрам*. | При первичном обращении и далее в соответствии с нормативными документами Министерства здравоохранения. |

*на амбулаторном приеме

4. Иммуноблоттинг

| | | |
|---|--|--------------------------|
| 1 | Сомнительные или противоречивые результаты трепонемных тестов. | При первичном обращении. |
| 2 | Диагностика раннего и позднего врожденного сифилиса. | При первичном обращении. |

Приложение 2
к Инструкции
по лабораторной диагностике
сифилиса

Отбор первичной пробы серозного отделяемого с поверхности эрозий, язв, мацерированных, эрозированных, изъязвленных папул, пустул

| | |
|--|---|
| Наименование процедуры | Отбор первичной пробы серозного отделяемого с поверхности эрозий, язв, мацерированных, эрозированных, изъязвленных папул, пустул. |
| Требования к специалистам (кто участвует в выполнении процедуры) | Специалист, имеющий высшее медицинское образование по специальностям: 1-79 01 01 «Лечебное дело», 1-79 01 02 «Педиатрия», 1-79 01 03 «Медико-профилактическое дело», 1-79 01 04 «Медико-диагностическое дело». |
| Требования к обеспечению безопасности труда медицинского персонала | В соответствии с требованиями нормативных документов. |
| Приборы, инструменты, изделия медицинского назначения, необходимые для процедуры | <ol style="list-style-type: none"> 1. Стерильные марлевые салфетки. 2. Медицинские перчатки. 3. Ложки Фолькмана. 4. Пинцет. 5. Лоток. 6. Предметные стекла. 7. Покровные стекла. 8. Бактериологическая петля. 9. Стерильный физиологический раствор. 10. Маркер. 11. Манипуляционный столик. 12. Кушетка, гинекологическое кресло. 13. Одноразовый гинекологический набор. 14. Антисептики, разрешенные к применению Министерством здравоохранения. |
| Методика выполнения процедуры | <p>I. Подготовка к процедуре.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Объяснить пациенту ход и цель процедуры; убедиться в наличии у пациента информированного согласия на предстоящую процедуру. 2. Оформить бланк направления для лабораторного исследования. |

| | |
|--|--|
| | <p>3. Промаркировать предметное стекло, предназначенное для взятия биологического материала.</p> <p>4. Провести гигиеническую антисептическую обработку рук.</p> <p>5. Надеть медицинские перчатки.</p> <p>6. Обеспечить свободный доступ к язвенному дефекту.</p> <p>7. Тщательно и осторожно очистить поверхность дефекта кожи или слизистой с помощью марлевой салфетки, смоченной стерильным физиологическим раствором, не травмируя поверхность.</p> <p>II. Выполнение процедуры.</p> <p>1. Метод раздражения. Стерильной ложкой Фолькмана провести осторожные (исключая повреждение сосудов), поглаживающие движения по поверхности элемента. Через 10-60 секунд на поверхности элемента образуется прозрачная, слегка опалесцирующая тканевая жидкость. В случае появления кровотечения его следует остановить, прижав ватный тампон к поверхности элемента, после чего продолжить поглаживания. Полученное серозное отделяемое смешать на предметном стекле с равным количеством физиологического раствора, накрыть покровным стеклом и полученный нативный препарат исследовать под микроскопом.</p> <p>2. Метод сдавливания. После очистки сдавить края эрозии/язвы пальцами или пинцетом, стимулируя выделение серозного экссудата. Собрать экссудат с поверхности бактериологической петлей, браншей пинцета или путем аккуратного прикладывания к поверхности эрозии/язвы стерильного предметного стекла. Полученное отделяемое смешать на предметном стекле с равным количеством физиологического раствора, накрыть покровным стеклом и полученный нативный препарат исследовать под микроскопом.</p> <p>3. Метод скарификации. Используется при исследовании сухих элементов (розеолы, папулы, эпителизированные эрозии).</p> |
|--|--|

| | |
|--|--|
| | <p>Поверхность исследуемого элемента скарифицировать. Остановить появляющееся капиллярное кровотечение и методом раздражения скарифицированной поверхности получить серозную жидкость. Полученное отделяемое смешать на предметном стекле с равным количеством физиологического раствора, накрыть покровным стеклом и полученный нативный препарат исследовать под микроскопом.</p> <p>Первичная проба хранению не подлежит.</p> <p>III. Окончание процедуры.</p> <ol style="list-style-type: none">1. Подвергнуть дезинфекции расходный материал.2. Снять перчатки, поместить их в емкость для дезинфекции.3. Провести гигиеническую антисептическую обработку рук. <p>В случае получения отрицательного результата при первичном исследовании назначить пациенту примочки с физиологическим раствором, после чего отбор пробы повторить через 24 часа.</p> |
|--|--|

Приложение 3
к Инструкции
по лабораторной диагностике
сифилиса

Отбор первичной пробы пунктата лимфатического узла

| | |
|--|--|
| Наименование процедуры | Отбор первичной пробы пунктата лимфатического узла. |
| Требования к специалистам (кто участвует в выполнении процедуры) | Специалист, имеющий высшее медицинское образование по специальностям: 1-79 01 01 «Лечебное дело», 1-79 01 02 «Педиатрия». |
| Требования к обеспечению безопасности труда медицинского персонала | В соответствии с требованиями нормативных документов. |
| Приборы, инструменты, изделия медицинского назначения, необходимые для процедуры | <ol style="list-style-type: none"> 1. Стерильные марлевые салфетки, ватные шарики. 2. Медицинские перчатки. 3. Стерильный пинцет. 4. Стерильные пеленки. 5. Лоток. 6. Шприц одноразовый объёмом 20 мл. 7. Шприц одноразовый объёмом 2 мл. 8. Тонкая игла с наружным диаметром 0,6-0,7 мм. 9. Антисептики, разрешенные к применению Министерством здравоохранения. 10. Лейкопластырь. 11. Пробирка типа Эппендорф. 12. Маркер. 13. Манипуляционный столик. 14. Кушетка. |
| Методика выполнения процедуры | <ol style="list-style-type: none"> I. Подготовка к процедуре. <ol style="list-style-type: none"> 1. Объяснить пациенту ход и цель процедуры; убедиться в наличии у пациента информированного согласия на предстоящую процедуру. 2. Оформить бланк направления для лабораторного исследования. 3. Промаркировать пробирку, предназначенную для |

- первичной пробы пунктата лимфатического узла.
4. Провести гигиеническую антисептическую обработку рук.
 5. Надеть медицинские перчатки.
- II. Выполнение процедуры.
1. Пропальпировать плотный, подвижный лимфатический узел без признаков воспаления.
 2. Провести антисептическую последовательную обработку операционного поля над лимфатическим узлом антисептиком.
 3. Набрать в одноразовый шприц объёмом 2 мл раствор анестетика.
 4. Ввести раствор антисептика внутривожно до образования «лимонной корочки».
 5. Набрать в одноразовый шприц объёмом 20 мл стерильный физиологический раствор – 1 мл.
 6. Зафиксировать лимфатический узел между двумя пальцами левой руки.
 7. Правой рукой ввести в узел иглу, соединённую со шприцем, в котором находится 1 мл стерильного физиологического раствора комнатной температуры. Прокол произвести у одного из полюсов лимфатического узла и проталкивать иглу по направлению длинной оси до противоположного полюса, нагнетая при этом содержащийся в шприце физиологический раствор в узел.
 8. Медленно вывести иглу из узла, одновременно оттягивая поршень шприца на себя.
 9. Последовательно обработать операционное поле антисептиком.
 10. Наложить стерильную салфетку на место прокола, зафиксировать ее лейкопластырем.
- III. Окончание процедуры.
1. Полученную первичную пробу пунктата лимфатического узла поместить в подготовленную маркированную пробирку типа Эппендорф и немедленно доставить в лабораторию.
 2. Подвергнуть дезинфекции расходный материал.
 3. Снять перчатки, поместить их в емкость для дезинфекции.
 4. Провести гигиеническую антисептическую

| | |
|--|----------------|
| | обработку рук. |
|--|----------------|

Приложение 4
к Инструкции
по лабораторной диагностике
сифилиса

Отбор первичной пробы венозной крови

| | |
|--|--|
| Наименование процедуры | Отбор первичной пробы венозной крови. |
| Требования к специалистам (кто участвует в выполнении процедуры) | Специалист, имеющий среднее медицинское образование по специальностям: 2-79 01 31 «Сестринское дело», 2-79 01 01 «Лечебное дело». Специалист, имеющий высшее медицинское образование по специальностям: 1-79 01 01 «Лечебное дело», 1-79 01 02 «Педиатрия». |
| Требования к обеспечению безопасности труда медицинского персонала | В соответствии с требованиями нормативных документов. |
| Приборы, инструменты, изделия медицинского назначения, необходимые для процедуры | <ol style="list-style-type: none"> 1. Одноразовый шприц или вакутайнер. 2. Пробирка одноразовая с покрытием для быстрого образования сыворотки. 3. Медицинские перчатки. 4. Жгут. 5. Стерильные ватные шарики. 6. Маркер. 7. Полуавтоматический дозатор переменного объема. 8. Наконечники одноразовые к дозатору. 9. Манипуляционный столик. 10. Антисептики, разрешенные к применению Министерством здравоохранения. |
| Методика выполнения процедуры | <p>I. Подготовка к процедуре.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Объяснить пациенту ход и цель процедуры; убедиться в наличии у пациента информированного согласия на предстоящую процедуру. 2. Для лабораторного исследования оформить бланк направления (ф.№222/у-07), ведомость (ф. №201-у-07). 3. Промаркировать пробирку, предназначенную для |

| | |
|--|--|
| | <p>отбора первичной пробы, в соответствии с требованиями лаборатории, где будет проводиться исследование.</p> <ol style="list-style-type: none">4. Провести гигиеническую антисептическую обработку рук.5. Надеть медицинские перчатки. <p>II. Выполнение процедуры*.</p> <ol style="list-style-type: none">1. Наложить жгут проксимальнее места венепункции.2. Пропальпировать вену перед дезинфекцией места венепункции.3. Очистить кожу антисептиком.4. Дать коже высохнуть.5. Провести венепункцию и взятие крови в объеме не менее 5 мл.6. Извлечь иглу из вены, обработать место антисептиком.7. Место венепункции прижать сухим стерильным ватным тампоном.8. Кровь из шприца внести в маркированную пробирку, выпуская по стенке пробирки медленно, не допуская вспенивания и разбрызгивания.9. Закрыть пробирку плотно прилегающей резиновой или пластиковой пробкой.10. Процедура взятия крови с помощью вакуумных систем:<ol style="list-style-type: none">10.1. Взять иглу и снять защитный колпачок со стороны, закрытой резиновой мембраной.10.2. Вставить иглу в держатель и завинтить до упора. Подготовить необходимую пробирку (с активатором свертывания (красная крышка), с активатором свертывания +гель (желтая крышка)).10.3. Снять защитный колпачок со второй стороны иглы, вставить выбранную пробирку крышкой в держатель.10.4. Не прокалывая резиновую заглушку в крышке пробирки, ввести систему «держатель-игла» в вену пациента, как это делается при обычной процедуре взятия крови шприцем.10.5. Провести венепункцию и взятие крови в объеме не менее 5 мл.10.6. Извлечь иглу из вены, обработать место |
|--|--|

| | |
|--|---|
| | <p>антисептиком.</p> <p>10.7. Место венепункции прижать сухим стерильным ватным тампоном.</p> <p>III. Окончание процедуры.</p> <ol style="list-style-type: none">1. Поместить пробирку в термоконтэйнер для транспортировки, исключить возможность ее опрокидывания. Направления поместить отдельно от пробирок.2. Подвергнуть дезинфекции расходный материал.3. Снять перчатки, поместить их в ёмкость для дезинфекции.4. Провести гигиеническую антисептическую обработку рук.5. Транспортировку первичных проб в лабораторию произвести в течение 24 часов в специально предназначенных для этого и промаркированных термоконтэйнерах, оборудованных хладагентами (для поддержания температуры +2- 8°C).6. При необходимости сохранения пробы от 2 до 24 часов в процедурном кабинете пробирки с первичными пробами поместить в холодильник при температуре +2-8°C.7. При необходимости сохранения первичной пробы свыше 24 провести отделение сыворотки от сгустка: первичный образец поместить в термостат при температуре +37°C на 20-30 минут, затем в холодильник при температуре +2-8°C, на 20-30 минут, затем пробирки подвергнуть центрифугированию при 1000-1500 об/мин в течение 10 минут. Отделившуюся сыворотку перенести в сухую чистую пробирку, предварительно маркированную в соответствии с маркировкой первичной пробы. Для данной манипуляции использовать отдельный наконечник дозатора для каждой пробы. При использовании вакутайнера дополнительная обработка первичной пробы не проводится.8. Пробирку с остатками первичной пробы подвергнуть утилизации в соответствии с требованиями нормативных документов. |
|--|---|

*у новорожденных детей и детей грудного возраста отбор первичной

пробы венозной крови может быть проведен из родничковой или пяточной вены

Приложение 5
к Инструкции
по лабораторной диагностике
сифилиса

Отбор первичной пробы спинномозговой жидкости

| | |
|--|---|
| Наименование процедуры | Отбор первичной пробы спинномозговой жидкости (далее – СМЖ). |
| Требования к специалистам (кто участвует в выполнении процедуры) | Врач-невролог, врач-нейрохирург, врач-анестезиолог-реаниматолог, врач-инфекционист, врач-дерматовенеролог и другие врачи-специалисты, прошедшие специальную подготовку. |
| Требования к обеспечению безопасности труда медицинского персонала | В соответствии с требованиями нормативных документов. |
| Приборы, инструменты, изделия медицинского назначения, необходимые для процедуры | <ol style="list-style-type: none"> 1. Стерильные салфетки и ватные шарики. 2. Медицинские перчатки. 3. Стерильный пинцет или пластиковые (деревянные) палочки. 4. Стерильные пленки. 5. Лоток. 6. Одноразовый шприц объемом 2-5 мл. 7. Манипуляционный столик. 8. Одноразовые иглы с мандренами для проведения люмбальной пункции, диаметр 0,5-0,6 мм, длина 8-12 см. 9. Лейкопластырь. 10. Две пробирки объемом 10 мл с плотно прилегающей резиновой или пластиковой пробкой. 11. Маркер. 12. Антисептики, разрешенные к применению Министерством здравоохранения. |
| Методика выполнения процедуры | <p>I. Подготовка к процедуре.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Объяснить пациенту ход и цель процедуры; убедиться в наличии у пациента письменного информированного согласия на предстоящую процедуру. |

| | |
|--|--|
| | <ol style="list-style-type: none">2. Оформить бланк направления для лабораторного исследования.3. Промаркировать пробирки, предназначенные для взятия спинномозговой жидкости.4. Провести гигиеническую антисептическую обработку рук.5. Надеть медицинские перчатки. <p>II. Выполнение процедуры.</p> <ol style="list-style-type: none">1. Провести антисептическую последовательную обработку операционного поля антисептиком, осушить его.2. Набрать в одноразовый шприц объёмом 2-5 мл раствор анестетика.3. Ввести раствор антисептика внутривожно до образования «лимонной корочки»4. Ввести пункционную иглу с мандреном в область L4-L5, L3-L4.5. По достижении субарахноидального пространства извлечь мандрен и самотеком набрать по 2,0-3,0 мл спинномозговой жидкости в каждую из двух плотно закрываемых пробирок.6. Вставить мандрен в иглу, вывести иглу.7. Последовательно обработать операционное поле антисептиком.8. Наложить стерильную салфетку на место прокола, зафиксировать ее лейкопластырем. <p>III. Окончание процедуры.</p> <ol style="list-style-type: none">1. Пробы поместить в специальный контейнер для транспортировки, исключив возможность опрокидывания, и доставить в лабораторию для исследования в течение 15 минут (для определения цитоза немедленно). Транспортировку для серологических исследований спинномозговой жидкости допустимо проводить в течение 2 часов, при температуре +2-8°C. Направления поместить отдельно от пробирок.2. В случае проведения процедуры в манипуляционной доставить больного под контролем среднего медицинского персонала в палату. |
|--|--|

| | |
|--|--|
| | <ol style="list-style-type: none">3. Подвергнуть дезинфекции расходный материал.4. Снять перчатки, поместить их в емкость для дезинфекции.5. Провести гигиеническую антисептическую обработку рук. |
|--|--|

Приложение 6
к Инструкции
по лабораторной диагностике
сифилиса

Методика исследования на *Treponema pallidum* в темном поле зрения

| | |
|--|---|
| Наименование метода | Исследование на <i>Treponema pallidum</i> в темном поле зрения. |
| Принцип метода | Визуальная оценка отраженного свечения <i>Treponema pallidum</i> на темном поле при боковом освещении. |
| Биологический материал для исследования | Серозное отделяемое с поверхности эрозий, язв, мацерированных, эрозированных, изъязвленных папул или пустул. Пунктат лимфатического узла. |
| Условия транспортировки проб | Исследование пробы проводят сразу после ее взятия. |
| Подготовка проб к исследованию | См. приложение 3 к настоящей Инструкции «Отбор, транспортировка и хранение первичных проб при обследовании пациентов на сифилитическую инфекцию» |
| Оборудование, инструменты и материалы, необходимые для процедуры | <ol style="list-style-type: none"> 1. Световой микроскоп, снабженный конденсором темного поля с окуляром 10-12× и объективом 40×. 2. Источник света мощностью не менее 200 Вт. 3. Дистиллированная вода. 4. Пипетка или дозатор для нанесения воды. 5. Предметное стекло. 6. Покровное стекло. 7. Лоток. 8. Дезинфицирующие средства, разрешенные к применению Министерством здравоохранения. 9. Пинцет. |
| Подготовка к проведению анализа | <p>Исследование пробы проводят сразу после ее взятия.</p> <p>Подготовка микроскопа:</p> <ul style="list-style-type: none"> – на верхнюю линзу темнопольного конденсора нанести каплю дистиллированной воды или каплю масла для микроскопии; – поместить препарат на столик микроскопа; – поднять конденсор, избегая образования пузырьков; |

| | |
|--------------------------|---|
| | – включить источник света. |
| Процедура анализа | Провести оценку не менее десяти полей зрения. |
| Учет и оценка результата | <p>В темном поле определяются:</p> <ul style="list-style-type: none"> - нейтрофильные лейкоциты – в виде округлых, ярко светящихся зернистых образований; - лейкоциты – серовато-темные, тускло светящиеся клетки округлой формы; - клетки эпителия – круглые или неправильной формы клетки, значительно крупнее лейкоцитов и ярко светящиеся; - эритроциты – в виде темных элементов круглой формы, окаймленных светящейся полоской; - микроорганизмы, обладающие определенными морфологическими характеристиками и характерными движениями. <p>Во время исследования проводится дифференциальная диагностика морфологических признаков <i>Tr. pallidum</i> с <i>Tr. refringers</i>, <i>Tr. phagedenis</i>, <i>Tr. denticola</i>, <i>Tr. microdentium</i>, <i>Tr. buccalis</i>, <i>Tr. vincenti</i>.</p> <p>Характеристика <i>Tr. pallidum</i>:</p> <ul style="list-style-type: none"> - тонкая спираль, длиной 6-20 мкм, толщиной 0,13-0,15 мкм, с равномерными 10-13 (6-20) завитками, с характерными сгибательными, маятнокообразными, вращательными и плавными поступательными движениями. <p>Характеристика <i>Tr. refringers</i>:</p> <ul style="list-style-type: none"> - спираль длиной 5-8 мкм, толщиной 0,2-0,3 мкм, с 2-3 завитками, с быстрыми поступательными, очень быстрыми вращательными, выраженными волнообразными движениями, отсутствием сгибательных и маятнокообразных движений. <p>Характеристика <i>Tr. phagedenis</i>:</p> <ul style="list-style-type: none"> - спираль длиной 10-12 мкм, толщиной 0,2-0,25 мкм, с 10-12 (10-30) завитками, с медленными свободными, с резкими толчками поступательными движениями, внезапно переходящими от медленных к быстрым вращениям на месте, колебательными движениями с резкими толчками отсутствием сгибательных и маятнокообразных движений. |

| | |
|------------------------|---|
| | <p>Характеристика <i>Tr. denticola</i>:</p> <ul style="list-style-type: none"> - спираль длиной 8 (6-16) мкм, толщиной 0,15-0,2 мкм, с 6-8 (6-16) завитками, с медленными свободными поступательными, с резкими толчками, мягкими, крутящимися, колебательными движениями отсутствием сгибательных и маятнокообразных движений. <p>Характеристика <i>Tr. microdentium</i>:</p> <ul style="list-style-type: none"> - спираль длиной 5-10 мкм, толщиной 0,2-0,3 мкм (короче и толще бледной трепонемы), сильнее преломляет свет, имеет заостренные завитки, перемещается медленнее без сгибательных движений. <p>Характеристика <i>Tr. buccalis</i>:</p> <ul style="list-style-type: none"> - спираль имеет от 3 до 10 широких неравномерных завитков, сильно преломляет свет, активно двигается. <p>Характеристика <i>Tr. vincenti</i>:</p> <ul style="list-style-type: none"> - спираль с 2-3 плоскими неравномерными завитками, тонкая и нежная, движется активно, хаотично, ярко светится. <p>Образцы заключения: «<i>Tr. pallidum</i> обнаружена» и «<i>Tr. pallidum</i> не обнаружена».</p> |
| Контроль качества | <p>На преаналитическом этапе оцениваются:</p> <ul style="list-style-type: none"> - взятие первичной пробы; - правильность маркировки первичной пробы; - исправность микроскопа; - соответствие показателей внешней среды: температуры воздуха, влажности, освещенности рабочего места тем условиям, которые необходимы для проведения исследования. <p>На аналитическом этапе оцениваются:</p> <ul style="list-style-type: none"> - выполнение методики исследования в соответствии с инструкцией. <p>На постаналитическом этапе оцениваются:</p> <ul style="list-style-type: none"> - правильность внесения результатов в бланк исследования; - своевременное доведение информации до врача, назначившего исследование. |
| Безопасность персонала | В соответствии с требованиями нормативных документов. |

Приложение 7
к Инструкции
по лабораторной диагностике
сифилиса

Методика выполнения реакции быстрых плазменных реагинов

| | |
|---|--|
| Наименование метода | Реакция быстрых плазменных реагинов (RPR). |
| Принцип метода | Образование комплекса «антиген-антитело», имеющего вид флоккулята черного цвета, при взаимодействии сыворотки, СМЖ больного сифилисом и суспензии кардиолипинового антигена с древесным углем. |
| Биологический материал для исследования | Нативная сыворотка крови. Спинномозговая жидкость (СМЖ). |
| Условия транспортировки и хранения проб | <p>Пробирки с кровью, сывороткой транспортируются в лабораторию в специальном закрытом контейнере при температуре +2-8°C. При невозможности немедленной доставки пробы хранятся в холодильнике при температуре +2-8°C не более 24 часов. СМЖ – в течение 2 часов доставляется в лабораторию.</p> <p>В лаборатории первичные пробы исследуются в течение 24 часов.</p> <p>Все положительные пробы подлежат хранению. Хранятся сыворотки крови в холодильнике при температуре +2-8°C, не более 7 суток. Замораживание при температуре -20°C позволяет хранить образцы в течение 1 месяца, при температуре -70°C срок хранения не лимитируется. Не допускается оттаивание и повторное замораживание образцов сыворотки крови. При необходимости хранения сыворотки крови в течение более длительного срока проводят замораживание сыворотки при разделении ее на несколько дублирующих аликвот по 0,5-1 мл. в пробирки типа Эппендорф. Для гомогенизации содержимого пробирки после оттаивания ее в обязательном порядке несколько раз перемешивают до начала исследования.</p> |

| | |
|---|--|
| <p>Подготовка проб к исследованию</p> | <p>Образцы крови помещают в термостат при +37°C на 15-30 минут или оставляют при комнатной температуре для образования сгустка фибрина, затем помещают в холодильник при +2-8°C на 30 минут, после чего пробирки с венозной кровью подвергают центрифугированию в течение 10 минут при скорости вращения ротора 1000-1500 оборотов в минуту. Сыворотка переносится в другую пробирку для последующего тестирования. Оттаивание сыворотки крови для проведения исследования производят при комнатной температуре или при температуре +2-8°C бытового холодильника. Перед выполнением исследования после оттаивания для гомогенизации содержимого пробирки его несколько раз тщательно перемешивают.</p> <p>Перед проведением исследования образцы сыворотки могут быть инактивированы при +56°C в течение 30 минут или исследоваться без предварительной инаktivации (согласно инструкции производителя).</p> <p>Подготовка проб СМЖ не проводится.</p> |
| <p>Оборудование, инструменты и материалы, необходимые для процедуры</p> | <ol style="list-style-type: none"> 1. Набор для RPR. 2. Дозаторы пипеточные переменного объема, позволяющие отбирать 50 мкл, 16 мкл жидкости. 3. Наконечники для дозатора универсальные. 4. Пластиковые палочки, если они не входят в состав набора. 5. Маркер. 6. Пробирки (стеклянные или одноразовые). 7. Орбитальный шейкер. 8. Центрифуга с горизонтальным ротором, развивающая ускорение 1000-3000 оборотов в минуту. 9. Перекись водорода. 10. Контейнеры для сбора твердых и жидких отходов. 11. Средства индивидуальной защиты персонала. 12. Дезинфицирующие растворы, разрешенные к применению Министерством здравоохранения. |
| <p>Реагенты</p> | <p>Набор для RPR: - готовая к применению суспензия</p> |

| | |
|--|---|
| | <p>кардиолипидного антигена, сорбированного на мелкодисперсных частицах угля;</p> <ul style="list-style-type: none"> - положительная контрольная сыворотка (стабилизированная инактивированной сывороткой крови человека); - отрицательная контрольная сыворотка (стабилизированная инактивированной сывороткой крови человека); - картонные или пластиковые карточки с выдавленными неглубокими 18-мм лунками для проведения в них реакции; - диспенсор со съемной иглой для дозированного раскапывания суспензии антигена; - пластиковые палочки для распределения пробы по поверхности карточки. |
| <p>Подготовка к проведению анализа</p> | <p>Перед использованием компоненты набора выдержать при температуре +18-27С° в течение 30 минут.</p> <p>Произвести маркировку карточки предназначенной для выполнения исследования.</p> <p>Ампулу (флакон) с кардиолипидным антигеном тщательно встряхнуть, при необходимости перелить содержимое в диспенсер, надеть дозирующую иглу.</p> |
| <p>Процедура анализа</p> | <p>Качественный вариант:</p> <ul style="list-style-type: none"> - пипеточным дозатором набрать по 50 мкл контрольных и испытуемых проб сыворотки, спинномозговой жидкости и внести в соответствующую лунку карточки; - этим же наконечником или индивидуальной пластиковой палочкой распределить образец биологического материала внутри очерченной зоны лунки; - наконечник и палочку сбросить в ёмкость с дезинфицирующим раствором; - в каждую лунку добавить по одной капле (или по 16 мкл) хорошо ресуспензированного кардиолипидного антигена; - для перемешивания содержимого лунок использовать орбитальный шейкер. Карточку поместить на платформу орбитального шейкера |

| | |
|--------------------------|---|
| | <p>(ротора) для постоянного перемешивания содержимого лунок в течение 8 минут при скорости вращения 150 оборотов в минуту;</p> <ul style="list-style-type: none"> - через 8 минут приступить к учету результатов реакции. <p>Количественный вариант:</p> <ul style="list-style-type: none"> - в количественном варианте исследуются все пробы, показавшие при скрининге положительные или слабopоложительные результаты; - в лунки карточки со 2-ой по 5-ую (для проб со слабopоложительным результатом качественного исследования) или 10-ую внести по 50 мкл свежеприготовленного изотонического раствора натрия хлорида; - в первую и вторую лунки карточки внести по 50 мкл исследуемого образца биологического материала; - многократным пипетированием во второй лунке перемешать содержимое, стараясь избежать образования пены; - перенести 50 мкл полученного разведения (1:2) в третью лунку; - данную операцию повторять последовательно во всех лунках карточки, из последней лунки 50 мкл удалить в емкость с дезинфицирующим раствором (получают серию разведений: от цельного биологического материала к 1:2, 1:4, ... до 1:16 (5 лунка) или до 1:512 (10 лунка)); - во все лунки карточки добавить по 16 мкл хорошо ресуспензированной суспензии кардиолипинового антигена, поместить планшет для постоянного перемешивания на горизонтальную площадку орбитального шейкера на 8 минут. |
| Учет и оценка результата | <p>Карточку расположить на столе или держать в руках и слегка покачивать, учет результатов проводится визуально (для более четкой регистрации разрешается применять лупу двукратного увеличения).</p> <p>Провести оценку результатов с положительным и отрицательным контролями. При несоответствии результатов исследования контролей заявленным</p> |

| | |
|-------------------|---|
| | <p>производителем набора, результаты исследования аналитической серии регистрации не подлежат, тест провести заново.</p> <p>Критерием позитивности является образование в исследуемой реакционной смеси частиц флоккулята различной величины и просветления реакционной среды:</p> <ul style="list-style-type: none"> - крупные и средней величины агрегаты угольных частиц черного цвета располагаются по всему объему лунки, имеют тенденцию к расположению ближе к периферической части лунки, реакционная среда практически полностью прозрачная – результат «положительный»; - редкие и мелкие агрегаты угольных частиц, хлопья преципитата распределены по периферии реакционной лунки, реакционная среда имеет гомогенную структуру – результат «слабоположительный»; - видимые агрегаты угольных частиц в пробе отсутствуют, реакционная среда гомогенной структуры либо частицы угля собираются в центральной части лунки, формируя пятно черного цвета – результат «отрицательный». <p>Учет результатов количественного варианта производят по стандартной методике. Титром антител считают последнее разведение, показавшее положительный результат при RPR тестировании.</p> <p>Если производителем предусмотрена оценка позитивности по системе плюсов «+», необходимо следовать инструкции производителя, предварительно уведомив лечащего врача о порядке учета и интерпретации результатов исследования.</p> <p>Использованные карточки хранению не подлежат. После учета карточки подлежат утилизации в соответствии с требованиями нормативных документов.</p> |
| Контроль качества | <p>На преаналитическом этапе оцениваются:</p> <ul style="list-style-type: none"> - взятие биологического материала в соответствии с требованиями; - выполнение требований хранения и доставки материала в лабораторию; |

| | |
|------------------------|--|
| | <ul style="list-style-type: none"> - выполнение требований маркировки проб и соответствия маркировки пробы маркировке направления; - качество биологического материала (запрещается тестирование гемолизированных, гиперлипидемичных (хилезных), гипербилирубинемичных (желтушных) образцов); - контроль диагностикума (внешнее состояние, срок годности), условия и сроки хранения; - соответствие показателей внешней среды: температура воздуха, влажность; - качество лабораторной посуды. <p>На аналитическом этапе оцениваются:</p> <ul style="list-style-type: none"> - включение официально зарегистрированных контрольных материалов с различным уровнем активности (отрицательные, положительные, слабоположительные сыворотки); - соблюдение температурного режима и времени инактивирования образца; - исполнение методики постановки в соответствии с инструкцией производителя; - учет результатов с контрольным материалом и испытуемым образцом в соответствии с официально признанными критериями. <p>На постаналитическом этапе оцениваются:</p> <ul style="list-style-type: none"> - правильность внесения результатов в бланк исследования; - своевременное доведение информации до врача, назначившего исследование. |
| Безопасность персонала | В соответствии с требованиями нормативных документов. |

*описана типовая процедура. Если в инструкции производителя указаны иные требования к отбору, хранению и транспортировке проб, процедуре анализа и учёту результатов, то необходимо следовать инструкции производителя (исключение: для перемешивания содержимого лунок, при постановке RPR теста, использовать орбитальный шейкер независимо от инструкции производителя)

Приложение 8
к Инструкции
по лабораторной диагностике
сифилиса

Методика выявления суммарных антител (или антител одного класса) к *Treponema pallidum* в сыворотке крови, спинномозговой жидкости методом иммуноферментного анализа

| | |
|---|--|
| Наименование метода | Выявление суммарных антител (или антител одного класса) к <i>Treponema pallidum</i> в сыворотке крови, спинномозговой жидкости методом иммуноферментного анализа. |
| Принцип метода | Образование комплекса антиген-антитело на твердофазном носителе в присутствии конъюгата, меченного ферментом, хромогена, изменение рН и окрашивания реагентной смеси, интенсивность которого пропорциональна концентрации антител. |
| Биологический материал для исследования | Нативная сыворотка крови. Спинномозговая жидкость (СМЖ). |
| Условия транспортировки проб | <p>Пробирки с кровью, сывороткой транспортируются в лабораторию в специальном закрытом контейнере при температуре +2-8°C. При невозможности немедленной доставки, пробы хранятся в холодильнике при температуре +2-8°C не более 24 часов. СМЖ в течение 2 часов доставляется в лабораторию.</p> <p>В лаборатории первичные пробы исследуются в течение 24 часов.</p> <p>Все положительные пробы подлежат хранению. Хранятся сыворотки крови в холодильнике при температуре +2-8°C, не более 7 суток. Замораживание при температуре -20°C позволяет хранить образцы в течение 1 месяца, при температуре -70°C срок хранения не лимитируется. Не допускается оттаивание и повторное замораживание образцов сыворотки крови. При необходимости хранения сыворотки крови в течение более длительного срока проводят замораживание сыворотки при разделении ее на несколько дублирующих аликвот по 0,5-1 мл в пробирки типа</p> |

| | |
|--|---|
| | Эппендорф. Для гомогенизации содержимого пробирки после оттаивания ее в обязательном порядке несколько раз перемешивают до начала исследования. |
| Подготовка проб к исследованию | Образцы крови помещают в термостат при +37°C на 15-30 минут или оставляют при комнатной температуре для образования сгустка фибрина, затем помещают в холодильник при +2-8°C на 30 минут, после чего пробирки с венозной кровью подвергают центрифугированию в течение 10 минут при скорости вращения ротора 1000-1500 оборотов в минуту. Сыворотка переносится в другую пробирку для последующего тестирования. Оттаивание сыворотки крови для проведения исследования производят при комнатной температуре или при температуре + 2-8°C бытового холодильника. Перед выполнением исследования после оттаивания для гомогенизации содержимого пробирки его несколько раз тщательно перемешивают. Подготовка проб СМЖ не проводится. |
| Оборудование, инструменты и материалы, необходимые для процедуры | <ol style="list-style-type: none"> 1. Набор реактивов для проведения иммуноферментного анализа. 2. Фотометр для измерения оптической плотности. 3. Полу- или автоматическое устройство для промывания планшет. 4. Пипетки одноканальные автоматические. 5. Пипетки автоматические многоканальные. 6. Наконечники для автоматических пипеток разного объема. 7. Термостат суховоздушный. 8. Мерные цилиндры. 9. Ванночки для реагентов или чашки Петри. 10. Крышка для планшета или клейкая лента. 11. Маркер. 12. Вата медицинская гигроскопическая. 13. Бумага фильтровальная. 14. Спирт этиловый 70% для обработки дозаторов, рабочих поверхностей. 15. Перекись водорода. 16. Контейнеры для сбора твердых и жидких отходов. |

| | |
|--|---|
| | <p>17. Средства индивидуальной защиты персонала.</p> |
| <p>Реагенты</p> | <p>Набор реактивов для проведения иммуноферментного анализа:</p> <ul style="list-style-type: none"> – иммуносорбент: рекомбинантные антигены <i>Treponema pallidum</i> (ультразвученный, рекомбинантный, полипептидный); – инактивированный положительный контрольный образец; – инактивированный отрицательный контрольный образец; – конъюгат: смесь рекомбинантных белков <i>Treponema pallidum</i> и моноклональных антител, конъюгированных с пероксидазой хрена; – субстрат; – концентрат фосфатно-солевого буферного раствора; – разводящий буферный раствор для сывороток; – разводящий буферный раствор для конъюгата; – буферный раствор для субстрата; – стоп-реагент. |
| <p>Подготовка к проведению анализа</p> | <p>Перед использованием компоненты набора выдержать при температуре +18-27°C в течение 30 минут.</p> <p>В случае выпадения кристаллов во флаконах с реагентами прогреть их при температуре +37±1°C до полного растворения кристаллов, после чего флаконы интенсивно встряхнуть.</p> <p>Освободить от упаковочного пакета, необходимое для анализа количество стрипов и закрепить их в рамках. Неиспользованные стрипы хранить в плотно закрытом пакете при температуре +2-8°C в течение срока, указанного производителем.</p> <p>Разведение концентратов производить в соответствии с требованиями инструкции по проведению анализа.</p> <p>Перед внесением проб планшет промыть соответствующим раствором с помощью автоматического устройства или 8-канальной автоматической пипетки, если этого требует инструкция производителя.</p> <p>Провести разметку планшета и внести</p> |

| | |
|--------------------------|--|
| | соответствующую нумерацию в протокол исследования. |
| Процедура анализа | <p>В лунки планшета внести раствор для разведения сыворотки в количестве, указанном производителем. Внести контрольные и испытуемые образцы в соответствии с разметкой планшета.</p> <p>Каждый образец после внесения пипетировать до изменения цвета разводящего раствора, если это предусмотрено инструкцией. Планшет закрыть крышкой (заклеить лентой) и инкубировать при +37°C в течение периода времени, указанного в инструкции.</p> <p>Удалить реагентную смесь и промыть планшет раствором для промывания в соответствии с инструкцией производителя, остатки влаги удалить.</p> <p>Во все лунки внести конъюгат в рабочем разведении. Планшет закрыть крышкой (заклеить лентой) и инкубировать при +37°C в течение периода времени, указанного производителем.</p> <p>Удалить реагентную смесь и промыть планшет раствором для промывания, остатки влаги удалить.</p> <p>В каждую лунку внести субстрат. Инкубировать при комнатной температуре (+20-25°C) в защищенном от света месте в течение периода времени, указанного производителем.</p> <p>Остановить реакцию путем внесения в каждую лунку стоп-раствора.</p> |
| Учет и оценка результата | <p>Проводится после остановки реакции на спектрофотометре со светофильтром с длиной волны, указанной производителем. Выведение спектрофотометра на нулевой уровень осуществляется по воздуху.</p> <p>Критерии приемлемости результатов:</p> <ul style="list-style-type: none"> - значения оптической плотности (ОП) в лунках с контролем конъюгата и отрицательным контролем не превышают указанного в паспорте; - значения ОП в лунках с положительным контролем не ниже указанного в паспорте. <p>Для учёта результатов применяется формула:</p> $ОП_{крит} = ОП_{ср. (К-)} + k,$ <p>где ОП_{крит} – граничное значение ОП,</p> |

| | |
|-------------------|---|
| | <p>ОП_{ср.} (К-) – среднее арифметическое значение ОП отрицательных контрольных проб, k – коэффициент, указанный производителем. Проба считается положительной, если её ОП превышает расчетное значение ОП_{крит.}. Проба считается отрицательной, если её значение ниже ОП_{крит.}. Значение ОП, которое находится в промежутке ОП_{крит.} ±10% считается неопределенным (серая зона). Проба с положительным и неопределенным результатами повторно тестируется не менее чем в 2-х лунках, предпочтительнее – на тест-системе другого производителя. Образцы заключений: 1. результат ИФА положительный; 2. результат ИФА отрицательный; 3. результат ИФА неопределённый.</p> |
| Контроль качества | <p>На преаналитическом этапе оцениваются:</p> <ul style="list-style-type: none"> - взятие биологического материала в соответствии с требованиями; - выполнение требований хранения и доставки материала в лабораторию; - выполнение требований маркировки проб и соответствия маркировки пробы маркировке направления; - качество биологического материала (запрещается тестирование гемолизированных, гиперлипидемичных (хилезных), гипербилирубинемичных (желтушных) образцов); - контроль диагностикума (внешнее состояние, срок годности), условия и сроки хранения; - соответствие показателей внешней среды – температура воздуха, влажность; - качество дистиллированной воды на соответствие требованиям производителя набора; - качество лабораторной посуды; - правильность установки лабораторной мебели (отсутствие в непосредственной близости источников вибрации, угол наклона лабораторного стола не более 5°). <p>На аналитическом этапе оцениваются:</p> |

| | |
|------------------------|---|
| | <ul style="list-style-type: none"> - включение официально зарегистрированных контрольных материалов с различным уровнем активности (отрицательные, положительные); - исполнение методики постановки в соответствии с инструкцией производителя; - внесение пробы и реагентов в центр лунки, не касаясь дна и краев; - качество промывки планшетов: необходимо заполнять лунки в объеме не менее, чем 300 мкл раствора, избегать переполнения и перетекания жидкости в соседние лунки, тщательно осушить лунки после каждого этапа промывки. <p>На постаналитическом этапе оцениваются:</p> <ul style="list-style-type: none"> -правильность внесения результатов в бланк исследования; -своевременное доведение информации до врача, назначившего исследование. |
| Безопасность персонала | В соответствии с требованиями нормативных документов. |

*описана типовая процедура. Если в инструкции производителя указаны иные требования к отбору, хранению и транспортировке проб, процедуре анализа и учёту результатов, то необходимо следовать инструкции производителя

Приложение 9
к Инструкции
по лабораторной диагностике
сифилиса

Методика выявления суммарных антител (или антител одного класса) к
Treponema pallidum методом реакции пассивной гемагглютинации

| | |
|---|--|
| Наименование метода | Реакция пассивной гемагглютинации (РПГА, ТРРА, ТРНА). |
| Принцип метода | Взаимодействие антител и антигенов <i>Treponema pallidum</i> , конъюгированных с эритроцитами животных, завершается образованием агглютинатов. |
| Биологический материал для исследования | Нативная сыворотка крови. Спинномозговая жидкость (СМЖ). |
| Условия транспортировки и хранения проб | <p>Пробирки с кровью, сывороткой транспортируются в лабораторию в специальном закрытом контейнере при температуре +2-8°C. При невозможности немедленной доставки пробы хранятся в холодильнике при температуре +2-8°C не более 24 часов. СМЖ в течение 2 часов доставляется в лабораторию.</p> <p>В лаборатории первичные пробы исследуются в течение 24 часов.</p> <p>Все положительные пробы подлежат хранению. Хранятся сыворотки крови в холодильнике при температуре +2-8°C, не более 7 суток. Замораживание при температуре -20°C позволяет хранить образцы в течение 1 месяца, при температуре -70°C срок хранения не лимитируется. Не допускается оттаивание и повторное замораживание образцов сыворотки крови. При необходимости хранения сыворотки крови в течение более длительного срока проводят замораживание сыворотки при разделении ее на несколько дублирующих аликвот по 0,5-1 мл. в пробирки типа Эппендорф. Для гомогенизации содержимого пробирки после оттаивания ее в обязательном порядке несколько раз перемешивают до начала исследования.</p> |
| Подготовка проб к | Образцы крови помещают в термостат при +37°C на |

| | |
|--|--|
| исследованию | <p>15-30 минут или оставляют при комнатной температуре для образования сгустка фибрина, затем помещают в холодильник при +2-8°C на 30 минут, после чего пробирки с венозной кровью подвергают центрифугированию в течение 10 минут при скорости вращения ротора 1000-1500 оборотов в минуту. Сыворотка переносится в другую пробирку для последующего тестирования. Оттаивание сыворотки крови для проведения исследования производят при комнатной температуре или при температуре +2-8°C бытового холодильника. Перед выполнением исследования после оттаивания для гомогенизации содержимого пробирки его несколько раз тщательно перемешивают.</p> <p>Подготовка проб СМЖ не проводится.</p> |
| Оборудование, инструменты и материалы, необходимые для процедуры | <ol style="list-style-type: none"> 1. Набор для РПГА. 2. Дозаторы пипеточные переменного объема, позволяющие отбирать 100 мкл, 90 мкл, 80 мкл, 20 мкл, 10 мкл жидкости. 3. Наконечники для дозатора универсальные. 4. Пробирки (стеклянные или одноразовые). 5. Планшеты иммунологические с U-образным дном. 6. Центрифуга с горизонтальным ротором, развивающая ускорение 1000-3000 оборотов в минуту. 7. Перекись водорода. 8. Контейнеры для сбора твердых и жидких отходов. 9. Маркер. 10. Средства индивидуальной защиты персонала. 11. Дезинфицирующие растворы, разрешенные к применению Министерством здравоохранения. 12. Оборудование для автоматизированного учета результатов. |
| Реагенты | <p>Набор для РПГА:</p> <p>– тест-эритроциты – эритроциты животных, сенсibilизированные антигеном <i>Treponema pallidum</i> (вместо эритроцитов животных производителем могут использоваться частицы латекса);</p> |

| | |
|---------------------------------|--|
| | <ul style="list-style-type: none"> – контрольные эритроциты; – буферный раствор для разведения проб; – раствор для разведения эритроцитов; – положительный и отрицательный контроли; – мерные дозирующие пипетки для тест-эритроцитов и контрольных эритроцитов; – иммунологические планшеты с 96 лунками для постановки реакции (в состав набора могут не включаться). |
| Подготовка к проведению анализа | <p>Перед использованием компоненты набора выдержать при температуре +18-27С в течение 30 минут.</p> <p>Провести маркировку планшета:</p> <ul style="list-style-type: none"> – ряды 1, 2, 7, 8 – предварительное разведение проб; – ряды 3, 9 – проведение реакции с контрольными эритроцитами; – ряды 4, 10 – проведение реакции с тест-эритроцитами; – ряд 12 – контрольные пробы. <p>Вскрыть флаконы с контрольными и тест-эритроцитами и развести их указанным в инструкции количеством раствора для разведения. Тщательно перемешать плавными покачивающими движениями для обеспечения равномерной взвеси.</p> |
| Процедура анализа | <p>Качественный вариант:</p> <ul style="list-style-type: none"> - внести в лунки планшета требуемое в инструкции количество буферного раствора для разведения проб; - провести разведение контрольных и исследуемых проб в соответствии с инструкцией; - внести контрольные и тест-эритроциты в соответствующие ряды; - перемешать реагентную смесь путем аккуратного постукивания в течение 30 секунд или на шейкере; - планшет накрыть крышкой, оставить при комнатной температуре в неподвижном состоянии, учет результатов произвести через 60 минут. <p>Количественный вариант (исследуются все пробы, показавшие при скрининге положительные или слабоположительные результаты):</p> <ul style="list-style-type: none"> - в лунки планшета со 2-й по 10-ю внести требуемое |

| | |
|---------------------------------|---|
| | <p>инструкцией производителя количество раствора для разведения сыворотки;</p> <ul style="list-style-type: none"> - в 1-ю и 2-ю лунки планшета внести исследуемую пробу в количестве, предусмотренном инструкцией; - многократным пипетированием во 2-ой лунке перемешать содержимое, стараясь избежать образования пены; - перенести требуемое количество полученного разведения последовательно во все лунки; - во все лунки планшета добавить тест-эритроциты в количестве, предусмотренном инструкцией производителя; - перемешать реагентную смесь путем аккуратного постукивания в течение 30 секунд или на шейкере; - планшет накрыть крышкой, оставить при комнатной температуре в неподвижном состоянии, учет результатов производят через 60 минут. |
| <p>Учет и оценка результата</p> | <p>При автоматизированном учете результатов реакции необходимо следовать инструкции производителя прибора автоматизированного учёта.</p> <p>При визуальном учете: учесть результаты положительного и отрицательного контролей. При несоответствии результатов критериям, заявленным производителем набора, тестирование проводится повторно.</p> <p>Критерием оценки результатов РПГА является форма и характер осадка эритроцитов на дне лунок иммунологического планшета:</p> <ul style="list-style-type: none"> - эритроциты располагаются ровным слоем по всему дну лунки, высокое содержание специфических антител в пробе – результат «резко положительный»; - эритроциты располагаются на большей части дна лунки, при этом по периферии осадка формируется заметное кольцо из осадка эритроцитов – результат «положительный»; - эритроциты располагаются на небольшой части дна лунки, в центральной части формируется плотное кольцо из осадка эритроцитов с заметным просветлением в центральной части – результат «слабоположительный»; |

| | |
|-------------------|---|
| | <p>- компактный осадок в центральной части дна лунки на чистом окружающем фоне – результат «отрицательный».</p> <p>Если производителем предусмотрена оценка позитивности по системе плюсов «+», необходимо следовать инструкции производителя, предварительно уведомив лечащего врача о порядке учета и интерпретации результатов исследования.</p> |
| Контроль качества | <p>На преаналитическом этапе оцениваются:</p> <ul style="list-style-type: none"> - взятие биологического материала в соответствии с требованиями; - выполнение требований хранения и доставки материала в лабораторию; - выполнение требований маркировки проб и соответствия маркировки пробы маркировке направления; - качество биологического материала (запрещается тестирование гемолизированных, гиперлипидемичных (хилезных), гипербилирубинемичных (желтушных) образцов); - контроль диагностикума (внешнее состояние, срок годности), условия и сроки хранения; - соответствие показателей внешней среды – температура воздуха, влажность; - качество лабораторной посуды; - правильность установки лабораторной мебели (отсутствие в непосредственной близости источников вибрации, угол наклона лабораторного стола не более 5°). <p>На аналитическом этапе оцениваются:</p> <ul style="list-style-type: none"> - включение официально зарегистрированных контрольных материалов с различным уровнем активности (отрицательные, положительные); - выполнение методики постановки в соответствии с инструкцией производителя. <p>На постаналитическом этапе оценивается:</p> <ul style="list-style-type: none"> - правильность внесения результатов в бланк исследования; - своевременное доведение информации до врача, назначившего исследование. |
| Безопасность | В соответствии с требованиями нормативных |

| | |
|-----------|-------------|
| персонала | документов. |
|-----------|-------------|

*описана типовая процедура. Если в инструкции производителя указаны иные требования к отбору, хранению и транспортировке проб, процедуре анализа и учёту результатов, то необходимо следовать инструкции производителя

Приложение 10
к Инструкции
по лабораторной диагностике
сифилиса

Методика выявления суммарных антител к *Treponema pallidum* в сыворотке крови, спинномозговой жидкости методом непрямой иммунофлюоресценции

| | |
|---|--|
| Наименование метода | Выявление суммарных антител к <i>Treponema pallidum</i> в сыворотке крови, спинномозговой жидкости методом непрямой иммунофлюоресценции (РИФ-абс, РИФ-200, РИФ-ц). |
| Принцип метода | Выявление комплекса антиген-антитело с помощью иммуноглобулинов диагностических флюоресцирующих антивидовых против иммуноглобулинов человека. |
| Биологический материал для исследования | Нативная сыворотка крови. Спинномозговая жидкость. |
| Условия транспортировки проб | <p>Пробирки с кровью, сывороткой транспортируются в лабораторию в специальном закрытом контейнере при температуре +2-8°C. При невозможности немедленной доставки, пробы хранятся в холодильнике при температуре +2-8°C не более 24 часов. СМЖ в течение 2 часов доставляется в лабораторию.</p> <p>В лаборатории первичные пробы исследуются в течение 24 часов.</p> <p>Все положительные пробы подлежат хранению. Хранятся сыворотки крови в холодильнике при температуре +2-8°C, не более 7 суток. Замораживание при температуре -20°C позволяет хранить образцы в течение 1 месяца, при температуре -70°C срок хранения не лимитируется. Не допускается оттаивание и повторное замораживание образцов сыворотки крови. При необходимости хранения сыворотки крови в течение более длительного срока производят замораживание сыворотки при разделении ее на несколько дублирующих аликвот по 0,5-1 мл в пробирки типа</p> |

| | |
|---|--|
| | <p>Эппендорф. Для гомогенизации содержимого пробирки после оттаивания ее в обязательном порядке несколько раз перемешивают до начала исследования.</p> |
| <p>Подготовка проб к исследованию</p> | <p>Образцы крови помещают в термостат при +37°C на 15-30 минут или оставляют при комнатной температуре для образования сгустка фибрина, затем помещают в холодильник при +2-8°C на 30 минут, после чего пробирки с венозной кровью подвергают центрифугированию в течение 10 минут при скорости вращения ротора 1000-1500 оборотов в минуту. Сыворотка переносится в другую пробирку для последующего тестирования. Оттаивание сыворотки крови для проведения исследования производят при комнатной температуре или при температуре +2-8°C бытового холодильника. Для гомогенизации содержимого пробирки после оттаивания его несколько раз тщательно перемешивают перед выполнением исследования. Подготовка проб СМЖ не проводится.</p> |
| <p>Оборудование, инструменты и материалы, необходимые для процедуры</p> | <ol style="list-style-type: none"> 1. Набор для реакции непрямой иммунофлюоресценции. 2. Микроскоп люминисцентный с ртутно- кварцевой лампой, иммерсионной системой, окуляром 4× или 5×, фильтрами СЗС-7 или СЗС- 14; ФС-1; БС-8. 3. Пипетки одноканальные автоматические. 4. Пипетки автоматические многоканальные. 5. Наконечники для автоматических пипеток разного объема. 6. Термостат суховоздушный. 7. Центрифуга. 8. Влажная камера. 9. Мерные цилиндры. 10. Емкости для промывки стекол. 11. Нефлуоресцирующее иммерсионное масло (диметилфталат). 12. Маркер. 13. Вата медицинская гигроскопическая. 14. Бумага фильтровальная. 15. Спирт этиловый 96%, 70% (для обработки оптических частей микроскопа (объектив, окуляр), |

| | |
|---------------------------------|--|
| | <p>для обезжиривания предметных стекл. для обработки дозаторов).</p> <p>16. Перекись водорода.</p> <p>17. Контейнеры для сбора твердых и жидких отходов.</p> <p>18. Средства индивидуальной защиты персонала.</p> |
| Реагенты | <p>Набор для реакции непрямой иммунофлюоресценции:</p> <ul style="list-style-type: none"> – стекло предметное с фиксированным инактивированным антигеном <i>Treponema pallidum</i>; – положительный контрольный образец; – слабоположительный контрольный образец; – отрицательный контрольный образец; – конъюгат: антитела к иммуноглобулинам человека, меченные флюорохромом; – сорбент: лиофилизированный экстракт из культуры <i>Treponema pallidum</i>, дезинтегрированных ультразвуком; – концентрат фосфатного буферного раствора; – физиологический раствор. |
| Подготовка к проведению анализа | <p>Необходимое количество предметных стекол с антигеном выдержать при температуре +18-27°C в течение 30 минут; стекла с антигеном без упаковки хранению не подлежат.</p> <p>Концентрат фосфатного буферного раствора тщательно взболтать, в случае выпадения кристаллов, прогреть при температуре +37±1°C до полного растворения кристаллов, после чего флаконы интенсивно встряхнуть.</p> <p>Содержимое флакона развести дистиллированной водой в соответствии с инструкцией производителя.</p> <p>Приготовить предварительное и рабочее разведения сорбента в соответствии с инструкцией.</p> <p>Приготовить предварительное и рабочее разведения конъюгата в соответствии с инструкцией. Рабочее разведение конъюгата разведению не подлежит.</p> <p>Контрольные образцы и инактивированные исследуемые пробы развести:</p> <ul style="list-style-type: none"> для РИФ-200 – буферным раствором в 200 раз; для РИФаbc – сорбентом в рабочем разведении в 5 раз; |

| | |
|-------------------|--|
| Процедура анализа | <p>для РИФц – использовать неразведенную СМЖ.</p> <p>Нанести исследуемые пробы на антиген, фиксированный на стекле, равномерно покрывая препарат. Избегать касания наконечником поверхности стекла.</p> <p>Поместить препарат во влажную камеру, инкубировать при температуре $+37\pm 1^\circ\text{C}$ в течение 30 минут.</p> <p>Препараты промыть в соответствии с инструкцией производителя.</p> <p>Высушить в термостате при температуре $+37\pm 1^\circ\text{C}$ в течение 20-25 минут до полного высыхания.</p> <p>На препарат нанести раствор конъюгата в рабочем разведении, поместить во влажную камеру при температуре $+37\pm 1^\circ\text{C}$ в течение 30 минут.</p> <p>Препарат отмыть в новой порции отмывающего раствора в соответствии с инструкцией производителя. Высушить в термостате при температуре $+37\pm 1^\circ\text{C}$ в течение 20-25 минут до полного высыхания.</p> <p>Готовые препараты необходимо предохранять от воздействия света.</p> <p>Исследование препарата проводить сразу после окончания реакции, нанеся на поверхности одну каплю нефлюоресцирующего иммерсионного масла. Если инструкция предусматривает отклонение от описанной процедуры анализа, необходимо следовать инструкции производителя.</p> <p>Количественный вариант (исследуются все пробы, показавшие положительные результаты): в чистых, сухих пробирках приготовить последовательные разведения пробы от 1:5 до 1:2560 (при необходимости и более): в 10 пробирок внести по 80 мкл сорбента в рабочем разведении; в 1-ю пробирку добавить 20 мкл сыворотки крови, из первой пробирки после тщательного перемешивания перенести 20 мкл во вторую; повторить процедуру последовательно до 10-ой пробирки; 20 мкл из 10-й пробирки удалить в дезинфицирующий раствор.</p> <p>Процедуру анализа повторить в отношении каждого разведения в соответствии описанной выше.</p> |
|-------------------|--|

| | |
|---------------------------------|---|
| | <p>При постановке количественного варианта по РИФ-200 сыворотка крови разводится буферным раствором от 1:200 до 1:51200 (при необходимости и более).</p> |
| <p>Учет и оценка результата</p> | <p>Учет результатов реакции осуществлять путем оценки интенсивности свечения <i>Treponema pallidum</i> под воздействием ультрафиолетового света в люминисцентном микроскопе.</p> <p>Критерии приемлемости результатов:</p> <ul style="list-style-type: none"> – положительный контрольный образец дает свечение 4+; – слабоположительный контрольный образец дает свечение 2+; – отрицательный контрольный образец не дает свечения. <p>Проба считается положительной, если препарат дает блестящее зелено-желтое свечение (4+), яркое зелено-желтое свечение (3+).</p> <p>Проба считается слабоположительной, если свечение бледно-зеленого цвета.</p> <p>Отрицательными считаются образцы, если трепонемы окрашены незначительно интенсивнее фона или не дают свечения вообще.</p> |
| <p>Контроль качества</p> | <p>На преаналитическом этапе оцениваются:</p> <ul style="list-style-type: none"> - взятие биологического материала в соответствии с требованиями; - выполнение требований хранения и доставки материала в лабораторию; - выполнение требований маркировки пробы соответствия маркировки пробы маркировке направления; - качество биологического материала (запрещается тестирование гемолизированных, гиперлипидемичных (хилезных), гипербилирубинемичных (желтушных) образцов); - контроль диагностикума (внешнее состояние, срок годности), условия и сроки хранения; - соответствие показателей внешней среды – температура воздуха, влажность; - качество лабораторной посуды; - правильность установки лабораторной мебели |

| | |
|------------------------|--|
| | <p>(отсутствие в непосредственной близости источников вибрации, угол наклона лабораторного стола не более 5°).</p> <p>На аналитическом этапе оцениваются:</p> <ul style="list-style-type: none"> - включение официально зарегистрированных контрольных материалов с различным уровнем активности (отрицательные, положительные, слабоположительные); - исполнение методики постановки в соответствии с инструкцией производителя; - качество промывки стекол соответствует инструкции производителя; - использование для учета реакции нефлюоресцирующего иммерсионного масла и предусмотренных производителем светофильтров; - учет результатов с контрольным материалом и испытуемым образцом в соответствии с официально признанными критериями. <p>На постаналитическом этапе оцениваются:</p> <ul style="list-style-type: none"> - правильность внесения результатов в бланк исследования; - своевременное доведение информации до врача, назначившего исследование. |
| Безопасность персонала | В соответствии с требованиями нормативных документов. |

*описана типовая процедура. Если в инструкции производителя указаны иные требования к отбору, хранению и транспортировке проб, процедуре анализа и учёту результатов, то необходимо следовать инструкции производителя

Приложение 11
к Инструкции
по лабораторной диагностике
сифилиса

Методика выявления антител к отдельным антигенам возбудителя
сифилиса методом иммунного блоттинга с использованием
рекомбинантных антигенов

| | |
|---|--|
| Наименование метода | Выявление антител классов G, M к <i>Treponema pallidum</i> в сыворотке крови, СМЖ методом линейного иммуноблоттинга. |
| Принцип метода | При наличии в исследуемом образце антител к <i>Treponema pallidum</i> они связываются с антигенами иммуносорбента, образовавшиеся комплексы антиген-антитело связываются с конъюгатом-козьими антителами к Ig G или Ig M человека, мечеными щелочной фосфатазой, и выявляются по цветной реакции с хромогеном. |
| Биологический материал для исследования | Нативная сыворотка крови. Спинномозговая жидкость (СМЖ). |
| Условия транспортировки проб | <p>Пробирки с кровью, сывороткой транспортируются в лабораторию в специальном закрытом контейнере при температуре +2-8°C. При невозможности немедленной доставки, пробы хранятся в холодильнике при температуре +2-8°C не более 24 часов. СМЖ в течение 2 часов доставляется в лабораторию.</p> <p>В лаборатории первичные пробы исследуются в течение 24 часов.</p> <p>Все положительные пробы подлежат хранению. Хранятся сыворотки крови в холодильнике при температуре +2-8°C, не более 7 суток. Замораживание при температуре -20°C позволяет хранить образцы в течение 1 месяца, при температуре -70°C срок хранения не лимитируется. Не допускается оттаивание и повторное замораживание образцов сыворотки крови. При необходимости хранения сыворотки крови в течение более длительного срока проводят замораживание сыворотки при разделении ее на несколько дублирующих аликвот по 0,5-1 мл в пробирки типа</p> |

| | |
|--|---|
| | Эппендорф. Для гомогенизации содержимого пробирки после оттаивания ее в обязательном порядке несколько раз перемешивают до начала исследования. |
| Подготовка проб к исследованию | Образцы крови помещают в термостат при +37°C на 15-30 минут или оставляют при комнатной температуре для образования сгустка фибрина, затем помещают в холодильник при +2-8°C на 30 минут, после чего пробирки с венозной кровью подвергают центрифугированию в течение 10 минут при скорости вращения ротора 1000-1500 оборотов в минуту. Сыворотка переносится в другую пробирку для последующего тестирования. Оттаивание сыворотки крови для проведения исследования производят при комнатной температуре или при температуре +2-8°C бытового холодильника. Перед выполнением исследования после оттаивания для гомогенизации содержимого пробирки его несколько раз тщательно перемешивают. Подготовка проб СМЖ не проводится. |
| Оборудование, инструменты и материалы, необходимые для процедуры | <ol style="list-style-type: none"> 1. Набор реактивов для проведения иммунного блоттинга. 2. Дозаторы пипеточные для внесения реагентов, ручные или автоматические промыватели, или восьми - и двенадцатиканальные пипеточные дозаторы для промывания лунок планшета. 3. Наконечники для дозаторов разного объема. 4. Орбитальный шейкер 5. Бумага фильтровальная. 6. Спирт этиловый 70% для обработки дозаторов, рабочих поверхностей. 7. Перекись водорода. 8. Контейнеры для сбора твердых и жидких отходов. 9. Средства индивидуальной защиты персонала. |
| Реагенты | <ol style="list-style-type: none"> 1. Иммуносорбент. 2. Контрольный положительный образец. 3. Контрольный отрицательный образец. 4. Конъюгат. 5. Раствор для разведения образцов (РРО). 6. Концентрат промывочного раствора. |

| | |
|---------------------------------|--|
| | <p>7. Субстратный раствор.</p> <p>8. Сорбент.</p> <p>9. Референс-стрип.</p> |
| Подготовка к проведению анализа | <p>Перед использованием компоненты набора выдержать при температуре +18-25°C в течение 30 минут.</p> <p>Приготовить (при необходимости) рабочие растворы согласно инструкции производителя.</p> |
| Процедура анализа | <ol style="list-style-type: none"> 1. В канавки планшета со стрипами внести по 1 мл РРО, выдержать 3-5 мин. При встряхивании на шейкере при скорости качания платформы 30-40 об/мин при температуре от 18 до 25°C. 2. Отдельными наконечниками внести по 20 мкл контрольных образцов или по 40 мкл супернатанта (в зависимости от комплектации набора). 3. Заклеить занятые дорожки клейкой пленкой или закрыть крышкой. Поместить планшет на шейкер. Инкубировать 2 ч на шейкере при температуре от 18 до 25°C. 4. После инкубации удалить жидкость из канавок планшета, используя дозатор. 5. Промыть каждый стрип 4 раза рабочим промывочным раствором, внося в канавку по 2 мл раствора. При первой промывке раствор удалить из лунки, как указано в п.4. При последующих трех промывках после внесения промывочного раствора выдерживать планшет по 5 мин на шейкере. Удаление промывочного раствора проводить в соответствии с п.4. 6. Во все использованные канавки планшета внести по 1,0 мл конъюгата. 7. Инкубировать в течение 30 мин при температуре от 18 до 25°C на шейкере. 8. После инкубации удалить жидкость из канавок планшета в соответствии с п.4. Промыть стрипы, в соответствии с п.5. 9. Внести во все использованные канавки по 1,0 мл субстратного раствора. Инкубировать 15 мин или 10 мин (в зависимости от комплектации набора) на шейкере в защищенном от света месте при температуре от 18 до 25°C до появления на стрипе |

| | |
|--------------------------|---|
| | <p>окрашенных линий.</p> <p>10. Для остановки реакции удалить субстратный раствор в соответствии с п.4. Промыть стрипы 4 раза, внося в канавки по 2 мл воды очищенной и выдерживая планшет по 1 мин на шейкере. Воду удалять в соответствии с п.4.</p> <p>11. Поместить стрипы между двумя листами фильтровальной бумаги маркированной стороной вверх и выдержать в защищенном от света месте до полного высыхания, после чего сразу же зарегистрировать результаты.</p> |
| Учет и оценка результата | <p>Регистрацию результатов проводить визуально, сравнивая интенсивность окраски антигенных линий с интенсивностью окраски контрольных линий:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Окрашивание отсутствует или менее интенсивно, чем «0,5+» - отрицательная оценка; 2. Интенсивность окрашивания равна «0,5+» - 0,5 оценка; 3. Интенсивность окрашивания выше «0,5+», но ниже или равна «1+» - 1+ оценка; 4. Интенсивность окрашивания выше «1+», но ниже чем «3+» - 2+ оценка; 5. Интенсивность окрашивания равна «3+» - 3+ оценка; 6. Интенсивность окрашивания выше, чем «3+» - 4+ оценка; <p>Результаты, полученные на стрипах с исследуемыми образцами, учитывать только при соблюдении следующих условий:</p> <ul style="list-style-type: none"> -контрольная линия внесения образца окрашена; -контрольная линия специфичности не окрашена; -хорошо различимы контрольные линии интенсивности окрашивания с четкой их дифференциацией. <p>Если данные условия не соблюдаются, исследование необходимо повторить.</p> <p>Для оптимального учета результатов проявленные стрипы рекомендуется прикреплять к протоколу так, чтобы контрольные линии интенсивности 3+ у всех стрипов и соответствующая линия на рисунке протокола были на одном уровне. В этом случае</p> |

| | |
|-------------------|--|
| | <p>проявленные антигенные линии будут находиться на уровне линий соответствующих антигенов на рисунке протокола. Для закрепления стрипов на протоколе можно использовать полосы из защитной пленки для планшет, которыми комплектуется набор. При соблюдении вышеперечисленных условий интерпретировать результаты, полученные на стрипах с исследуемыми образцами, используя следующие данные:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) нет окрашенных линий или есть только одна линия с интенсивностью окрашивания, равной «0,5+» - отрицательный результат; 2) есть только одна линия с интенсивностью окрашивания «1+» - неопределенный результат; 3) есть не менее двух линий с интенсивностью окрашивания «0,5+» - положительный результат. <p>При получении неопределенного результата рекомендуется провести повторное исследование; если в нем вновь будет получен неопределенный результат, рекомендуется взятие крови через 3-4 недели с проведением нового исследования на выявление антител к антигенам <i>Treponema pallidum</i>.</p> |
| Контроль качества | <p>На преаналитическом этапе оцениваются:</p> <ul style="list-style-type: none"> - взятие биологического материала в соответствии с требованиями; - выполнение требований хранения и доставки материала в лабораторию; - выполнение требований маркировки проб и соответствия маркировки пробы маркировке направления; - качество биологического материала (запрещается тестирование гемолизированных, гиперлипидемичных (хилезных), гипербилирубинемичных (желтушных) образцов); - контроль диагностикума (внешнее состояние, срок годности), условия и сроки хранения; - соответствие показателей внешней среды – температура воздуха, влажность; - качество дистиллированной воды на соответствие требованиям производителя набора; - качество лабораторной посуды; |

| | |
|------------------------|---|
| | <p>- правильность установки лабораторной мебели (отсутствие в непосредственной близости источников вибрации, угол наклона лабораторного стола не более 5°).</p> <p>На аналитическом этапе оцениваются:</p> <ul style="list-style-type: none"> - включение официально зарегистрированных контрольных материалов с различным уровнем активности (отрицательные, положительные); - исполнение методики постановки в соответствии с инструкцией производителя; - внесение пробы и реагентов в канавки планшет; - качество промывки планшетов. <p>На постаналитическом этапе оцениваются:</p> <ul style="list-style-type: none"> - правильность внесения результатов в бланк исследования; - своевременное доведение информации до врача, назначившего исследование. |
| Безопасность персонала | В соответствии с требованиями нормативных документов. |

*описана типовая процедура. Если в инструкции производителя указаны иные требования к отбору, хранению и транспортировке проб, процедуре анализа и учёту результатов, то необходимо следовать инструкции производителя