КонсультантПлюс
надежная правовая поддержка

Приказ Минздрава РФ от 26.03.2001 N 87 "О совершенствовании серологической диагностики сифилиса" (вместе с методическими указаниями "Постановка отборочных и диагностических тестов на сифилис", "Расчетные нормы времени проведения лабораторных исследований при диагностике сифилиса методом реакции пассивной гемагглютинации")

Документ предоставлен КонсультантПлюс

www.consultant.ru

Дата сохранения: 16.08.2013

Документ предоставлен КонсультантПлюс
Дата сохранения: 16.08.2013

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ПРИКАЗ

26 марта 2001 г.

N 87

О СОВЕРШЕНСТВОВАНИИ СЕРОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ СИФИЛИСА

Эпидемиологическая ситуация с заболеваемостью сифилисом остается крайне напряженной. С начала 90-х годов она возросла почти в 40 раз и в 1999 г. достигла 186,7 случаев на 100 тыс. населения.

Серьезность ситуации усугубляется тем, что сифилис, как и другие инфекции, передаваемые половым путем, способствует распространению ВИЧ-инфекции.

Одним из основных мероприятий, направленных на предупреждение дальнейшего распространения заболеваемости сифилисом, является его ранняя диагностика.

Однако материально - техническая база серологических лабораторий не соответствует потребностям учреждений здравоохранения. За последние десять лет число кожно - венерологических диспансеров, не имеющих в своем составе серологических лабораторий, возросло с 25,3% в 1989 г. до 31,2% в 1999 г.

С целью совершенствования лабораторной диагностики сифилиса, повышения качества работы и обеспечения единства подхода по ее организации:

ПРИКАЗЫВАЮ:

1. Утвердить:

1.1. Методические указания "Постановка отборочных и диагностических тестов на сифилис" (приложение N 1).

1.2. Методические указания "Расчетные нормы времени проведения лабораторных исследований при диагностике сифилиса методом реакции пассивной гемагглютинации" (приложение N 2)

2. Директору Центрального научно - исследовательского кожно - венерологического института Минздрава России А.А.Кубановой, директору Уральского научно - исследовательского института дермато - венерологии и иммунопатологии Минздрава России Н.В.Кунгурову, директору Нижегородского научно - исследовательского кожно - венерологического института Минздрава России Н.К.Никулину:

2.1. Обеспечить организационно - методическое руководство по внедрению диагностических тестов в субъектах Российской Федерации в соответствии с приложениями N 1 и N 2.

2.2. До 01.06.2001 подготовить и представить в установленном порядке необходимые материалы на аккредитацию серологических лабораторий научно - исследовательских институтов в качестве экспертных в здравоохранении.

2.3. Обеспечить проведение внешнего контроля качества лабораторной диагностики сифилиса.

3. Руководителям органов управления здравоохранением субъектов Российской Федерации:

3.1. Организовать работу по серологической диагностике сифилиса в соответствии с приложениями N 1, N 2.

3.2. Принять неотложные меры по развитию и укреплению материально - технической базы серологических лабораторий, обратив особое внимание на организацию таких лабораторий в составе кожно - венерологических диспансеров.

4. Считать не действующим на территории Российской Федерации приказ Министерства здравоохранения СССР от 2 сентября 1985 г. N 1161 "О совершенствовании серологической диагностики сифилиса".

5. Контроль за исполнением настоящего приказа возложить на Первого заместителя Министра А.И.Вялкова.

Министр
Ю.Л.ШЕВЧЕНКО

Документ предоставлен КонсультантПлюс
Дата сохранения: 16.08.2013

Приложение N 1
Утверждено приказом
Минздрава России
от 26.03.2001 г. N 87

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

ПОСТАНОВКА ОТБОРОЧНЫХ И ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ТЕСТОВ НА СИФИЛИС

Аннотация

Методические указания предназначены для лабораторных работников и клиницистов дерматовенерологической службы России. Указания посвящены современным методам серо- и ликвородиагностики сифилиса, широко апробированным в научно - исследовательских и лечебно - профилактических учреждениях страны. Представлены новые высоко чувствительные специфичные методики постановки реакций на сифилис. Освещено предназначение различных тестов в качестве отборочных, диагностических и контрольных для оценки эффективности лечения. Описаны принципы реакций, методики их постановки, материально - техническое обеспечение, источники получения ошибочных результатов и мероприятия по технике безопасности при работе с инфекционным материалом.

Организация - разработчик: ГУ ЦНИКВИ МЗ РФ.

Авторы: докт. биол. наук, проф. Г.А.Дмитриев, докт. мед. наук, проф. В.Н.Беднова, докт. мед. наук Г.Ф.Тимченко, канд. мед. наук Г.А.Киселева, канд. мед. наук Т.И.Милонова, канд. мед. наук О.А.Стоянова, З.П.Акопова.

Введение

Для серо- и ликвородиагностики сифилиса в России могут применяться следующие методы:

1. Микрореакция преципитации с кардиолипиновым антигеном (МР), которая является отборочным тестом при обследовании населения на сифилис. Постановка МР осуществляется с плазмой или инактивированной сывороткой крови. Зарубежные тесты ВДРЛ (VDRL), РПР (RPR) и другие аналогичные МР как по принципу постановки реакции, так и по чувствительности и специфичности.

2. Иммуноферментный анализ (ИФА). Антиген из культуральных или патогенных бледных трепонем.

3. Реакция пассивной гемагглютинации (РПГА). Антиген из культуральных или патогенных бледных трепонем.

4. Реакция иммунофлюоресценции (РИФ) в следующих модификациях: РИФ-абс, РИФ-ц, РИФ с капиллярной кровью из пальца. Антиген - патогенная бледная трепонема штамма Никольса.

5. Комплекс серологических реакций на сифилис (КСР), состоящий из реакции связывания комплемента (РСК) с трепонемным и кардиолипиновым антигенами, и МР. Поскольку трепонемный антиген является специфическим, КСР относится к диагностическим тестам. В связи с разработкой более чувствительных, специфичных и менее трудоемких реакций стало возможным заменить при постановке КСР реакцию связывания комплемента на ИФА или РПГА также в сочетании с МР.

6. Реакция иммобилизации бледных трепонем (РИТ), в которой в качестве антигена используют патогенные бледные трепонемы штамма Никольса.

РИТ, РИФ, ИФА и РПГА являются высокочувствительными и высокоспецифичными реакциями на сифилис. Они относятся к диагностическим подтверждающим тестам. При этом в связи с простотой постановки и наличием коммерческих тест - систем ИФА и РПГА могут быть и высокоэффективными отборочными тестами.

Ввиду различной чувствительности при разных формах сифилиса, специфичности и сложности

постановки каждая из указанных реакций имеет свое предназначение.

Профилактическое обследование населения на сифилис можно проводить с помощью МР, КСР, ИФА и РПГА. Все организационные вопросы по применению данных реакций с этой целью решаются органами здравоохранения на местах в зависимости от местных условий и возможностей.

При получении положительного результата в МР пациент должен обследоваться дерматовенерологом с повторным исследованием крови в любом диагностическом тесте на сифилис.

При профилактическом обследовании на сифилис больных глазных, психоневрологических, кардиологических стационаров, беременных, в частности, направляемых на искусственное прерывание беременности, должны использоваться КСР, ИФА или РПГА.

При обследовании доноров необходимо применять КСР или ИФА или РПГА, но обязательно в сочетании с МР. Постановка двух реакций одновременно обусловлена высокой ответственностью данного исследования.

МР в количественном варианте с экономической точки зрения необходимо использовать в качестве контроля эффективности лечения, заменив ею количественную постановку РСК с кардиолипиновым антигеном.

Вышеуказанные специфические тесты служат для диагностики всех форм сифилиса, в частности, скрытого, а также для распознавания ложноположительных результатов, полученных в МР и КСР. При диагностике скрытого сифилиса целесообразна постановка двух специфических тестов одновременно.

Поскольку ИФА и РПГА являются более высокочувствительными, специфическими и воспроизводимыми тест - системами, которые можно использовать в качестве отборочных и подтверждающих тестов, осуществить до 2006 г. замену комплекса серореакций (КСР) вышеуказанными реакциями при диагностике сифилиса.

Таким образом, последовательность обследования пациентов на сифилис представляется следующим образом:

- при первичном обследовании производится постановка отборочной (скрининговой) реакции микропреципитации (РМП) или ее модификации (RPR- РПР, TRUST - ТРАСТ, VDRL - ВДРЛ) в количественном и качественном вариантах и в случае положительного результата - любого специфического подтверждающего трепонемного теста (РПГА, ИФА, КСР, РИФ, РИТ);

- после окончания терапии ставится РМП или ее модификация и по снижению титра судят о динамике инфекционного процесса и эффективности терапии. Подтверждением эффективности проведенной терапии считается снижение титра в 4 и более раз в течение 1 года;

- по окончании этого срока осуществляется постановка той же специфической реакции, что и при первичном обследовании. Следует учитывать, что специфические трепонемные тесты могут оставаться положительными (не негативировать) в течение ряда лет, а в отдельных случаях остаются положительными на всю жизнь.

Методика постановки и суть различных модификаций МР, ИФА, РПГА, РИФ, РСК и РИТ подробно описаны в настоящих Методических указаниях.

Формула метода

Впервые детально описаны 6 методов, используемых для серо- и ликвородиагностики сифилиса включающих 15 модификаций. Рекомендована замена РСК при определении эффективности лечения сифилиса МР, что дает экономический эффект. Введена в инструкцию количественная методика постановки РИТ, расширяющая возможности поздних форм сифилиса. Включены методики постановки РСК, РИТ, РИФ-ц и ИФА для ликвородиагностики сифилиса.

Показания к применению метода

Серо- и ликвородиагностика всех форм сифилиса.

Противопоказаний нет.

МИКРОРЕАКЦИЯ ПРЕЦИПИТАЦИИ С КАРДИОЛИПИНОВЫМ АНТИГЕНОМ (ЭКСПРЕСС - МЕТОД)

Принцип. При добавлении к плазме или сыворотке крови больного сифилисом эмульсии кардиолипинового антигена образуется преципитат (комплекс антиген - антитело), выпадающий в виде хлопьев белого цвета.

Материально - техническое обеспечение метода

Оборудование для взятия крови и постановки МР:
- капиллярные пипетки аппарата Панченкова;
- градуированные пипетки 1, 2, 5 и 10 мл;
- автоматические пипетки на 20-200 мкл;
- наконечники для автоматических пипеток;
- пробирки длиной 8-10 см и 14-15см, диаметром 1-1,5 см или центрифужные;
- пластинки из прозрачного материала с лунками диаметром 1-1,2 см, глубиной не менее 0,5 см;
- иглы для взятия крови из пальца и вены; шприцы;
- центрифуга, дающая не менее 1000 об/мин;
- аппарат для встряхивания;
- стерилизатор для кипячения игл, шприцов, инструментов.

Ингредиенты для МР:
- антиген кардиолипиновый для микрореакции;
- холин - хлорид (включается в упаковку с антигеном);
- натрий хлорид х.ч.;
- натрий лимоннокислый (цитрат натрия)трехзамещенный $Na_3C_6H_5O_7 \cdot 5H_2O$;
- мертиолат $C_9H_9O_2SNaHg$.

Растворы:
- изотонический раствор натрия хлорида 0,9%;
- 10% раствор холин - хлорида готовится следующим образом: к 29,65 мл изотонического раствора натрия хлорида добавляют 0,35 мл 0,01% раствора мертиолата и 5 мл 70% раствора холин - хлорида. Смесь тщательно перемешивают. При отсутствии мертиолата для приготовления 10% раствора холин - хлорида необходимо к 30 мл стерильного изотонического раствора натрия хлорида добавить 5 мл 70% раствора холин - хлорида;
- 5% раствор трехзамещенного цитрата натрия готовится на дистиллированной воде и фильтруется. Раствор не стоек. При помутнении его надо заменять свежим. Хранится в холодильнике при 4 град. в течение 5-6 дней.

Контрольные лиофилизированные сыворотки крови необходимы для установления пригодности эмульсии антигена. Отрицательную и положительную контрольные сыворотки крови используют неразведенными, слабоположительную получают из положительной путем ее разведения по титру, установленному в день приготовления эмульсии антигена. При отсутствии лиофилизированных сывороток крови используют нативную положительную или смесь положительных в РСК с кардиолипиновым антигеном или микрореакции инактивированных сывороток крови, которые разливают по 0,5 мл в пробирки с плотно закрывающимися пробками, хранят в морозильном отделении холодильника, используют с титром выше 1:8. В день постановки реакции сыворотку крови титруют на пластинке с целью подтверждения ранее установленного титра, для контроля качества эмульсии и получения слабоположительного результата, который используют затем в течение рабочего дня.

Титрование контрольной сыворотки проводят следующим образом: в 9 лунок пластинки, начиная со второй лунки, вносят по 90 мкл изотонического раствора натрия хлорида и добавляют в первую и вторую лунки по 90 мкл контрольной сыворотки крови. Содержимое второй лунки перемешивают пипеткой, насасывая и выпуская его в лунку 5-6 раз. Затем набирают 90 мкл содержимого второй лунки в пипетку и 90 мкл переносят в третью лунку. Содержимое третьей лунки перемешивают таким же образом и переносят в четвертую лунку и так далее до последней лунки. Из последней лунки 90 мкл удаляют. Во все лунки добавляют по 30 мкл эмульсии кардиолипинового антигена. Пластинку встряхивают в аппарате в течение 5 минут, добавляют по 90 мкл изотонического раствора натрия хлорида и оставляют при комнатной температуре на 5 минут, после чего регистрируют результаты. Разведение сыворотки крови, давшее слабоположительный результат (+/ 2+), используют в качестве слабоположительного контроля. Для получения его делают соответствующее разведение. Например, если слабоположительный результат получен с разведением сыворотки крови 1:8, то для получения контрольной слабоположительной сыворотки крови в пробирку вносят 0,7 мл изотонического раствора натрия хлорида и 0,1 мл положительной сыворотки крови, перемешивают.

При правильно проведенном титровании положительной сыворотки крови по мере ее разведения наблюдается равномерное уменьшение величины хлопьев преципитата.

При снижении реактивности хранящейся нативной контрольной сыворотки крови используют разведение, дающее слабоположительный результат при повторном титровании. Контрольную сыворотку крови можно использовать до тех пор, пока она дает положительный результат (4+) в разведении не ниже 1:2, и слабоположительный результат (2+) в разведении не меньше 1:4. При дальнейшем снижении реактивности употреблявшуюся положительную контрольную сыворотку крови заменяют новой.

При хранении контрольных сывороток крови не допускаются повторные замораживания их и оттаивание, т.к. в этом случае реактивность их снижается.

О снижении реактивности контрольной сыворотки крови, а не эмульсии антигена, судят по параллельному титрованию этой сыворотки крови с использованием хранившейся и вновь приготовленной эмульсии. Если получают один и тот же титр антител в МР с обеими антигенными эмульсиями, то считают, что снижение реактивности зависит от хранения контрольной сыворотки крови, если же снижение реактивности наблюдают только при использовании хранившейся эмульсии антигена, то это обусловлено снижением реактивности эмульсии антигена, которую необходимо заменить свежеприготовленной.

Серологические лаборатории кожно - венерологических диспансеров должны снабжать контрольными сыворотками крови лаборатории района, использующие в своей работе экспресс - метод и не имеющие положительных и отрицательных сывороток крови. При отсутствии контрольных сывороток крови реакцию ставить нельзя.

Эмульсия кардиолипинового антигена готовится из специального кардиолипинового антигена для микрореакции преципитации. Нельзя использовать в микрореакции кардиолипиновый антиген, предназначенный для реакции связывания комплемента.

Перед приготовлением эмульсии обращают внимание на прозрачность ампулированного антигена. При выпадении кристаллов холестерина их растворяют нагреванием ампул в термостате или водяной бане при 37 град. С или 56 град. С соответственно.

Прежде чем приготовить эмульсию, рассчитывают необходимое количество ее на рабочий день или рабочую неделю (на 50 исследований требуется 1 мл кардиолипинового антигена). В пробирку вносят сухой пипеткой не более 2 мл антигена, добавляя его к равному объему 0,9% изотонического раствора натрия хлорида, перемешивают, оставляют при комнатной температуре на 30 минут, затем центрифугируют при 1000 об/мин до получения прозрачной жидкости, которую удаляют, а к осадку добавляют 3,5 объема (по отношению к взятому антигену) 10% раствора холин - хлорида. Например, если требуемый объем антигена равен 0,5 мл, то для вычисления количества холин - хлорида 0,5 мл умножают на 3,5 и получают 1,75 мл, т.е. необходимый объем холин - хлорида. Пробирку плотно закрывают пробкой и содержимое перемешивают, опрокидывая пробирку, до полного ресуспендирования. Полученная эмульсия готова к употреблению. При необходимости приготовления большого количества эмульсии, ее готовят не в одном флаконе большой емкости, а в нескольких пробирках, внося в каждую из них по 2 мл антигена. Такие объемы обеспечивают лучшее перемешивание антигена, предохраняют его от загрязнений при повторном взятии для постановки

реакции, а также от нагревания и действия солнечных лучей.

Эмульсию антигена хранят в холодильнике при 4 град. не более недели, а при добавлении раствора мертиолата - в течение 2 недель. В день постановки реакции нужное для данного рабочего дня количество эмульсии берут из холодильника, оставляют для согревания при комнатной температуре на 30 минут и перемешивают ее, опрокидывая пробирку, закрытую пробкой, не менее 30 раз, затем проверяют ее пригодность на контрольных сыворотках крови. Применяемую эмульсию необходимо защищать от света, обернув пробирки с ней черной бумагой. Пригодность каждой новой серии антигена проверяют в экспресс - методе одновременно с уже бывшей в работе серией на заведомо положительных и отрицательных сыворотках крови. О пригодности антигена судят по величине титров, наблюдаемых при одновременном титровании положительных сывороток крови с новой и проверенной сериями антигенов. Получение близких результатов, т.е. величин титров реагентов, отличающихся на +/-1 разведение, одинаковой выраженности хлопьев преципитата, наблюдаемых в одних и тех же разведениях положительных сывороток крови свидетельствует о пригодности исследуемой серии антигена. Серию антигена бракуют, если одновременное титрование контрольной положительной сыворотки крови с новой серией антигена показывает: а)слабо выраженный преципитат (2+/1+) при минимальных разведениях сыворотки крови; б) более низкий (на 2-3 разведения) титр реагинов, чем с употреблявшейся проверенной серией; в) наличие преципитата в отрицательных сыворотках крови.

Получение плазмы крови:

Кровь берут из пальца так же, как для исследования скорости оседания эритроцитов (СОЭ). При взятии крови смачивают капилляр аппарата Панченкова 5% раствором цитрата натрия, набрав раствор до метки "25", а оставшийся цитрат натрия выливают в центрифужную пробирку, куда затем вносят три капилляра крови, взятой до метки "К", перемешивают. Кровь отстаивают при комнатной температуре, а в экстренных случаях центрифугируют с целью получения плазмы крови, которую отсасывают автоматической пипеткой для проведения исследования.

Получение инактивированной сыворотки крови:

Кровь берут из вены, получают сыворотку крови и инактивируют ее так же, как для РСК.

Методика постановки микрореакции:

Качественную и количественную постановки микрореакции с испытуемой плазмой и инактивированной сывороткой крови следует осуществлять следующим образом.

При использовании качественной методики постановки микрореакции автоматической пипеткой забирают по 90 мкл плазмы или инактивированной сыворотки крови и вносят в лунки, куда затем добавляют по 30 мкл эмульсии кардиолипинового антигена. В каждую лунку вносят плазму или сыворотку крови от одного обследуемого и нумеруют соответственно списку в регистрационном журнале. Ингредиенты перемешивают встряхиванием пластины во встряхивателе (100 качаний в 1 минуту) в течение 5 минут, затем в каждую лунку добавляют по 90 мкл изотонического раствора натрия хлорида, перемешивают покачиванием пластины и оставляют при комнатной температуре на 5 минут (оптимальный температурный режим реакции 23-28 град.). Результаты учитывают только после появления хлопьев в контрольной слабоположительной сыворотке крови.

При использовании количественной методики постановки микрореакции в 9 лунок горизонтального ряда пластины, начиная со второй лунки, вносят по 90 мкл изотонического раствора натрия хлорида и добавляют в первую и вторую лунки по 90 мкл исследуемой плазмы или сыворотки крови. Содержимое второй лунки перемешивают автоматической пипеткой, забирая его и выпуская из нее в лунку 5-6 раз, затем забирают 90 мкл и переносят в третью лунку. Из третьей лунки 90 мкл переносят в четвертую и т. д. по десятую лунку, из которой 90 мкл удаляют. Таким образом получают двукратные разведения плазмы или сыворотки крови 1:2, 1:4, 1:8 и далее до 1:516. В первую лунку изотонический раствор натрия хлорида не приливают, а вносят только 90 мкл плазмы или сыворотки крови, т.е. исследуют цельную плазму или сыворотку крови. Во все лунки добавляют по 30 мкл эмульсии кардиолипинового антигена. Пластину встряхивают 5 минут, после чего во все лунки добавляют по 90 мкл изотонического раствора натрия хлорида. Через 5 минут регистрируют результаты так же, как при постановке качественной реакции.

Титром преципитинов считают последнее разведение плазмы или сыворотки крови, где обнаружен преципитат. Величина титра указывает на активность процесса, а его снижение во время лечения - на

эффективность терапии. Стабильность титров настораживает клиницистов в отношении эффективности терапии, увеличение же их требует пересмотра лечения.

Для получения достоверных результатов следует пользоваться одной и той же серией препарата при обследовании больного в процессе лечения, что относится ко всем реакциям на сифилис.

К моменту снятия леченного больного с учета неспецифические тесты с кардиолипиновым антигеном обычно негативируются, в то время как позитивность специфических реакций может наблюдаться долго после окончания лечения, в связи с чем эти тесты не могут служить критерием излеченности и больные снимаются с учета с положительными результатами РИТ, РИФ, ИФА, РПГА.

Источники ошибок при постановке МР:

- неправильное взятие крови из пальца (наличие пузырей воздуха в капилляре пипеток);
- исключение из постановки реакции контрольных сывороток крови, в частности, слабоположительных;
- неравномерная концентрация антигена в эмульсии вследствие недостаточного перемешивания ее перед использованием;
- бактериальное загрязнение эмульсии;
- нарушение сроков и условий хранения плазмы и сыворотки крови, антигена и его эмульсии, растворов;
- замена трехзамещенного цитрата натрия двухзамещенным;
- использование при постановке реакций загрязненных пробирок, пипеток, пластинок, растворов.

Вышеуказанные ошибки могут приводить к появлению как ложноотрицательных, так и ложноположительных результатов реакции.

ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ ДЛЯ СЕРО- И ЛИКВОРОДИАГНОСТИКИ СИФИЛИСА

Принцип иммуноферментного анализа заключается в соединении комплекса "антиген - антитело" с конъюгатом, содержащим ферментную метку, выявляемую с помощью субстратной смеси. В настоящее время в нашей стране ИФА тест - системы разрабатываются по трем схемам проведения реакции.

В основе первой схемы лежит следующее:

На твердофазном носителе (чаще лунки полистиролового планшета) зафиксирован антиген возбудителя сифилиса, который инкубируется с испытуемой сывороткой, плазмой крови или ликвором. При наличии в этом материале от пациентов противотрепонемных антител происходит их связывание в комплекс "антиген - антитело" (I фаза реакции). После удаления не связавшихся иммуноглобулинов следует инкубация с мечеными ферментом антителами к антивидовым иммуноглобулинам (конъюгат), в ходе которой на поверхности носителя происходит присоединение к имеющимся комплексам "антиген - антитело" антител, меченных ферментом (II фаза). После удаления не связавшегося конъюгата в ходе инкубации с раствором субстрата (в случае использования пероксидазного конъюгата, это перекись водорода в сочетании с орто - фенилендиамином (ОФД), 5-аминосалициловой кислотой (5-АСК) или тетраметилбензидином (ТМБ)) происходит взаимодействие фермента с субстратом, в результате чего развивается цветная реакция, интенсивность которой зависит от количества связанных сывороточных антител (III фаза). Результат реакции оценивается спектрофотометрически с выводом цифровых данных, что исключает субъективность оценки, или визуально, что может быть полезным при отсутствии в лабораториях соответствующего оборудования. По такому принципу в настоящее время построено большинство ИФА тест - систем для диагностики сифилиса.

Вторая схема - ИФА с фиксированными антителами или "ловушка для антител". Здесь на твердофазном носителе фиксируются аффинноочищенные антитела против определенного класса иммуноглобулинов (M, G или A), которые связывают находящиеся в испытуемых сыворотках крови иммуноглобулины соответствующего класса (I фаза реакции). Образование комплекса "антитело - специфический иммуноглобулин" выявляют с помощью конъюгата, состоящего из антигенов бледной трепонемы, меченных ферментом (II фаза). При инкубации с субстратом (III фаза) в случае наличия сифилитических антител в испытуемой сыворотке или плазме крови наступает окрашивание раствора. В нашей стране разрабатываются подобные тест - системы, в основном для выявления противотрепонемных IgM.

Третья схема ИФА используется для выявления суммарных антител, специфических для определенного антигена, независимо от их класса. Ее суть заключается в том, что специфические сывороточные антитела одновременно взаимодействуют с антигеном, зафиксированным на твердофазном носителе, и с тем же антигеном, меченным ферментом, при совместной инкубации испытуемого образца и конъюгата (I фаза реакции). Наличие образовавшегося комплекса определяют с помощью субстрата (II фаза).

В зависимости от используемых антигенов все ИФА тест - системы для выявления антител подразделяются на:

1) лизатные (лизированный или обработанный ультразвуком возбудитель инфекции, полученный в культуре);

2) рекомбинантные - используются полученные генно - инженерным способом белки - аналоги определенных белковых антигенов возбудителя;

3) пептидные - использующие синтетические фрагменты белков.

Среди отечественных ИФА тест - систем для выявления сифилитических антител, уже рекомендованных Министерством здравоохранения РФ к применению в медицинской практике, имеются лизатные, рекомбинантные и пептидные.

1. Тест - система иммуноферментная для выявления антител к Treponema pallidum в сыворотке или плазме крови человека "РекомбиБест антипаллидум" и "РекомбиБест антипаллидум - стрип". Разработчик - ЗАО "Вектор - Бест", п. Кольцово Новосибирской области. Назначение - выявление специфических IgG.

2. Тест - система иммуноферментная для выявления антител к Treponema pallidum в сыворотке или плазме крови человека "РекомбиБест антипаллидум - суммарные антитела". Разработчик - ЗАО "Вектор - Бест", п. Кольцово Новосибирской области. Назначение - выявление специфических IgM и IgG.

3. Тест - система иммуноферментная для выявления антител к возбудителю сифилиса "ИФА-АНТИ-LUIS". Разработчик - НПО "Диагностические системы", г. Нижний Новгород. Назначение - выявление специфических IgG.

4. Тест - система иммуноферментная для выявления антител к возбудителю сифилиса (Treponema pallidum) на основе рекомбинантных белков. Разработчик - БТК "Биосервис", г. Москва. Назначение - выявление специфических IgG.

5. Тест - система иммуноферментная для выявления IgM и IgG антител человека к антигенам Treponema pallidum ("ЛюисСкрин"). Разработчик - ЗАО "Ниармедик" и АЗОТ "Диаклон", г. Москва. Назначение - выявление специфических IgM и IgG.

6. Тест - система иммуноферментная для выявления антител к возбудителю сифилиса ("ЭКОлаб - антипаллидум - скрин"). Разработчик - ТОО "ЭКОлаб", г. Электрогорск Московской области. Назначение - выявление специфических IgG.

7. Тест - система иммуноферментная для выявления антител к возбудителю сифилиса ("ИФА-анти - трепонема"). Разработчик - ЗАО "Вектор - Майстар", г. Новосибирск. Назначение - выявление специфических IgG.

8. Тест - система иммуноферментная для качественного выявления антител к возбудителю сифилиса в сыворотке крови человека ("АТ-Треп.-ИФТС"). Разработчик - ГП "Аллерген", г. Ставрополь. Назначение - выявление специфических IgM и IgG.

9. Тест - система иммуноферментная для выявления антител к возбудителю сифилиса Treponema pallidum (Сиф - Ат - NN 1,2). Разработчик - ТОО НИИ "Аквапаст", г. Санкт - Петербург. Назначение - выявление специфических IgM и IgG.

10. Тест - система иммуноферментная для выявления суммарных антител к возбудителю сифилиса ("ИФАанти-СИФ"). Разработчик - НПК "Препарат", г. Нижний Новгород. Назначение - выявление специфических IgM и IgG.

Иммуноферментные тест - системы для диагностики сифилиса выпускаются в виде многокомпонентных наборов, содержащих все реагенты, необходимые для проведения реакции, и инструкцию по их применению.

Материально - техническое обеспечение метода:

Лаборатории, в которых осуществляется постановка ИФА, должны быть укомплектованы:

- набором автоматических пипеток (микродозаторов), который включает в себя одноканальные

пипетки переменного объема, рассчитанные на дозирование 5-40, 40-200 и 200-1000 мкл жидкости, а также 8-канальные пипетки переменного объема на 5-50 (при использовании тест - систем с рабочим разведением образцов 1:100 и 1:200) и 50-300 мкл;

- набором мерной химической посуды;
- термостатом, рассчитанным на поддержание температуры 37 град. С;
- дистиллятором лабораторным для получения дистиллированной воды;
- спектрофотометром планшетным;
- холодильником;
- pH-метром.

Результаты ИФА с сывороткой крови и ликвором при использовании всех тест - систем с автоматическим учетом регистрируют на спектрофотометре для планшетов немедленно после постановки реакции с измерением оптической плотности (ОП) раствора субстрата при длине волны 492 нм.

Выведение спектрофотометра на нулевой уровень ("бланк") осуществляют по воздуху. Учет результатов реакции проводят согласно методике и цифровым данным, изложенным в инструкции по применению, имеющейся в каждом используемом наборе. При автоматическом учете результатов реакции по величине цифровых показателей ОП в лунках с испытуемыми образцами судят о концентрации специфических антител в исследуемой сыворотке крови и ликворе. В связи с этим данный метод оценки результатов называют количественным. При каждой постановке ИФА рассчитывают критическое значение ОП (ОПкрит.) и "серую зону". "Серой зоной" является интервал от ОПкрит. - 10% до ОПкрит. + 10%. Исследуемый образец учитывают как положительный, если ОП данного образца выше "серой зоны", как сомнительный, если ОП находится в пределах "серой зоны", и как отрицательный, если ОП ниже "серой зоны". Так учитывают результаты во всех тест - системах, кроме тест - системы "ЛюисСкрин". В тест - системе "ЛюисСкрин" исследуемая сыворотка расценивается как положительная, если ее ОП превышает ОП отрицательного контроля не менее, чем в 2 раза.

К сожалению, при учете результатов реакции все ИФА тест - системы невозможно привести к единому стандарту. Один и тот же образец может давать в разных тест - системах совершенно разный уровень окрашивания раствора субстрата. Это зависит от конструкции самой тест - системы, используемого антигена, концентрации конъюгата и др., а также от величины ОПкрит. Поэтому более точной оценкой результатов ИФА является титр противотрепонемных антител каждого положительного образца. С целью определения титра производят последовательные 2-кратные разведения испытуемой сыворотки крови, давшей положительный результат. За титр принимают наибольшее разведение сыворотки, дающее положительный результат. Следовательно, титр является количественным показателем уровня специфических антител в данном образце и степени его позитивности. Но следует учитывать, что повторное исследование сыворотки крови должно осуществляться с той же тест - системой, так как титр антител в одном и том же образце может быть различным при использовании разных тест - систем.

При применении тест - системы с визуальным учетом результатов также рекомендуется определение титров противотрепонемных антител в резко положительных сывороточных образцах (4+).

Отрицательной чертой количественного метода исследования с целью определения титра антител в сыворотке крови и ликворе является его неэкономичность. В связи с этим целесообразно использовать другой критерий для характеристики концентрации антител - коэффициент позитивности (КП), равный отношению оптической плотности, полученной для каждого образца, к критической оптической плотности: КП = ОП/ОПкрит. КП у положительных образцов выше 1,1, сомнительных - находится в интервале от 0,9 до 1,1 и отрицательных - ниже 0,9. Определение КП целесообразно проводить при выяснении динамики выработки антител у пациента в процессе наблюдения за ним после лечения сифилиса, при этом обязательно нужно использовать ту же тест - систему, что и до лечения больного. Эта методика не требует дополнительных финансовых затрат и дает представление об эффективности лечения.

При использовании тест - системы иммуноферментной для качественного выявления антител к возбудителю сифилиса в сыворотке крови человека ("АТ-Треп.-ИФТС", г. Ставрополь) возможен только визуальный учет результатов реакции. При резко положительном (4+) результате субстратная смесь имеет темно - коричневый цвет, при положительном (3+) - коричневый цвет, при слабоположительном (2+) - светло - коричневый, при отрицательном (+,-) - светло - бежевый цвет или бесцветна.

Образцы, для которых получен сомнительный результат (соответствующая им ОП находится в пределах "серой зоны" и КП в интервале от 0,9 до 1,1) подлежат повторному анализу. При повторном сомнительном результате рекомендуется анализ с новой порцией крови, взятой через 3-7 дней.

МЕТОДИКА ПОСТАНОВКИ ИФА ДЛЯ ЛИКВОРОДИАГНОСТИКИ СИФИЛИСА

Для ликвородиагностики сифилиса могут быть использованы отечественные тест - системы ИФА, предназначенные для выявления иммуноглобулинов класса О и работающие по первой схеме проведения реакции. В настоящее время такими тест - системами являются:

1. Тест - система иммуноферментная для выявления антител к Treponema pallidum в сыворотке или плазме крови человека "РекомбиБест антипаллидум" и "РекомбиБест антипаллидум - стрип" производства ЗАО "Вектор - Бест" (п. Кольцово Новосибирской области); 2. Тест - система иммуноферментная для выявления антител к возбудителю сифилиса "ИФА - АНТИ - LUIS" производства НПО "Диагностические системы" (г. Нижний Новгород); 3. Тест - система иммуноферментная для выявления антител к возбудителю сифилиса (Treponema pallidum)На основе рекомбинантных белков производства БТК "Биосервис" (г. Москва).

Ликвор в реакцию вводят цельным и неинактивированным. Мутный или с примесью крови ликвор центрифугируют и отсасывают надосадочную жидкость. Перед исследованием ликвор можно сохранять в морозильном отделении холодильника при температуре от -12 град.С до -18 град. С в пробирках под резиновыми пробками или в "эппендорфах" до 1 месяца. Размораживание производят при комнатной температуре. Повторное замораживание и размораживание не допускается.

При исследовании ликвора приготовление рабочих растворов, проведение ИФА и учет результатов осуществляют в соответствии с инструкцией по применению тест - систем, за исключением пунктов, касающихся разведения ликвора и приготовления рабочих растворов конъюгата. Так, исследование ликвора в отличие от исследования сыворотки или плазмы крови проводят в первой фазе реакции при его разведении 1:2 (50 мкл ликвора и 50 мкл раствора для разведения) и во второй фазе реакции с рабочим раствором конъюгата, концентрация которого увеличена в 4 раза по сравнению с указанной в инструкции для сыворотки или плазмы крови.

Количественными показателями концентрации противотрепонемных антител (степени позитивности) в ликворе являются титр противотрепонемных антител или коэффициент позитивности. Определение титров или коэффициентов позитивности целесообразно проводить как до лечения, так и после него для выяснения динамики выработки антител с использованием одной и той же тест - системы.

По своей диагностической эффективности при ликвородиагностике сифилиса ИФА близок к РИФ-ц, самой чувствительной и специфичной реакции при диагностике нейросифилиса. Положительной чертой ИФА является его доступность благодаря наличию производственных высококачественных тест - систем.

Источники возникновения ошибок при использовании ИФА-тест - систем делятся на вне- и внутрилабораторные. К первым относятся: нарушения техники взятия крови, условий транспортировки и хранения тест - систем и проб. Ко вторым - некачественная работа лаборантов, любые отклонения от инструкции по применению тест - системы, неисправность инструментов и приборов, неаккуратность ведения документации.

Чтобы избежать ошибок при проведении ИФА, необходимо придерживаться следующих правил:

- не использовать для исследования хилезные, резко гемолизированные и проросшие сыворотки крови, добиваясь стандартных условий взятия и хранения образцов;
- не практиковать 2-кратного и более замораживания - размораживания образцов сыворотки крови;
- не пользоваться просроченными наборами тест - систем;
- соблюдать стандартные требования к чистоте лабораторной посуды; использовать отдельные посуду и наконечники для автоматических пипеток (при их многократном использовании) для разведения конъюгатов и субстрата пероксидазной реакции (ОФД);
- проводить периодический контроль качества работы лаборантов;
- следить за строгим соблюдением инструкций по применению тест - систем;
- пользоваться автоматическими пипетками с погрешностью измерения объемов не более 5%, ежемесячно проводя метрологический контроль их работы;
- соблюдать правила эксплуатации оборудования (спектрофотометры, автоматические

промыватели планшет, pH-метры);

- спектрофотометры для ИФА должны не реже одного раза в год проходить метрологический контроль, периодическому контролю подлежат также автоматические пипетки, термостаты, pH-метры;

- в ходе каждой постановки ИФА заполнять протокол исследования.

Главным достоинством ИФА является наличие отечественного выпуска тест - систем, их высокое качество, возможность автоматизации постановки и учета его результатов, что крайне важно при исследовании большого числа сывороток крови, в частности от доноров. При использовании тест - систем ИФА для лабораторий с небольшим объемом работы следует закупать тест - системы с разборными планшетами (стрипы).

ИФА диагностика сифилиса - эффективный метод. Необходимым является его более широкое использование в качестве скринингового и диагностического теста на сифилис, но обязательным при этом должно быть высокое качество выпускаемых предприятием тест - систем. Недопустима продажа и использование в медицинской практике тест - систем, не имеющих утвержденной фармакопейной статьи и разрешения Минздрава РФ на их применение в практике здравоохранения. Все утвержденные и рекомендованные в практику ИФА тест - системы прошли государственные испытания в ГИСК им. Л.А. Тарасевича и в ЦНИКВИ. В процессе их промышленного выпуска должен осуществляться систематический контроль качества. К применению в медицинской практике разрешаются тест - системы, чувствительность и специфичность которых не ниже 95%.

ПРОТОКОЛ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ИФА

Дата анализа: _____
Исполнитель: _____
Тест - система: _____
Серия: _____ Контрольный N _____ Срок годности: _____

СХЕМА АНАЛИЗА:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

РЕЗУЛЬТАТЫ АНАЛИЗА:

РЕАКЦИЯ ПАССИВНОЙ ГЕМАГГЛЮТИНАЦИИ ДЛЯ СЕРОДИАГНОСТИКИ СИФИЛИСА

Принцип метода заключается в том, что при соединении сыворотки крови, содержащей специфические антитела, с эритроцитами, сенсибилизированными соответствующим антигеном, наблюдается их характерная агглютинация. Постановка реакции может осуществляться в пробирках или планшетах.

Сенсибилизация эритроцитов при изготовлении тест - системы для диагностики сифилиса может производиться патогенными или культуральными бледными трепонемами.

Помимо наших производителей, ряд зарубежных фирм поставляет свою продукцию в Россию.

1. Гемагглютинационный тест для качественного и количественного определения антител против Treponema pallidum ("Syphilis TPHA - test"), фирма "Human", страна - производитель - Германия, распространитель - фирмы: "Биохиммак", "Лабораторная диагностика", г. Москва.

2. Гемагглютинационный тест для качественного и количественного определения антител против

Treponema pallidum ("TPHA - nosticon"), фирма "Organon", страна - производитель - Голландия, распространитель - фирма "Organon - technics", г. Москва.

3. Гемагглютинационный тест для качественного и количественного определения антител против Treponema pallidum ("Syphilia TPHA 200"), фирма "Sanofi diagnostic Pasteur", страна - производитель - Франция, распространитель - фирма "Sanofi diagnostic Pasteur", г. Москва.

4. Гемагглютинационный тест для качественного и количественного определения антител против Treponema pallidum ("Syphilis TPHA"), фирма "Randox", страна - производитель - Великобритания, распространитель - фирма ЗАО "Protea", г. Москва.

5. Диагностикум для выявления антител к Treponema pallidum в реакции пассивной гемагглютинации ("Люис РПГА тест"), фирма "Ни-армедик Плюс", г. Москва.

В ЦНИКВИ на большом материале с отечественным диагностикумом изучена результативность РПГА по сравнению с другими тестами на сифилис при исследовании сывороток крови больных с различными формами сифилиса до лечения. В РПГА получено 99,4% положительных результатов, в РИФ-абс - 99,1%, РИФ-200 - 99,1%, РИТ - 87,7%, МР - 95,8%, в РСК с трепонемным антигеном - 95,8%, РСК с кардиолипиновым антигеном - 90,2%. В зарубежной литературе имеются указания на более позднюю выработку гемагглютининов у больных в ранний период заболевания, хотя в ЦНИКВИ выявлен высокий процент положительных результатов при сифилисе первичном, серопозитивном - 97,7%.

Общее мнение исследователей заключается в том, что РПГА является ценным диагностическим тестом при всех формах сифилиса, но особенно чувствительна она при поздних формах заболевания.

Существует микро- и макромодификации постановки РПГА, чаще используется первая из-за экономичности, быстроты постановки и учета результатов. Кроме того, есть качественный и количественный варианты постановки. Последний позволяет определять титры антител в крови. Но при этом, необходимо учесть, что при повторных исследованиях крови в РПГА необходимо использовать одну и ту же тест - систему.

Результаты РПГА учитывают через 1,5-2 ч при микрометоде или на следующий день при макрометоде. Неподвижно стоящие пластины даже при высыхании их содержимого сохраняют полученную картину:

"4+" - положительная РПГА. Эритроциты равномерно выстилают всю поверхность лунки (в виде зонтика). "3+" - положительная РПГА. Эритроциты выстилают всю поверхность лунки, но часть их соскальзывает к центру.

"2+" - слабоположительная РПГА. Эритроциты образуют пленку на небольшом участке нижней части лунки.

"1+" - отрицательный результат РПГА. На дне лунки эритроциты образуют рыхлый осадок.

"-" - отрицательная РПГА. Эритроциты ровным плотным "колечком" или "пуговкой" лежат на самом дне лунки (без окружающего зернистого осаждения).

Испытание сыворотки крови людей в первых двух разведениях позволяет при качественной постановке реакции быстро выявлять лиц, сыворотки крови которых содержат специфические антитела к антигенам бледной трепонемы. Испытание сыворотки крови количественным методом с помощью двукратных разведений дает дополнительную информацию о концентрации специфических антител в крови.

Материально - техническое обеспечение метода

Для постановки РПГА в лаборатории должно быть следующее оборудование: полистироловые пластины, микротитраторы типа "Такаччи", холодильник, центрифуга, термостат (+37 град.С), пипетки дозаторы и градуированные пипетки, лабораторная посуда и pH-метр.

При проведении серологических исследований на сифилис, в частности ИФА и РПГА, могут иметь место как ложноположительные, так и ложноотрицательные результаты реакций.

Ложноположительные результаты могут быть получены при исследовании сывороток крови пациентов с невенерическими трепонематозами, за счет ревматоидного фактора и перекрестно реагирующих с трепонемным антигеном антител, образующихся при различных системных или индуцированных лекарствами и наркотиками нарушениях обмена, из-за аномального уровня иммуноглобулинов; у новорожденных детей - за счет образования в организме плода или ребенка IgM-антител к IgG матери, что осложняет трактовку результатов и диагностику врожденного сифилиса.

Ложноотрицательные результаты реакции могут быть обусловлены конкуренцией между IgM- и IgG-антителами.

К наиболее типичным техническим ошибкам при постановке РПГА, приводящим к получению недостоверных результатов, следует отнести неточное разведение ингредиентов, нарушение температурного режима, времени инкубации реагентов, сроков нанесения их на планшет, несоответствие pH растворов требуемым, загрязнение лабораторной посуды.

Образцы, давшие сомнительный результат в РПГА из-за содержания неспецифических агглютининов, можно подвергнуть обработке с целью адсорбции этих агглютининов. Для этого 20 мкл сыворотки при постановке микромодификации тщательно смешивают с 0,5 мл контрольных эритроцитов, инкубируют 30 минут и центрифугируют 5 минут. Надосадочную жидкость подвергают повторному исследованию.

Для постановки РПГА, как и других серологических тестов, должны быть выделены врачи, лаборанты, медицинские сестры, прошедшие специальную подготовку по соответствующему вопросу. Подготовка врачей - серологов и повышение их квалификации должны осуществляться в кожно - венерологических учреждениях, а также на кафедрах микробиологии и лабораторной клинической диагностики в структурах последипломного образования врачей.

При постановках ИФА и РПГА должны соблюдаться общепринятые мероприятия по технике безопасности. Антиген для этих реакций непатогенен (консервация). Контрольные сыворотки, входящие в состав наборов, инактивированы и также содержат консервант. Его содержат и другие компоненты наборов, в связи с чем необходимо избегать их контакта с кожей и слизистыми оболочками. Испытуемые сыворотки крови при постановке всех серологических тестов следует рассматривать как потенциально опасные для здоровья человека (гепатит, ВИЧ-инфекция и др.). При работе с сыворотками крови необходимо использовать резиновые перчатки, не пипетировать сыворотку ртом, все промывные растворы обрабатывать 5-6% раствором хлорамина или 6% раствором перекиси водорода в течение 3-х часов при температуре 18-25град.С; все твердые отходы сбрасывать в спецконтейнер с пломбируемой крышкой и затем подвергать автоклавированию, инструменты и оборудование до и после работы протирать 70% этиловым спиртом. Анализ исследуемых образцов следует проводить на рабочем месте, оборудованном в соответствии с требованиями, предусмотренными для работы с инфекционным материалом.

Подробности постановки ИФА и РПГА описаны в соответствующих Пособиях (М., 1998,1999).

РЕАКЦИЯ ИММУНОФЛЮОРЕСЦЕНЦИИ ДЛЯ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ СЕРО- И ЛИКВОРОДИАГНОСТИКИ СИФИЛИСА

Принцип метода заключается в соединении специфического комплекса антиген - антитело с иммунной антивидовой сывороткой, меченной флюорохромом, и выявление его с помощью люминесцентного микроскопа.

Материально - техническое обеспечение метода:

люминисцентный микроскоп с ртутно - кварцевой лампой ДРШ-250, термостат, инактиватор.

МЕТОДИКА ПОСТАНОВКИ РИФ - АБС

Ингредиенты:

1. Испытуемая сыворотка крови. Кровь для получения сыворотки крови берут из локтевой вены в чистую и сухую пробирку в объеме 5 мл и обрабатывают так же, как для постановки реакции Вассермана. Инактивируют сыворотки крови однократно при температуре 56 град. С в течение 30 минут. В связи с тем, что РИФ-абс ставится нестерильно, использование стерильной посуды, соблюдение условий стерильности при хранении сывороток крови не обязательно. Оно имеет значение только для более длительного сохранения сывороток крови до исследования.

2. Антиген. В качестве антигена используют взвесь патогенных бледных трепонем штамма Никольса из 7-суточного орхита кролика. Здоровых кроликов - самцов с отрицательными результатами реакции Вассермана и РИТ заражают интратестикулярно и при возникновении орхита извлекают из

яичек бледные трепонемы так же, как в случае получения антигена для РИТ. Полученную взвесь бледных трепонем сливают с кусочков яичка в стерильные пробирки с ватными пробками и оставляют в холодильнике при 4 град. С на сутки, после чего отделяют от осадка и при тех же условиях сохраняют весь период использования.

Получение и хранение антигена требует соблюдения условий стерильности, т. к. с одним и тем же антигеном реакция может ставиться в течение 2-4 месяцев. Для антигена следует выбирать ту взвесь, в которой не наблюдается агглютинация трепонем и имеется достаточное их количество. Антиген может быть получен в ампулах из других лабораторий. Перед каждой постановкой реакции взвесь хорошо перемешивают и исследуют в микроскопе с конденсором темного поля зрения для определения ее густоты. Для постановки РИФ-абс необходимо иметь взвесь, содержащую 40-60 трепонем в темном поле зрения, при наличии более густой взвеси ее необходимо развести.

3. Сорбент. В качестве сорбента для РИФ-абс может быть использован ультраозвученный трепонемный антиген для РСК. Он представляет собой разрушенную ультразвуком взвесь смеси культуральных бледных трепонем штаммов V, VII, VIII, IX и Рейтера.

Каждая серия сорбента перед использованием в РИФ- абс с диагностической целью должна быть оттитрована.

Титрование сорбентов. Сорбенты титруют на 10 сыворотках крови больных сифилисом, дающих в РИФ-5 с буфером резко (4+) и слабо (2+) положительный результат, а также на 20 сыворотках крови лиц, свободных от сифилитической инфекции, дающих в РИФ-5 отрицательный результат, а также неспецифическую позитивность (2+ и более). При этом для РИФ-5 с буфером люминесцирующая сыворотка должна быть оттитрована также, как для РИФ-абс с ее разведением от 1:100 до 1:140.

Пример определения титра сорбента. Цельный сорбент, разводят фосфатным буфером, PH=7,2 в 2, 3, 4 раза и более. Берут 3 сыворотки крови от больных сифилисом, одна из которых дает в РИФ-5 резкоположительный (4+) результат, две - слабоположительный (2+), и 5 сывороток крови от людей, свободных от сифилитической инфекции, 3 из которых дают неспецифические результаты в РИФ-5 (2+ и более). Все сыворотки крови разводят в 5 раз сорбентом, разведенным в свою очередь в 2, 3, 4 и более раз фосфатным буфером. Затем сыворотки крови исследуют в реакции. После учета результатов выбирают разведение сорбента, при котором сорбированные сыворотки крови больных сифилисом сохраняют степень позитивности, аналогичную полученной с сыворотками крови, разведенными фосфатным буфером, а сыворотки крови лиц, свободных от сифилитической инфекции, не дают свечения. Это разведение сорбента является его титром.

Титром сорбента в данном случае явилось разведение 1:3, при котором все сыворотки крови больных сифилисом сохраняли степень позитивности, полученную в контроле, и в то же время надежно снималась неспецифическая позитивность несифилитических сывороток крови.

Окончательный титр устанавливают в результате исследования 30 сывороток крови больных сифилисом и контрольных лиц.

Таблица N 13

РЕЗУЛЬТАТЫ ТИТРОВАНИЯ СОРБЕНТА

Испытуемые сыворотки крови	Результаты РИФ-5			
	Разведение сывороток крови 1:5 буфером (К)	Разведение сывороток крови 1:5 сорбентом в разведении		
		1:2	1:3	1:4
Сыворотки крови больного сифилисом				
N 1	4+	3+	4+	4+
N 2	2+	1+	2+	2+
N 3	2+	-	2+	2+

Несифилитическая сыворотка крови				
N 1	3+	-	1+	2+
N 2	2/3+	-	-	2+
N 3	2+	-	-	2+
N 4	2+	-	-	2+
N 5	-	-	-	-

4. Антивидовая люминесцирующая сыворотка. Для исследования в РИФ - абс сывороток крови людей необходима меченная флюорохромом сыворотка крови животных, иммунизированных сывороточным белком человека. Лиофильно высушенную люминесцирующую сыворотку растворяют при соблюдении условий стерильности в дистиллированной воде в том объеме, который указан на этикетке ампул, переливают в стерильную пробирку с резиновой пробкой и в процессе использования хранят при 4 град. С в течение 1-2 месяцев.

В день постановки реакции нужное количество этой сыворотки разводят по титру дистиллированной водой. Указанное на этикетке рабочее разведение сыворотки не годится для постановки реакции с целью серодиагностики сифилиса, поэтому титр каждой серии необходимо определять заново.

Титрование антивидовой люминесцирующей сыворотки. Берут 5 сывороток крови больных сифилисом и 5 сывороток крови здоровых людей, разводят их в 5 раз сорбентом (с учетом его титра) и ставят реакцию с использованием во II фазе различных разведений люминесцирующей сыворотки против сывороточных глобулинов человека той серии, титр которой определяется. Следует учесть, что титр люминесцирующих сывороток, выпускаемых в настоящее время ИЭМ им. Н. Ф. Гамалеи, колеблется при постановке РИФ - абс от 1:100 до 1:140. При учете реакции предварительным титром люминесцирующей сыворотки следует считать то разведение, при использовании которого с положительными сыворотками крови получено хорошее свечение трепонем, а с отрицательными свечение антигена не получено. Большее разведение люминесцирующей сыворотки, чем титр, приводит к понижению чувствительности реакции, а меньшее - к снижению специфичности. После определения предварительного титра следует его уточнить на большем числе положительных и отрицательных сывороток крови. Окончательным титром можно считать тот, который проверен на 100 сыворотках крови, причем из них не менее 20 должно быть от больных сифилисом.

Для предотвращения проростa после разведения сухой люминесцирующей сыворотки дистиллированной водой к ней необходимо добавить мертиолат из расчета 1 объема его раствора 1:1000 к 9 объемам люминесцирующей сыворотки. При взятии новых ампул той же серии титр следует только проверить и уточнить на 10 заведомо положительных и отрицательных сыворотках крови.

Пример определения предварительного титра люминесцирующей антивидовой сыворотки. Готовят 60 препаратов, нумеруют их от 1 до 60. Берут 10 сывороток крови - 5 от больных сифилисом, 5 от здоровых людей. Все сыворотки крови разводят в 5 раз разведенным по титру сорбентом.

На пронумерованные 1-10, 11-20, 21-30, 31-40, 41-50, 51-60 препараты наносят в I фазе реакции одни и те же 10 сывороток крови, разведенных в 5 раз сорбентом. Во II фазе реакции на 1-10 препараты наносят люминесцирующую сыворотку, разведенную 1:100, на 11-20 - 1:110, на 21-30 - 1:120, на 31-40- 1:130, на 41-50 - 1:140, на 51-60 - 1:150.

Оптимальным следует считать разведение, при котором свечение антигена будет хорошим при постановке реакции с положительными сыворотками крови и не будет наблюдаться с отрицательными.

ТЕХНИКА ПОСТАНОВКИ РИФ - АБС

Из антигена готовят препараты на тонких, хорошо обезжиренных предметных стеклах, на обратной стороне которых стеклорезом обозначены кружки диаметром 0,7 см (по 10 кружков на 1 предметном стекле). В пределах кружка, на стекло наносят антиген - взвесь бледных трепонем. Запаянным концом пастеровской пипетки круговыми движениями взвесь распределяют в пределах кружка, высушивают на воздухе и фиксируют 10 минут в химически чистом ацетоне. Затем препараты нумеруют. Инактивированные испытуемые сыворотки крови разводят в 5 раз сорбентом, разведенным по титру

буферным раствором. В штатив помешают ряд пробирок, число и номер которых соответствует числу и номеру испытуемых сывороток крови. В пробирки пипеткой разливают разведенный по титру сорбент по 0,2 мл, затем добавляют по 0,05 мл цельной испытуемой сыворотки крови и хорошо перемешивают. Разведение сыворотки крови можно осуществлять аппаратом Флоринского. Разведенные сорбентом сыворотки крови наносят на антиген так, чтобы равномерно покрыть мазок, и препараты помещают во влажную камеру, которую закрывают крышкой и помещают на 30 минут в термостат при 37 град. С (I фаза реакции). После первой фазы препараты осторожно промывают в 2 порциях фосфатного буфера, причем во вторую порцию препараты помещают на 10 минут, высушивают, после чего их вновь помещают во влажную камеру, наносят разведенную по титру люминесцирующую сыворотку и оставляют при комнатной температуре на 30 минут (II фаза реакции). По окончании второй фазы препараты промывают фосфатным буфером, как описано выше, высушивают и наносят на поверхность мазков по капле нелюминесцирующего иммерсионного масла (диметилфталата).

Исследование препаратов производят в люминесцентном микроскопе с ртутно - кварцевой лампой ДРШ-250 с иммерсионной системой, окуляром 4х или 5х, фильтрами СЗС-7 или 14, ФС-1, БС-8 и ЖС-18 или Т-2Н. Учет реакции осуществляется путем оценки свечения бледных трепонем. Положительными в РИФ-абс считают сыворотки крови, которые дают свечение на 4+, 3+ и 2+. Блестящее зелено - желтое свечение оценивается на 4+, яркое - 3+, слабое свечение - 2+. Отрицательными считают сыворотки крови, которые дают свечение на 1+ (трепонемы в препарате окрашены интенсивнее фона) или не дают его.

В каждой постановке РИФ-абс необходимо использовать следующие контроля:

Резкоположительный контроль. Сыворотка крови больного сифилисом, дающая свечение на 4+ при разведении буфером в 5 раз. При разведении в 5 раз сорбентом сыворотка крови не должна терять степень позитивности более чем на 1+.

Слабоположительный контроль. Цельная или разведенная сыворотка крови больного сифилисом, дающая слабую степень свечения антигена на 2+ при разведении буфером в 5 раз. При разведении сорбентом позитивность ее должна сохраняться.

Неспецифический контроль. Несифилитическая сыворотка крови, дающая при разведении буфером флюоресценцию не менее 2+. При разведении сорбентом позитивность ее должна быть ликвидирована.

Контроли антигена, сорбента, люминесцирующей сыворотки могут ставиться только при использовании новых серий этих ингредиентов.

МЕТОДИКА ПОСТАНОВКИ РИФ-АБС С КАПИЛЛЯРНОЙ КРОВЬЮ

Постановка РИФ-абс возможна не только с сывороткой крови, но и с кровью, взятой из пальца. Эту модификацию РИФ-абс можно использовать при обследовании на сифилис детей, при трудности получения крови из вены у взрослых, при массовом обследовании различных контингентов на сифилис.

При постановке РИФ-абс с кровью применяют те же ингредиенты реакции, что и при постановке РИФ-абс с сывороткой крови (антиген, сорбент, люминесцирующая сыворотка). Титр люминесцирующей сыворотки определяют по вышеизложенной схеме, но при постановке реакции с кровью. Кровь для исследования после прокола пальца пациента набирают микропипеткой до метки 0,1 мл, быстро выдувают в пробирку, содержащую 0,3 мл дистиллированной воды, тщательно перемешивают пипеткой и фильтруют через бумажный фильтр, смоченный дистиллированной водой. Постановка реакции с разведенной кровью возможна как в день взятия ее, так и через 1-2 дня при условии хранения при 4 град. С

Непосредственно перед постановкой реакции ко всем образцам крови, включенным в постановку реакции, добавляют по 0,1 мл цельного сорбента, перемешивают пипеткой и встряхиванием, помещают на 30 минут в термостат при 37 град. С. Затем кровь, обработанную сорбентом, наносят на мазки антигена и помещают ее во влажную камеру при 37 град. С (I фаза реакции). По истечении срока экспозиции препараты промывают в первой порции фосфатного буфера так, чтобы на стеклах не осталось следов крови, и помешают их на 10 минут во вторую порцию буфера. После высушивания мазков проводят II фазу реакции. При этом на препараты наносят разведенную по титру, установленному для данной модификации РИФ, люминесцирующую сыворотку против глобулинов человека. Стекла во влажной камере вновь помещают в термостат при 37 град. С.

Через 30 минут препараты вновь промывают в 2 порциях фосфатного буфера в течение 10 минут, высушивают и монтируют для люминесцентной микроскопии. Исследование препаратов и учет результатов реакции проводят так же, как при постановке РИФ-абс с сывороткой крови.

МЕТОДИКА ПОСТАНОВКИ РИФ-200

Методика постановки РИФ-абс и РИФ-200 близки. При постановке РИФ-200 обработка испытуемых сывороток крови, приготовление антигена, подготовка антивидовой люминесцирующей сыворотки и ее титрование производят так же, как при постановке РИФ-абс. Следует учесть только, что титры люминесцирующей сыворотки, выпускаемой в настоящее время, в РИФ-200 колеблются от 1:20 до 1:50.

Техника постановки РИФ-200. Испытуемые сыворотки крови разводят в 200 раз фосфатным буфером. Для этого в штатив помещают 3 ряда пробирок, число и нумерация которых в каждом ряду соответствует числу и нумерации испытуемых сывороток крови в рабочем журнале. В первом ряду налиты цельные испытуемые сыворотки крови, во втором ряду в пробирки наливают по 0,45 мл буфера, в третьем - по 0,95 мл буфера. Во втором ряду готовят разведение сывороток крови в 10 раз, для чего из каждой пробирки первого ряда отдельной 1 мл градуированной пипеткой берут 0,05 мл испытуемой сыворотки крови, переносят в соответствующую пробирку второго ряда и смешивают с имеющимся там буфером. Из каждой пробирки второго ряда той же самой пипеткой переносят по 0,05 мл разведенной уже в 10 раз испытуемой сыворотки крови в соответствующую пробирку третьего ряда и получают разведение в 200 раз.

При постановке реакции на помещенные во влажную камеру препараты наносят разведенные в 200 раз испытуемые сыворотки крови так, чтобы их номера, обозначенные на пробирках, соответствовали номерам на предметных стеклах. После нанесения на препараты сыворотки крови влажную камеру помещают на 30 минут в термостат с температурой 37 град. (I фаза реакции). Затем препараты промывают 10 минут в 2 порциях буфера и высушивают. После этого их вновь помещают во влажную камеру и на все наносят разведенную по титру люминесцирующую сыворотку (II фаза реакции). Вторую фазу проводят 30 минут при комнатной температуре, после чего препараты 10 минут промывают, высушивают и монтируют для люминесцентной микроскопии.

Учет результатов РИФ-200 производят так же, как РИФ-абс.

В том случае, когда клиницистов интересует титр флюоресцирующих антител в сыворотке крови больного, РИФ-абс и РИФ-200 следует ставить с последовательным разведением испытуемых сывороток крови и титром флюоресцирующих антител считать то наибольшее разведение сыворотки крови, которое еще дает положительный результат реакции. Обозначать титр принято числом, характеризующим степень разведения испытуемой сыворотки крови, например, 5,10,20,40 и т. д. (РИФ-абс) или 200,400, 800 и т. д. (РИФ-200).

При постановке обеих модификаций реакции для разведения испытуемых сывороток крови и для промывания препаратов после I и II фаз следует использовать фосфатный буфер следующего состава: 1 л дистиллированной воды 6,8 г натрия хлорида, 1,48 г двузамещенного фосфорнокислого натрия, 0,43 г однозамещенного фосфорнокислого калия (pH=7,2). Приготовленный раствор хранят при комнатной температуре не более недели.

В связи с возможностью получения отрицательных результатов при наличии флюоресцирующих антител не следует исследовать кровь и сыворотку крови в РИФ-абс и РИФ-200 во время лечения больных пенициллином.

МЕТОДИКА ПОСТАНОВКИ РИФ-Ц

Ранняя диагностика поражений нервной системы при сифилисе является актуальным вопросом в деле борьбы с этим заболеванием. В связи с тем, что РИФ-ц обладает большей чувствительностью, чем все другие используемые для ликвородиагностики сифилиса тесты, эта модификация РИФ может быть рекомендована для диагностики сифилитических поражений центральной нервной системы при всех формах сифилиса.

Для постановки РИФ-ц используют тот же антиген, люминесцирующую сыворотку, что и для постановки РИФ-абс и РИФ-200 с сывороткой крови. Аналогичны также определение флюоресцирующих антител в ликворе и сыворотке крови и учет реакции.

Спинномозговая жидкость вводится в реакцию неинактивированной и цельной. До постановки реакции ее можно сохранять в морозильном отделении холодильника в пробирках под резиновыми пробками до 2 недель. Оттаиванние производят при комнатной температуре.

Техника постановки РИФ-ц. В I фазе реакции на антиген наносят 0,05 мл неразведенной испытуемой спинномозговой жидкости, препараты помещают во влажную камеру на 30 минут при комнатой температуре. Затем их промывают - фосфатным буфером, pH = 7.2, в течение 10 минут, высушивают. Во II фазе на препараты наносят разведенную по титру люминесцирующую сыворотку, которую титруют при постановке реакции со спинномозговой жидкостью. Выдерживают препараты при комнатной температуре 30 минут во влажной камере, промывают, высушивают, монтируют для люминесцентной микроскопии.

Источники ошибок:
- несоблюдение условий приготовления, хранения реагентов и постановки реакции;
- низкое качество люминесцирующей сыворотки и неточное определение ее титра;
- нанесение исследуемого материала или люминесцирующей сыворотки при постановке реакции не на препарат, а на другую сторону предметного стекла;
- неправильная установка освещения в люминесцентном микроскопе;
- низкое качество антигена.

РЕАКЦИЯ СВЯЗЫВАНИЯ КОМПЛЕМЕНТА (РЕАКЦИЯ ВАССЕРМАНА)

Принцип:

Реагины, находящиеся в сыворотке крови больных сифилисом, обладают свойством вступать в соединение с кардиолипиновым антигеном. Специфические антитрепонемные антитела вступают в соединение со специфическими антигенами (ультраозвученный трепонемный антиген). Образовавшиеся комплексы антиген - антитело сорбируют вводимый в реакцию комплемент. Индикация образовавшихся комплексов достигается введением гемолитической системы (гемолитическая сыворотка + эритроциты барана).

Оборудование:
- термостат с температурой 37 град. С;
- холодильник с температурой 4 град. С;
- инактиватор (водяная или суховоздушная баня) с температурой 56 град. С;
- центрифуга;
- пробирки размером 14x60 мм, 15x100 мм, 15x150 мм;
- пипетки градуированные 1,2 мл с делениями на 0,01 мл;
- пипетки градуированные 5,19 мл с делениями на 0,1 мл;
- цилиндры мерные емкостью 100,250,500,1000 мл с делениями на 5 мл;
- стаканы химические, емкостью 100,250,500 мл;
- приборы дозировочные для серологических исследований (Флоринского) - ФЛ-3 и ФЛ-4.

Ингредиенты
1. 0,9% изотонический раствор натрия хлорида.
2. Испытуемая сыворотка крови.

Взятие крови производят натощак или не ранее 6 часов после приема пищи. Нельзя брать кровь у больных с повышенной температурой, после употребления спиртных напитков ранее 24 часов, перенесших недавно инфекционное заболевание, у женщин во время менструации, беременных в последние 10 дней беременности, рожениц в первые 10 дней после родов, новорожденных в первые 10 дней жизни.

Кровь из локтевой вены в количестве 7-10 мл берут в сухую чистую пробирку. Пункцию производят стерильной иглой при соблюдении правил асептики. У грудных детей кровь берут из надреза пятки узким скальпелем.

В лабораторию кровь должна быть доставлена не позднее 48 часов с момента взятия при условии ее хранения в холодильнике при 4 град. С.

Сыворотка крови может быть использована для постановки реакции в день взятия крови.

Доставленную в лабораторию кровь в день ее взятия помещают в термостат при 37 град. С на 15-30 минут. Образовавшийся сгусток отделяют стеклянной палочкой от стенок пробирки и центрифугируют 15 минут при 1000 об/мин. Над сгустком образуется прозрачная сыворотка крови, которую при помощи пипетки с резиновым баллоном без примеси эритроцитов переносят в другую пробирку. При наличии в сыворотке крови примеси эритроцитов ее центрифугируют и отделяют от них. Кровь, доставленную в лабораторию накануне постановки реакции, отделяют стеклянной палочкой от стенок пробирки и помещают в холодильник при 4 град. С. Перед постановкой реакции образовавшуюся над сгустком крови сыворотку переносят в другую пробирку.

Снятую со сгустка сыворотку крови инактивируют в суховоздушном инактиваторе или водяной бане в течение 30 минут при 56 град. С для уничтожения естественного комплемента и стабилизации глобулиновых фракций испытуемой сыворотки крови.

Инактивированные сыворотки крови могут храниться в холодильнике в течение 5-6 дней. Сыворотки крови, ранее инактивированные, в день постановки реакции должны быть повторно прогреты в течение 15 минут при 56 град. С. Для более длительного хранения к сыворотке крови после инактивации добавляют сухую борную кислоту (из расчета 2%), что позволяет ею пользоваться в течение 3-4 недель, или замораживают в морозильной камере холодильника на тот же срок, не допуская повторного замораживания и оттаивания.

В случаях, если нельзя немедленно доставить кровь для исследования в лабораторию, можно пользоваться высушенной сывороткой крови. Для этого 2 мл сыворотки крови без примеси эритроцитов наносят на сложенную вдвое вощаную бумагу, целлофан (8 x 10 см) в виде четырех кружочков по 0,5 мл в каждом. К сыворотке крови добавляют по 3 капли свежеприготовленного 40% раствора пищевого сахара на каждые 0,5 мл сыворотки. Предварительно на вощаной бумаге, целлофане надписывают фамилию, имя, отчество, дату взятия крови и объем нанесенной сыворотки крови, которую высушивают при комнатной температуре. Затем вощаную бумагу, целлофан тщательно свертывают в виде аптечного пакетика и в конверте по почте отправляют в ближайшую серологическую лабораторию. Такие сыворотки крови должны быть исследованы не позднее 5 дней с момента взятия крови в южных районах страны, а также в летнее время года, и не позднее 10 дней на остальных территориях страны.

В лаборатории полученную высушенную сыворотку крови ссыпают в пробирку. Для ее растворения добавляют изотонический раствор натрия хлорида, восстанавливая первоначальный объем сыворотки крови. Сыворотка крови растворяется в течение одного часа стояния при комнатной температуре. Затем ее инактивируют при 56 град. С в течение 30 минут, после чего она может быть использована для постановки реакции.

Желтушные, хилезные, резко гемолизированные и проросшие сыворотки крови для исследования не пригодны.

3. Антигены.

Реакция Вассермана должна ставиться с двумя антигенами: ультраозвученным трепонемным и кардиолипиновым.

Ультраозвученный трепонемный антиген приготовлен из культур бледных трепонем, подвергнутых действию ультразвука.

Ультраозвученный трепонемный антиген выпускают лиофильно высушенным во флаконах по 5 и 10 мл; хранят его в холодильнике при 4 град. С. Срок годности антигена указан на этикетке. Антиген растворяют и разводят изотоническим раствором натрия хлорида соответственно объему и титру, указанному на этикетке флакона.

Кардиолипиновый антиген для реакции Вассермана представляет собой очищенный от балластных примесей спиртовый экстракт липидов из мышц бычьего сердца. Активность антигена обуславливается присутствием трех компонентов - фосфолипида, лецитина и холестерина.

Кардиолипиновый антиген выпускается в ампулах по 2 мл; хранят его в темном месте при 15-18 град. С. Срок годности антигена указан на этикетке.

Перед употреблением антиген из ампулы переносят в сухую чистую пробирку, плотно закрывают корковой или притертой стеклянной пробкой.

В случае выпадения кристаллов холестерина антиген необходимо прогреть на водяной бане при 56 град. С или в термостате при 37 град. С до полного растворения кристаллов.

Для постановки реакции антиген разводят соответственно титру, указанному на этикетке ампулы. Разведенный антиген должен быть слегка опалесцирующим, но не мутным.

Титр - это количество чистого антигена в 1 мл раствора. Например, если титр ультраозвученного трепонемного антигена 0,05, то для приготовления 10 мл разведенного по титру антигена нужно взять 0,5 мл антигена и 9,5 мл изотонического раствора натрия хлорида.

Двойные дозы антигенов не должны обладать гемотоксичностью (гемолиз в отсутствие комплемента), что устанавливается соответствующим контролем антигена при титровании комплемента. Антигены не должны быть антикомплементарными (подавление гемолиза), что также устанавливают при параллельном титровании комплемента без антигенов и в присутствии антигенов, применяемых в реакции связывания комплемента.

4. Гемолитическая сыворотка (гемолизин)

Это сыворотка крови кролика или осла, иммунизированных эритроцитами барана.

Гемолитическая сыворотка (жидкая или сухая) выпускается в ампулах по 1 мл с указанием титра. Для растворения сухого гемолизина в ампулу добавляют 1 мл изотонического раствора натрия хлорида. Гемолитическая сыворотка как сухая, так и растворенная хранится в холодильнике при 4 град. С. Срок годности сухой гемолитической сыворотки указан на этикетке.

Титр используемой гемолитической сыворотки не должен быть ниже 1:1200. Определение титра производят по следующей схеме: готовят основное разведение 1:100 (0,1 мл гемолитической сыворотки + 9,9 мл изотонического раствора натрия хлорида), из которого делают ряд соответствующих разведений (таблица N 1).

Таблица N 1

СХЕМА РАЗВЕДЕНИЙ ГЕМОЛИЗИНА

N пробирок	Гемолизин (мл)	Изотонический раствор натрия хлорида	Разведение гемолизина
1	0,1 (не разведенный)	9,9	1:100
2	0,5 (1-го разведения)	4,5	1:1000
3	0,5 -//-	5,5	1:1200
4	0,5 -//-	7,0	1:1500
5	0,5 -//-	8,5	1:1800
6	0,5 -//-	10,0	1:2100
7	0,5 -//-	11,5	1:2400
8	0,5 -//-	13,0	1:2700
9	0,5 -//-	14,5	1:3000
10	0,5 -//-	22,0	1:4000

Затем в ряд других пробирок отмеряют по 0,5 мл ранее приготовленных разведений гемолитической сыворотки, начиная с 1:1000, добавляют по одному мл изотонического раствора натрия хлорида и 0,5 мл комплемента в разведении 1:10, а также по 0,5 мл 3% взвеси эритроцитов барана (таблица N 2); пробирки помещают в термостат при 37 град. С на 1 час, периодически встряхивая 2-3 раза.

Титром гемолитической сыворотки является наивысшее ее разведение, давшее полное растворение 0,5 мл 3% взвеси эритроцитов барана в присутствии комплемента. В данном случае титр гемолитической сыворотки - 1:1500 (таблица N 2).

Для основного опыта и титрования ингредиентов берут разведение, усиленное против полученного титра в три раза (тройной титр). В данном примере - 1:500 (0,1 на 50).

Таблица N 2

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТИТРА ГЕМОЛИЗИНА

N пробирок соотв. табл. N 1	Разведение гемолизина	Гемолизин в соотв. разведениях (мл)	Изотонический раствор натрия хлорида	Комплемент 10 (мл)	3% взвесь эритроцитов барана (мл)		Результат
1	1:1000	0,5	1,0	0,5	0,5	Поместить в термостат при 37 град. С на 1 час. Налюдать ход гемолиза через 15-30-60 минут	Гемолиз
2	1:1200	0,5	1,0	0,5	0,5		Гемолиз
3	1:1500	0,5	1,0	0,5	0,5		Гемолиз
4	1:1800	0,5	1,0	0,5	0,5		Задержка гемолиза
5	1:2100	0,5	1,0	0,5	0,5		Задержка гемолиза
6	1:2400	0,5	1,0	0,5	0,5		Задержка гемолиза
7	1:2700	0,5	1,0	0,5	0,5		Задержка гемолиза
8	1:3000	0,5	1,0	0,5	0,5		Задержка гемолиза
9	1:4000	0,5	1,0	0,5	0,5		Задержка гемолиза
Контроли							
10	1:1000	0,5	1,5	-	0,5		Задержка гемолиза
11	1:1000	-	1,5	0,5	0,5		Задержка гемолиза
12	1:1000	-	2,0	-	0,5		Задержка гемолиза

5. Эритроциты барана

Баран должен быть в возрасте от 1 до 5 лет. Кровь у него берут путем пункции яремной вены не чаще одного раза в 10 дней, в количестве не более 200 мл в сухую стерильную банку со стеклянными бусами, которую встряхивают в течение 5-10 минут. Затем кровь фильтруют через двойной слой марли (отделяют образовавшиеся сгустки нитей фибрина).

В день постановки реакции эритроциты барана трех - пятикратно отмывают изотоническим раствором натрия хлорида путем центрифугирования. Центрифугируют 10 минут при 3,0 тысячах оборотов в минуту. Последнюю бесцветную порцию промывной жидкости сливают, а осадок вновь центрифугируют при 1,5 тысячах оборотов в минуту для его уплотнения. Надосадочную жидкость вновь удаляют, а из плотного осадка готовят 3% взвесь эритроцитов барана в изотоническом растворе натрия хлорида (на 3 мл плотного осадка эритроцитов добавляют 97 мл изотонического раствора натрия хлорида). Отмытые эритроциты в последующие дни в работе не используют. При наличие гемолиза эритроциты барана к употреблению не пригодны.

Дефибринированную кровь сохраняют в широкогорлом сосуде, накрытом стерильной двухслойной марлевой салфеткой в течение 5-7 дней в холодильнике при 4 град. С.

Для хранения дефибринированной крови барана длительное время рекомендуется консервировать ее по методу Мигулиной. Для этого к 100 мл дефибринированной крови барана добавляют 15 мл смеси, приготовленной по следующей прописи: глюкозы - 6,0 г, борной кислоты - 4,5 г, 100 мл изотонического раствора натрия хлорида; приготовленную смесь кипятят на водяной бане 3 дня подряд по 20 минут. Консервированная кровь барана по методу Мигулиной годна к употреблению в течение 3-4 недель. Перед постановкой реакции при использовании консервированной крови эритроциты необходимо отмывать изотоническим раствором натрия хлорида так же, как неконсервированной.

6. Комплемент

Применяют смесь сыворотки крови, полученной пункцией сердца у 5-10 здоровых морских свинок. Кровь для лучшего свертывания помещают в термостат при 37 град. С на 30 минут. После образования сгустка последний отделяют от стенок пробирки, которую помещают в холодильник при 4 град. С до следующего дня.

Полученную прозрачную сыворотку крови сливают и используют как комплемент. Активность этого комплемента при хранении в холодильнике при 4 град. С сохраняется в течение 1-2 суток.

При консервировании сухой борной кислотой и сернокислым натрием комплемент сохраняется в холодильнике при 4 град. С 1-2 месяца (4,0 г борной кислоты + 5,0 г сернокислого натрия на 100 мл комплемента).

Может быть использован лиофильно высушенный комплемент. Сухой комплемент выпускается в ампулах по 1 мл. Растворение сухого комплемента производят в день постановки реакции изотоническим раствором натрия хлорида при легком встряхивании. В ампулу с сухим комплементом добавляют 1 мл изотонического раствора натрия хлорида. Нужное для постановки реакции количество комплемента смешивают из нескольких ампул одной серии.

Непосредственно перед постановкой реакции Вассермана проводят титрование комплемента в присутствии всех ингредиентов, участвующих в опыте.

Комплемент титруют обязательно: а) в чистом виде (без антигенов), т.е. в присутствии только гемолитической системы и б) с каждым антигеном, входящим в опыт. Титрование комплемента проводят также в присутствии инактивированной отрицательной сыворотки крови человека.

При титровании комплемента ингредиенты разводят в следующем порядке:

1. Разводят гемолитическую сыворотку по утроенному титру в изотоническом растворе натрия хлорида.
2. Из плотного осадка эритроцитов готовят 3% взвесь в изотоническом растворе натрия хлорида.
3. Разливают 3% взвесь эритроцитов барана и изотонический раствор натрия хлорида в 5 контрольных пробирок и разведенную по утроенному титру гемолитическую сыворотку (во второй контроль) - таблица N 3.
4. Готовят гемолитическую систему: раствор гемолитической сыворотки, разведенной по утроенному титру, приливают к равному объему 3% взвеси эритроцитов барана и производят быстрое смешивание путем переливания из одной колбы в другую.
   Полученную смесь помещают в термостат при 37 град. С на 30 минут для сенсибилизации эритроцитов.
5. Разводят антигены изотоническим раствором натрия хлорида по указанному на этикетке титру.
6. Разводят заведомо отрицательную инактивированную сыворотку крови человека в соотношении 1:5 (2 мл сыворотки крови + 8 мл изотонического раствора натрия хлорида).
7. Разводят комплемент 1:10 (1 мл комплемента + 9 мл изотонического раствора натрия хлорида).

Таблица N 3

ТИТРОВАНИЕ КОМПЛЕМЕНТА В ОБЪЕМЕ 1,25 МЛ

Ингредиенты (мл) (общий объем - 1,25 мл)	Контрольные пробирки				
	1-я	2-я	3-я	4-я	5-я
Гемолитическая сыворотка, разведенная по утроенному титру	-	0,25	-	-	-
3% взвесь эритроцитов барана	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Комплемент 1:100	0,25	-	-	-	-
Изотонический раствор натрия хлорида	0,75	0,75	1,0	0,5	0,5
Антиген трепонемный, разведенный по титру	-	-	-	0,5	-
Антиген кардиолипиновый, разведенный по титру	-	-	-	-	0,5
Встряхнуть, поместить в термостат при 37 град. на 45 минут					
Результат	--Г	--Г	-- Г	--Г	--Г
	После 45 минут пребывания в термостате при 37 град. во всех контрольных пробирках должен отсутствовать гемолиз (--Г)				

Титрование комплемента проводят в 30 пробирках, поставленных по 10 штук в три ряда. Два ряда пробирок для титрования комплемента в присутствии двух антигенов и третий ряд - для титрования комплемента без антигенов. Пять контрольных пробирок: две - для контроля антигенов и по одной - для контроля комплемента, гемолитической сыворотки и изотонического раствора натрия хлорида на гемотоксичность - заполняют до объединения раствора гемолитической сыворотки и взвеси эритроцитов барана (таблица N 3).

Комплемент, разведенный 1:10, разливают в десять пробирок первого ряда в дозах: 0,1; 0,16; 0,2; 0,24; 0,3; 0,36; 0,4; 0,44; 0,5; 0,55 мл (таблица N 4).

Таблица N 4

ТИТРОВАНИЕ КОМПЛЕМЕНТА В ПРИСУТСТВИИ АНТИГЕНА И ОТРИЦАТЕЛЬНОЙ СЫВОРОТКИ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

Ингредиент (мл) (общий объем - 1,25 мл)	NN пробирок									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Комплемент 1:10	0,1	0,16	0,2	0,24	0,3	0,36	0,4	0,44	0,5	0,55
Изотонический раствор натрия хлорида	0,9	0,84	0,8	0,76	0,7	0,64	0,6	0,56	0,5	0,45
После тщательного перемешивания из каждой пробирки переносят по 0,25 мл в соответственно стоящие сзади пробирки второго, третьего ряда и 0,25 мл выливают										
Отрицательная инактивированная сыворотка крови человека 1:5	По 0,25 мл во все 30 пробирок									
Антиген трепонемный, разведенный по титру	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
	Первый ряд пробирок									
Антиген кардиолипиновый, разведенный по титру	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
	Второй ряд пробирок									

Изотонический раствор натрия хлорида	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
	Третий ряд пробирок									
Гемолитическая система	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
	Третий ряд пробирок									
Встряхнуть, поместить в термостат при 37 град. С на 45 минут										
Гемолитическая система	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
	Первый и второй ряды									
Встряхнуть, поместить в термостат при 37 град. С на 45 минут										
Результат	--Г	--Г	--Г	--Г	+Г	+Г	+Г	+Г	+Г	+Г

Примечание: --Г (задержка гемолиза); +Г (гемолиз)

Общий объем содержимого пробирок доводят до 1 мл соответствующими объемами изотонического раствора натрия хлорида: 0,9; 0,84; 0,8; 0,76; 0,7; 0,64; 0,6; 0,56; 0,5; 0,45 мл.

Полученную в каждой пробирке смесь тщательно перемешивают и переносят по 0,25 мл в соответственно стоящие позади два ряда пробирок и 0,25 мл выливают. Затем во все 30 пробирок разливают по 0,25 мл инактивированной отрицательной сыворотки крови человека, разведенной изотоническим раствором натрия хлорида 1:5. Далее в 10 пробирок первого ряда приливают по 0,25 мл разведенного по титру трепонемного антигена; разведенный по титру кардиолипиновый антиген приливают по 0,25 мл в 10 пробирок второго ряда; изотонический раствор натрия хлорида приливают по 0,25 мл в 10 пробирок третьего ряда.

Штатив с пробирками встряхивают и добавляют по 0,5 мл гемолитической системы в третий ряд пробирок (без антигенов). Штатив с пробирками вновь встряхивают и помещают на 45 минут в термостат при 37 град. С.

После инкубации в термостате в 20 пробирок первого и второго рядов добавляют по 0,5 мл гемолитической системы. Содержимое пробирок вновь встряхивают и помещают в термостат при 37 град. С на 45 минут. По истечении 45 минут определяют рабочую долю комплемента, которая устанавливается следующим образом: в основу берут титр комплемента без антигенов, затем титр комплемента в присутствии антигенов, к которому делают надбавку в пределах 15-30% (в среднем 20%) в зависимости от степени гемолиза в пробирках с меньшим количеством комплемента (таблица N 4).

Титром комплемента является наименьшее его количество, способствующее полному гемолизу эритроцитов барана в присутствии антигена и отрицательной сыворотки крови человека.

В данном случае титр комплемента будет 0,3, а рабочая доза комплемент 0,36, т.е. 3,6%.

Для каждого рабочего дня готовят необходимый объем комплемента, разведенного по рабочей дозе, исходя из расчета 0,75 мл комплемента на каждую испытуемую сыворотку крови при условии постановки реакции Вассермана с двумя антигенами. Так, на 100 испытуемых сывороток крови необходимо 75 мл комплемента, разведенного по рабочей дозе. Следовательно, к 72,3 мл изотонического раствора натрия хлорида нужно прибавить 2,7 мл комплемента.

В случае получения разных титров комплемента в присутствии трепонемного и кардиолипинового антигенов используют разные рабочие дозы комплемента в соответствии с полученными титрами.

КАЧЕСТВЕННАЯ МЕТОДИКА ПОСТАНОВКИ РЕАКЦИИ ВАССЕРМАНА

В день постановки опыта проводят подготовительную работу (сливание испытуемых сывороток крови со сгустка, их инактивация, отмывание эритроцитов барана от плазмы крови, приготовление изотонического раствора натрия хлорида). Разводят ингредиенты: гемолитическую сыворотку, эритроциты барана, антигены по титру. Определяют рабочую дозу комплемента титрованием без антигенов, в присутствии антигенов.

Расход ингредиентов на 100 исследований:

- натрий хлорид х.ч. - 18 г;
- кардиолипиновый антиген (РСК) - 0,1 мл;

- ультраозвученный трепонемный антиген - 2,5 мл;
- комплемент - 4,5 мл;
- гемолитическая сыворотка - 0,3 мл;
- эритроциты барана с плотного осадка - 3,5 мл.

Исследование каждой испытуемой сыворотки крови проводят в трех пробирках с двумя антигенами (таблица N 5). Одновременно исследуют для контроля заведомо положительные (4+, 2+) и отрицательную сыворотки крови. Каждую испытуемую инактивированную сыворотку крови, разведенную 1:5 изотоническим раствором натрия хлорида, разливают по 0,25 мл в три пробирки, из которых третья является контрольной. В первую пробирку добавляют по 0,25 мл трепонемного антигена, во вторую - 0,25 мл кардиолипинового антигена, разведенных по титру. В третью (контрольную) - 0,25 мл изотонического раствора натрия хлорида. Комплемент разведенный по рабочей дозе, добавляют по 0,25 мл во все опытные и контрольный пробирки. Предварительное смешивание антигена и комплемента не рекомендуется. После первичной 45 - минутной инкубации в термостате при 37 град. С добавляют во все пробирки по 0,5 мл гемолитической системы. Легким встряхиванием перемешивают содержимое пробирок и помещают их в термостат при 37 град. С на 45-60 минут до наступления полного гемолиза в контрольной пробирке. Регистрируют результат реакции по наличию или отсутствию гемолиза в опытных пробирках.

Оценка результатов

Для обозначения степени позитивности реакции Вассермана пользуются системой четырех плюсов:

Полная задержка гемолиза - 4+ (резко положительная реакция); значительная задержка гемолиза - 3+ (положительная реакция); частичная задержка гемолиза - 2+ (слабоположительная реакция); незначительная задержка гемолиза - 1+; сомнительная реакция - +/-. Отрицательный результат реакции характеризуется полным гемолизом во всех пробирках опыта.

Таблица N 5

КАЧЕСТВЕННАЯ МЕТОДИКА ПОСТАНОВКИ РЕАКЦИИ ВАССЕРМАНА

Ингредиенты (мл) (общий объем - 1,25 мл)	NN пробирок		
	1	2	3 (контроль)
Испытуемая инактивированная сыворотка крови, разведенная 1:5	0,25	0,25	0,25
Положительная инактивированная сыворотка крови, разведенная 1:5	0,25	0,25	0,25
Слабоположительная инактивированная сыворотка крови, разведенная 1:5	0,25	0,25	0,25
Отрицательная инактивированная сыворотка крови, разведенная 1:5	0,25	0,25	0,25
Антиген трепонемный, разведенный по титру	0,25	-	-
Антиген кардиолипиновый, разведенный по титру	-	0,25	-
Изотонический раствор натрия хлорида	-	-	0,25
Комплемент, разведенный по рабочей дозе	0,25	0,25	0,25

Встряхнуть, поместить в термостат при 37 град. С на 45 минут			
Гемолитическая система	0,5	0,5	0,5
Встряхнуть, поместить в термостат при 37 град. С на 45-60 минут до наступления полного гемолиза в контрольной пробирке			

Оценку результатов регистрируют в книге протоколов лаборатории.

Результаты реакции следует давать по каждому антигену отдельно.

В случае расхождения результатов между антигенами необходимо повторить исследование новой порции сыворотки крови. Особое внимание следует обращать на образцы сыворотки крови, дающие положительный результат в РСК с трепонемным антигеном и отрицательный результат с кардиолипиновым и в МР. Поскольку трепонемный антиген является специфическим следует исследовать данную сыворотку крови в специфических тестах, в частности в РПГА из-за простоты ее постановки и быстрого получения результата.

После лечения больных по поводу сифилиса РСК с трепонемным антигеном, как и другие специфические тесты, может длительное время оставаться позитивной.

Повторное исследование необходимо также при наличии задержки гемолиза в контроле сыворотки крови (третья пробирка, не содержащая антигена).

Правильность течения опыта оценивают на основании следующих результатов:

- контроля испытуемой сыворотки крови - третий ряд пробирок (отрицательный);
- контроля с заведомо отрицательной сывороткой крови (отрицательный);
- контроля с заведомо положительной (3+ или 4+) и слабоположительной (2+) сыворотками крови.

В качестве контрольных используют лиофилизированные сыворотки крови.

Сыворотки крови положительные и слабоположительные получают из крови кроликов, зараженных патогенными бледными трепонемами (штамм Никольса), отрицательные - из крови здоровых кроликов.

Сухие сыворотки крови выпускают в ампулах по 1 мл. В день постановки реакции сыворотку крови растворяют добавлением изотонического раствора натрия хлорида для восстановления первоначального (до высушивания) объема.

После полного растворения сыворотки крови инактивируют при 56град. С в течение 30 минут. Положительные и слабоположительные сыворотки крови должны давать задержку гемолиза на 4+ и 2+ соответственно при разведении 1:5 по качественной методике постановки реакции Вассермана с кардиолипиновым и трепонемным антигенами.

Если рабочая доза комплемента выбрана неправильно (избыток комплемента), то со слабоположительной сывороткой крови будет получен отрицательный результат реакции; при недостатке комплемента наблюдается задержка гемолиза с контрольной отрицательной сывороткой крови и в контроле испытуемых сывороток крови (3-й ряд пробирок).

Источники ошибок:

- нарушение условий и методики постановки реакции;
- несоблюдение условий и срока хранения испытуемой сыворотки крови, антигенов, комплемента, эритроцитов барана;
- изменение процентного содержания натрия хлорида;
- неправильно выбранная рабочая доза комплемента (избыток или недостаток его в опыте);
- исключение из постановки реакции контрольных положительных и слабоположительных сывороток крови;
- использование при постановке реакции загрязненных пробирок, пипеток, химических стаканов, мерных цилиндров.

КОЛИЧЕСТВЕННАЯ МЕТОДИКА ПОСТАНОВКИ РЕАКЦИИ ВАССЕРМАНА

Определение титра реагинов и противотрепонемных антител в положительных сыворотках крови производится путем исследования в реакции связывания комплемента уменьшающихся объемов сыворотки крови, разведенной изотоническим раствором натрия хлорида. Количественный метод постановки реакции Вассермана ставят с положительными сыворотками крови, давшими 4+ с кардиолипиновым или трепонемным антигенами.

Сыворотки крови повторно инактивируют 15 минут при 56 град. С в инактиваторе. Каждую

сыворотку крови исследуют в 8 пробирках, (таблица N 6). В первую пробирку наливают 0,8 мл изотонического раствора натрия хлорида, со второй по 7-ю пробирку - по 0,25 мл изотонического раствора натрия хлорида. В первую пробирку вносят 0,2 мл испытуемой сыворотки крови, перемешивают, затем 0,25 мл удаляют, а по 0,25 мл переносят во вторую и восьмую пробирки. После перемешивания переносят 0,25 мл из второй пробирки в третью, из третьей - в четвертую и т.д. - до седьмой пробирки, из которой 0,25 мл разведенной сыворотки крови удаляют. Затем приливают по 0,25 мл разведенного кардиолипинового антигена, разведенного по титру, с первой по седьмую, а в 8-ю пробирку 0,25 мл изотонического раствора натрия хлорида. После легкого встряхивания по все пробирки приливают по 0,25 мл комплемента, разведенного по рабочей дозе. Первичная инкубация в термостате при 37 град. С продолжается 45 минут, после чего во все пробирки приливают по 0,5 мл гемолитической системы. Встряхнув пробирки, их помещают в термостат при 37 град. С на 45-60 минут и после наступления полного гемолиза в восьмой (контрольной) пробирке регистрируют результаты реакции.

Оценка результатов. Титром реагинов исследуемой сыворотки крови является последнее разведение, давшее задержку гемолиза.

В выдаваемых лабораторией анализах при наличии резкоположительной реакции (4+) указывают, с каким титром испытуемой сыворотки получена положительная реакция.

Количественное определение реагинов имеет значение при оценке эффективности противосифилитического лечения. Быстрое снижение титра реагинов свидетельствует об успешности терапии. Длительно не снижающийся титр реагинов указывает на отсутствие эффективности терапии и необходимости ее изменения.

Источники ошибок. Те же, что и при качественной методике постановки реакции Вассермана.

Таблица N 6

КОЛИЧЕСТВЕННАЯ МЕТОДИКА ПОСТАНОВКИ РЕАКЦИИ ВАССЕРМАНА

Ингредиенты (в мл) (общий объем - 1,25 мл)	NN пробирок							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Изотонический раствор натрия хлорида	0,8	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	-
Испытуемая инактивированная сыворотка крови	0,2	-0,25	-0,25	-0,25	-0,25	-0,25	-0,25	0,25
	После перемешивания из I пробирки 0,25 мл удаляют, а во II и VIII пробирки переносят по 0,25 мл. Из II пробирки после перемешивания переносят последовательно из пробирки в пробирку (из II в III, из III в IV и т.д. до VII пробирки включительно) по 0,25 мл. Из VII пробирки 0,25 мл удаляют. Получают разведения сыворотки крови:							
	1:5	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:5
Антиген, разводимый по титру (кардиолипиновый или трепонемный)	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	-
Изотонический раствор натрия хлорида	-	-	-	-	-	-	-	0,25

Комплемент, разведенный по рабочей дозе	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Встряхнуть, поместить в термостат при 37 град. С на 45 минут								
Гемолитическая система	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Встряхнуть, поместить в термостат при 37 град. С на 45 - 60 минут до наступления полного гемолиза в контрольной пробирке								
Результат	4+	4+	4+	3+	-	-	-	-
В данном случае титр сыворотки крови 1:40								

МЕТОДИКА ПОСТАНОВКИ РЕАКЦИИ ВАССЕРМАНА СО СПИННОМОЗГОВОЙ ЖИДКОСТЬЮ

В спинномозговой жидкости больного сифилисом могут находиться противотрепонемные антитела и реагины, способные вступать в реакцию связывания комплемента с соответствующими антигенами.

Реакцию ставят с непрогретой спинномозговой жидкостью, ввиду отсутствия в ней комплемента.

Мутную или с примесью крови жидкость центрифугируют и отсасывают надосадочную жидкость.

Спинномозговую жидкость параллельно исследуют в трех дозах:

1) неразведенную; 2) разведенную изотоническим раствором натрия хлорида 1:2; 3) разведенную изотоническим раствором натрия хлорида 1:5 (таблица N 7).

Реакцию производят с двумя антигенами параллельно - трепонемным и кардиолипиновым - с каждым разведением спинномозговой жидкости по схеме (таблица N 7).

Ввиду отсутствия антикомплементарных свойств спинномозговой жидкости для ее исследования комплемент в реакцию вводят по титру (первая растворяющая доза без обычной надбавки). Для повышения качества ликвородиагностики сифилиса реакцию связывания комплемента рекомендуется заменять РИФ-ц или новой модификацией РИТ, методика постановки которой изложена ниже.

Оценка результатов.

Результаты реакции учитывают отдельно для каждой антигена и разведения спинномозговой жидкости. Для обозначения позитивности реакции Вассермана со спинномозговой жидкостью пользуются системой четырех плюсов, описанной выше.

Таблица N 7

МЕТОДИКА ПОСТАНОВКИ РЕАКЦИИ ВАССЕРМАНА СО СПИННОМОЗГОВОЙ ЖИДКОСТЬЮ

Ингредиенты (в мл)	NN пробирок						
(общий объем-1,25 мл)	1	2	3	4	5	6	7 (контроль)
Спинномозговая жидкость	0,05	0,05	0,13	0,13	0,25	0,25	0,25
Изотонический раствор натрия 5 хлорида	0,2	0,2	0,12	0,12	-	-	0,25

Антиген трепонемный, разведенный по титру	0,25	-	0,25	-	0,25	-	-
Антиген кардиолипиновый, разведенный по титру	-	0,25	-	0,25	-	0,25	-
Комплемент, разведенный по титру	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Встряхнуть, поместить в термостат при 37 град. С на 45 минут							
Гемолитическая система	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Встряхнуть, поместить в термостат при 37 град. С на 45-60 минут до наступления гемолиза в контрольной пробирке							

Источники ошибок.

Нарушение условий и методики постановки реакции. Несоблюдение условий и срока хранения спинномозговой жидкости, антигенов, комплемента, эритроцитов барана. Изменение процентного содержания натрия хлорида. Неправильно выбранная рабочая доза комплемента (избыток или недостаток его в опыте).

Использование при постановке реакции загрязненных пробирок, пипеток, химических стаканов, мерных цилиндров.

РЕАКЦИЯ ИММОБИЛИЗАЦИИ БЛЕДНЫХ ТРЕПОНЕМ

Принцип. Реакция основана на феномене потери бледными трепонемами подвижности в присутствии иммобилизирующих противотрепонемных антител исследуемой сыворотки крови и комплемента в условиях анаэробиоза. Постановке реакции предшествует подготовительная работа.

Обработка лабораторной посуды. Вся лабораторная посуда (пипетки, пробирки, флаконы, и т. п.), используемая для постановки реакции иммобилизации трепонем, должна быть стерильной. Перед стерилизацией ее моют без применения дезинфицирующих средств. Для этого после опыта пробирки и флаконы погружают в мыльную воду комнатной температуры, кипятят в течение 40 минут, охлаждают до 40град. и моют водопроводной сначала теплой, а затем холодной водой, наливая ее в каждую пробирку 5-7 раз, после чего 1 раз промывают дистиллированной водой и высушивают в сушильном шкафу. Высушенную посуду завертывают в бумагу и стерилизуют автоклавированием в течение 30 минут при 2 атмосферах по манометру. После стерилизации посуду вновь высушивают в сушильном шкафу и хранят в боксе в течение 7 дней.

1. Получение исследуемой сыворотки крови и ее обработка. Перед взятием крови обследуемый не должен получать медикаменты, особенно препараты пенициллина. Прием препаратов отменяют на срок их возможной задержки в организме. После отмены бициллина кровь берут через 1 месяц. При использовании пенициллиназы при постановке реакции прекращение введения препаратов пенициллина не обязательно.

Кровь для реакции берут из локтевой вены натощак стерильно, в сухую, химически чистую и стерильную пробирку. Кожу локтевого сгиба перед проколом протирают 70 % спиртом. Взятую кровь обрабатывают так же, как для реакции Вассермана, но с соблюдением условий стерильности. В реакции используют сыворотку крови, инактивированную в течение 30 минут в водяной бане при 56град. для исключения действия неспецифических иммобилизинов. При необходимости повторного исследования одной и той же сыворотки крови ее инактивирование проводят повторно, но в течение 15 минут. Перед исследованием сыворотку крови можно хранить в холодильнике в течение 10-15 дней при -10 град. С., а

при 4 град. С в течение 5 дней. Никаких консервантов в сыворотку крови не добавляют.

В реакции можно исследовать сыворотки крови, высушенные на вощаной бумаге, с добавлением по 3 капли на каждые 0,5 мл сыворотки крови свежеприготовленного 40% раствора пищевого сахара. Такие сыворотки крови должны быть исследованы не позднее 5 дней после высушивания в южных районах страны, а также в летнее время года, не позднее 10 дней на остальных территориях страны. Следует помнить, что результаты исследования сыворотки крови с невысоким содержанием антител негативируются быстрее, поэтому не следует широко применять высушенные сыворотки крови. Для растворения к высушенным сывороткам крови, помещенным в пробирку, добавляют 0,9% изотонический раствор натрия хлорида, восстанавливая их первоначальный объем, после растворения стерилизуют кварцеванием в течение 30 минут, расположив пробирки на расстоянии 0,5 метра от кварцевой лампы.

2. Среда выживания для бледных трепонем. Период от момента постановки реакции до регистрации ее результатов длится 18-20 часов, поэтому для сохранения жизнеспособности и хорошей подвижности микроорганизмов необходима среда выживания. Рекомендуется среда N 2 ЦКВИ. Для приготовления среды берут 50 г говяжьего или кроличьего мяса, освобождают его от жира и сухожилий, измельчают, заливают 100 мл водопроводной воды и помещают в холодильник на 24 часа при 4 град. С для экстрагирования. На следующий день кипятят в течение 10 минут кроличье мясо и 20 минут говяжье, охлаждают и фильтруют через многослойный бумажный фильтр. После фильтрования устанавливают pH=7,2-7,4 добавлением 20% раствора едкого натрия. Приготовленную среду стерилизуют автоклавированием в течение 20 минут при 1 атмосфере по манометру и ампулируют. При условии сохранения стерильности среда пригодна для использования в течение 12 месяцев. Ампулы со средой хранят в холодильнике при 4 град. С. Каждую новую партию среды вводят в опыт параллельно со старой средой для выяснения ее качеств. При невозможности приготовления среды можно пользоваться 0,9% раствором натрия хлорида промышленного производства.

3. Комплемент. В реакции иммобилизации используют избыток комплемента. В реакции применяют комплемент морской свинки. Количество его в значительной степени зависит от среды выживания для бледных трепонем. При использовании среды N 2 ЦКВИ в микроанаэростатном методе количество комплемента составляет 27% от общего объема используемых в реакции реагентов, а при постановке в меланжерах - 40%.

Для получения комплемента кровь берут обязательно у нескольких морских свинок так же, как для реакции Вассермана, но с соблюдением условий стерильности. После получения сыворотки крови ее наливают в стерильные пробирки по 1-4 мл и исследуют на стерильность. Для этого 1 мл сыворотки крови морской свинки оставляют в термостате при 37 град. С на сутки. В случае бактериального загрязнения комплемент бракуют. Пробирки с комплементом хранят в холодильнике при -10 град. С в течение 2-3 недель. Повторное замораживание и оттаивание не рекомендуется. Нельзя применять в реакции иммобилизации бледных трепонем консервированный комплемент, т.к. он токсичен для микроорганизмов. Лиофильно высушенный без консерванта комплемент морской свинки также нельзя использовать в реакции, т.к. по качеству он хуже свежего.

4. Антиген. В качестве антигена в реакции применяют взвесь бледных трепонем из раннего орхита кролика (7-9 суток после заражения). Используют бледные трепонемы штамма Никольса, которые еженедельно пассируют на кроликах. Зараженных кроликов содержат в светлых проветриваемых помещениях. Кормят полноценной пищей, содержащей витамины (морковь - обязательно). Для заражения следует брать здоровых кроликов - самцов весом 2,5-3 кг с отрицательным результатом серологических реакций на сифилис (КСР и РИТ). За 1-2 суток до заражения у кроликов выстригают шерсть в нижней части живота, внутренней поверхности бедер и мошонки. Для получения раннего специфического орхита кролика заражают введением внутрь каждого яичка по 1 мл взвеси бледных трепонем. Во взвеси должно содержаться более 50 микроорганизмов в каждом поле зрения микроскопа при использовании окуляра 7 х и объектива 40.

Введение животным гидрокортизона для подавления иммуногенеза не является строго обязательным. Применение его рекомендуется при уменьшении в яичках числа бледных трепонем при повторных пассажах (менее 50 при исследовании в темном поле зрения). Гидрокортизон вводят внутримышечно в дозе 20 мг перед заражением и в последующие 4-6 дней - 10 мг.

О появлении орхита свидетельствует увеличение размеров яичка и его уплотнение. Для удаления яичек кролика привязывают к станку, обескровливают пункцией сердца под эфирным наркозом, если кролик при этом не погибает, его забивают воздушной эмболией - введением 20 мл воздуха в сердце или

в вену уха. Яички выводят через паховый канал в мошонку, поглаживая по животу от середины вниз до мошонки. Поверхность кожи мошонки накрывают стерильной резиновой салфеткой с разрезами, через которые выводят яички. Кожу мошонки над яичками протирают тампоном, смоченным эфиром, приподнимают ее пинцетом сначала над одним яичком и делают разрез ножницами, через который выводят яичко вместе с оболочками, отрезают его у основания ножницами и помещают в стерильную чашку Петри. Далее в условиях бокса каждое яичко освобождают от оболочек, придатков и жира. Помещают в стерильный бокс, разрезают на 10-14 частей, заливают 5 мл среды N 2 ЦКВИ и полученную взвесь исследуют в микроскопе с конденсором темного поля зрения на наличие бледных трепонем. Для этого на предметное стекло пастеровской пипеткой наносят по капле жидкости из каждого бокса. При наличии трепонем кусочки яичка вместе со средой из бокса переносят во флакон емкостью 50 мл и встряхивают во встряхивателе для вымывания микроорганизмов из ткани яичка. Время встряхивания зависит от числа обнаруженных микроорганизмов. При наличии 5-10 бледных трепонем 1 поле зрения встряхивание длится в течение часа, а при наличии 30-40 трепонем - только 20-30 минут. После встряхивания содержимое флакона переносят в стерильную центрифужную пробирку и центрифугируют в течение 5 минут, при 1000 об/мин для осаждения эритроцитов и кусочков тканей яичка. Надосадочную жидкость переносят в другую стерильную пробирку, из нее готовят препараты на предметном стекле, которые исследуют, как было выше описано, определяя приблизительное число бледных трепонем в нескольких полях зрения.

Содержащуюся в пробирке густую взвесь бледных трепонем набирают в шприц и заражают подготовленных кроликов введением 1,0 мл взвеси внутрь каждого яичка.

Для приготовления антигена взвесь бледных трепонем разводят средой N 2 ЦКВИ так, чтобы в поле зрения было 10-15 микроорганизмов. Например, если во взвеси содержится 1000-1500 микроорганизмов в каждом поле зрения (т. е. трепонемы густо покрывают все поле зрения), то на 9,9 мл среды добавляют 0,1 мл взвеси трепонем и получают разведение в 100 раз.

5. Гемолитическая система. Дефибринированную баранью кровь или эритроциты барана в объеме, необходимом для работы в данный день, центрифугируют, плазму отсасывают, а осадок трижды отмывают 6-7 объемами 0,9% изотонического раствора натрия хлорида. При последнем промывании надосадочная жидкость должна быть бесцветной. Из плотного осадка готовят 2% взвесь эритроцитов барана в том же растворе. Нужный объем гемолитической сыворотки, разведенной в изотоническом растворе натрия хлорида по утроенному титру (например, если на этикетке указан титр 1:1200, то для разведения используют титр 1:400, т. е. 0,1 мл гемолитической сыворотки на 39,9 мл изотонического раствора натрия хлорида) объединяют с равным объемом 2% взвеси эритроцитов барана. Раствор гемолитической сыворотки приливают к взвеси эритроцитов барана и производят быстрое смешивание. Полученную гемолитическую систему выдерживают в термостате 30 минут при 37град. С.

ОСНОВНОЙ ОПЫТ

Постановку реакции проводят в боксе. Каждую сыворотку исследуют в двух пробирках: опытной и контрольной.

Таблица N 10

СХЕМА РЕАКЦИИ ИММОБИЛИЗАЦИИ БЛЕДНЫХ ТРЕПОНЕМ (МИКРОАНАЭРОСТАТНАЯ МЕТОДИКА)

Ингредиенты (мл)	Опыт	Контроли ингредиентов							
	NN пробирок								
	1 опытная	2 контрольная	3	4	5	6	7	8	9

Исследуемая инактивированная сыворотка крови	0,05	0,05	-	-	-	-	-	-	-
Комплемент активный	0,15	-	0,15	-	0,15	-	0,15	-	-
Комплемент инактивированный	-	0,15	-	0,15	-	0,15	-	0,15	-
Антиген	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35
Положительная инактивированная сыворотка крови	-	-	0,05	0,05	-	-	-	-	-
Отрицательная инактивированная сыворотка крови	-	-	-	-	0,05	0,05	-	-	-

В обе пробирки вносят по 0,05 мл исследуемой сыворотки крови и по 0,35 мл антигена. В опытную пробирку наливают 0,15 мл активного комплемента, а в контрольную такое же количество инактивированной сыворотки крови морской свинки. После заполнения содержимое пробирок перемешивают легким встряхиванием и помещают в микроанаэростат. Из микроанаэростата с помощью вакуумного насоса удаляют атмосферный воздух и заполняют его газовой смесью из баллона, в котором содержится азот (95 частей) и углекислый газ (5 частей). При заполнении микроанаэростата газовой смесью следят за тем, чтобы стрелка манометра не доходила до нулевого уровня. В этом случае удается избежать повышения давления внутри анаэростата выше атмосферного в связи с перемещением его из комнаты в термостат с температурой 35 град., а также позволяет следить за герметичностью этого прибора. Микроанаэростат с пробирками помещают в термостат на 18-20 часов.

При постановке реакции применяют 5 контрольных исследований: с заведомо положительной и отрицательной сыворотками крови, взятыми из предыдущего опыта, с активным и инактивированным комплементом и средой выживания для бледных трепонем. Контрольную отрицательную сыворотку крови применяют для суждения о степени подвижности бледных трепонем в данном опыте. Контрольную положительную сыворотку крови - для оценки степени иммобилизирующей активности в условиях данного опыта. Сыворотки крови исследуют по вышеописанной методике. Исследование активного и инактивированного комплемента и среды проводят для определения их влияния на подвижность бледных трепонем (таблица N 10).

Разлив ингредиентов при постановке реакции производят в боксе, предварительно облученном бактерицидной кварцевой лампой в течение 45-60 минут.

Оценку полученных результатов проводят через 18-20 часов. Пробирки вынимают из термостата и микроанаэростата и расставляют в штативе попарно (опытная и контрольная). Из каждой пары пробирок пастеровской пипеткой наносят капли пронумерованные соответственно опытным пробиркам на предметные стекла, накрывают покровными стеклами 20x20 мм и исследуют в микроскопе с конденсором темного поля зрения с объективом 40, окуляром 10 x. Просматривают несколько полей зрения в разных участках препарата, подсчитывая в каждом число подвижных и неподвижных бледных трепонем. Подсчет начинают с препарата из контрольной, а затем из опытной пробирки.

В препарате подсчитывают не менее 25 трепонем и отмечают, сколько из них подвижных и сколько неподвижных.

Если в опытном препарате содержится 13-19 подвижных бледных трепонем, то для получения более достоверного результата необходимо сосчитать не 25, а 50 микроорганизмов, также отмечая среди них число подвижных и неподвижных. При подсчете 50 бледных трепонем полученное число подвижных микроорганизмов делят на 2.

Если в контрольном препарате содержится меньше 17 подвижных трепонем из 25 подсчитанных,

то такой опыт не пригоден и исследование данной сыворотки крови следует повторить. В контрольных пробирках с инактивированным комплементом отсутствие подвижных трепонем объясняется токсичностью исследуемой сыворотки крови, чаще всего вследствие примеси медикаментов, иногда бактериальным загрязнением.

При определении подвижности бледных трепонем следует обращать внимание на интенсивность движений, совершаемых бледной трепонемой. У бледной трепонемы не всегда можно наблюдать сгибательные и контрактильные движения и иногда только вращательные. Следует также уметь отличать активные движения трепонем от движения с током жидкости.

Расчет процента специфической иммобилизации бледных трепонем производят по следующей формуле:

$$X = \frac{A - B}{A} \times 100, \text{ где}$$

A - число подвижных бледных трепонем в контрольной пробирке;
B - число подвижных бледных трепонем в опытной пробирке;
X - процент иммобилизации.

Пример:

$$X = \frac{24 - 21}{24} \times 100 = 12\%$$

В практической работе процент иммобилизации определяют по заранее составленной таблице (N 11) с применением вышеуказанной формулы. Реакция иммобилизации считается отрицательной, когда процент иммобилизации колеблется в пределах 0-20, сомнительной от 21 до 30, слабоположительной от 31 до 50 и положительной выше 50. Сыворотки крови с сомнительными и слабоположительными результатами реакции нуждаются в повторном исследовании для получения более достоверных результатов. Целесообразно также подвергать повторному исследованию все сыворотки крови, давшие полное расхождение результатов с результатами стандартных серологических реакций. Эти сыворотки крови заслуживают особого внимания, так как в этих случаях результаты реакции иммобилизации бледных трепонем дают возможность судить о наличии или отсутствии сифилиса у обследуемого лица.

Определение остаточного комплемента. Определение остаточного комплемента необходимо для суждения о том, достаточным ли было количество комплемента в опытных пробирках, не была ли подвижность бледных трепонем обусловлена отсутствием комплемента, вследствие чего иммобилизины не могли проявить свою активность.

После регистрации результатов реакции иммобилизации бледных трепонем в содержимом пробирок определяют остаточный комплемент добавлением в каждую пробирку гемолитической системы в объеме 0,1 мл. Пробирки помещают в термостат при 37 град. С на 45 минут. В опытных пробирках должен наступить гемолиз эритроцитов, в контрольных должна быть задержка гемолиза. Отсутствие в опытных пробирках гемолиза указывает на недостаточное количество комплемента, в этих случаях исследование надо повторить. Повторное исследование сыворотки крови не производят только в том случае, если отмечена 100% иммобилизация бледных трепонем.

Источники ошибок:
- токсичность исследуемой сыворотки крови;
- бактериальное загрязнение исследуемой сыворотки крови комплемента, среды;
- недостаточное количество комплемента в опыте;
- нарушение герметичности микроанаэростата, проникновение в него кислорода из атмосферного воздуха;
- повышение или понижение температуры в термостате в течение реакции;
- кислотность или щелочность лабораторной посуды, использованной при постановке реакции.

Таблица N 11

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОЦЕНТА ИММОБИЛИЗАЦИИ БЛЕДНЫХ ТРЕПОНЕМ

Количество подвижных трепонем в контрольных пробирках	Количество подвижных трепонем в опытных пробирках																									
	25	24	23	22	21	20	19	18	17	16	15	14	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	0
25	0	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40	44	48	52	56	60	64	68	72	76	80	84	88	92	96	100
24	0	0	4	8	12	17	21	25	29	33	37	42	46	50	54	58	62	67	71	75	79	83	87	92	96	100
23	0	0	0	4	9	13	17	22	26	30	35	39	43	48	52	56	61	65	70	74	78	83	87	91	96	100
22	0	0	0	0	5	9	14	18	23	27	32	36	41	45	50	54	59	64	68	73	77	82	86	91	95	100
21	0	0	0	0	0	5	10	14	19	24	29	33	38	43	48	52	57	62	67	71	76	81	86	90	95	100
20	0	0	0	0	0	0	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	35	90	95	100
19	0	0	0	0	0	0	0	5	11	16	21	26	32	37	42	47	54	58	63	68	74	79	84	89	95	100
18	0	0	0	0	0	0	0	0	6	11	17	22	28	33	39	44	50	56	61	67	72	78	83	89	94	100
17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	12	18	24	29	35	41	47	53	59	65	71	76	82	88	94	100

Примечание: Ответ находят в точке пересечения горизонтальной строки с вертикальным столбцом, например: 22 подвижных трепонемы в контрольной пробирке и 8 подвижных трепонем в опытной пробирке соответствует 64% иммобилизации бледных трепонем.

МЕЛАНЖЕРНАЯ МЕТОДИКА ПОСТАНОВКИ РИТ ПО Н. М. ОВЧИННИКОВУ

Анаэробные условия при постановке реакции создаются помещением реагирующей смеси в меланжер (лейкоцитарный смеситель), оба конца которого закрыты резиновым кольцом. Меланжерная методика реакции позволяет обходиться без вакуумного насоса, баллона со смесью азота, углекислого газа, микроанаэростата. При сравнительном изучении на большом клиническом материале получены результаты, не уступающие классической анаэростатной методике.

Ход определения. Постановке основного опыта предшествует подготовительная работа, которая состоит из следующих этапов:

1. Получение и обработка исследуемой сыворотки крови проводится так же, как и для микроанаэростатной методики.

2. Приготовление среды для бледных трепонем. Меланжерная методика реакции выполняется с той же средой, что и микроанаэростатная.

3. Комплемент. Готовится и хранится так же, как и при выполнении микроанаэростатной методики.

4. Антиген. Применяется тот же штамм бледной трепонемы и методика его приготовления та же, что и для микроанаэростатной методики.

5. Приготовление смеси антигена с комплементом "коктейля". Предварительно в двух стерильных флаконах или колбах соединяют комплемент с антигеном, взятых в равных объемах. Количество комплемента и антигена зависит от общего числа исследуемых сывороток крови. На одну сыворотку крови расходуется 0,15 мл комплемента и столько же антигена. Антиген разливают равными частями в два стерильных флакона и добавляют в один флакон активный комплемент, а во второй - инактивированную сыворотку крови морской свинки (таблица N 12).

6. Гемолитическую сыворотку разводят так же, как и для микроанаэростатного метода.

7. Приготовление изотонического раствора хлорида натрия. Растворяют 9,0 г натрия хлорида

химически чистого в 1 литре дистиллированной воды. Раствор фильтруют через бумажный фильтр и стерилизуют автоклавированием в течение 20 минут при 1 атмосфере по манометру.

8. Всю лабораторную посуду промывают и стерилизуют так же, как при постановке микроанаэростатного метода.

Таблица N 12

РАСЧЕТ КОЛИЧЕСТВА ИНГРЕДИЕНТОВ
ДЛЯ ПОСТАНОВКИ РЕАКЦИИ ИММОБИЛИЗАЦИИ БЛЕДНЫХ ТРЕПОНЕМ
МЕЛАНЖЕРНЫМ МЕТОДОМ

Ингредиенты (в мл)	Количество исследуемых сывороток				
	1	5	10	20	30
Флакон 1 (опыт)					
Антиген	0,15	0,75	1,5	3,0	4,5
Комплемент	0,15	0,75	1,5	3,0	4,5
Флакон 2 (контроль)					
Антиген	0,15	0,75	1,5	3,0	4,5
Инактивированная сыворотка крови морской свинки	0,15	0,75	1,5	3,0	4,5

Меланжеры промывают с помощью груши, насасывая в меланжер и удаляя из него дистиллированную воду 2 раза. Промывание проводят последовательно в 3 банках. Затем меланжеры складывают в стерилизатор и кипятят в течение 30 минут. Воду сливают, а меланжеры переносят в сушильный шкаф. После высушивания складывают в картонную коробку, заворачивают в бумагу и автоклавируют так же, как другую стеклянную посуду. После стерилизации вновь высушивают в сушильном шкафу и хранят в шкафу в боксе вместе с другой посудой не более 7 дней.

Основной опыт. Каждую сыворотку крови исследуют в двух меланжерах. В первый меланжер набирают исследуемую сыворотку крови до метки "I". С конца меланжера стерильным ватным тампоном снимают остатки сыворотки крови. После этого до метки "II" набирают смесь из первого флакона. Оба конца смесителя закрывают резиновым кольцом. Во второй меланжер набирают до метки "I" ту же самую сыворотку крови, а до отметки "II" смесь из второго флакона. После одевания кольца содержимое меланжеров перемешивают, меланжеры метят и укладывают в специальный штатив или коробку с вырезами. Штативы помещают в термостат на 18-20 часов.

При постановке меланжерного метода применяют те же контрольные исследования, которые используют при микроанаэростатном методе.

Оценка полученных результатов.

Через 18-20 часов меланжеры вынимают из термостата попарно - опытный и контрольный - и содержимое переносят в заранее подготовленные и пронумерованные соответственно номерам меланжеров пробирки. Для этого после снятия кольца с меткой меланжер опускают в соответствующую пробирку. Содержимое меланжера либо свободно вытекает на дно пробирки, либо выталкивается из него при помощи резиновой части пипетки, надетой на верхний конец меланжеров. При ее помощи перемешивают находящуюся в пробирке жидкость и, не снимая пипетки с верхнего конца меланжера, нижним его концом наносят каплю жидкости из опытного меланжера на левую сторону предметного стекла, а на правую сторону - каплю жидкости из контрольного меланжера. Стекла предварительно нумеруют соответственно номерам опытных меланжеров. Капли накрывают покровными стеклами,

размером 20x20 мм. Регистрацию результатов и определение остаточного комплемента проводят так же, как при микроанаэростатном методе.

Источники ошибок те же, что и при применении микроанаэростатной методики реакции иммобилизации бледных трепонем.

КОЛИЧЕСТВЕННАЯ МЕТОДИКА ПОСТАНОВКИ РИТ.

Клиническая оценка огромного числа исследований крови в РИТ наряду с высокой специфичностью показала ее более низкую чувствительность по сравнению с другими тестами при ранних и поздних формах сифилиса, что обусловлено меньшей активностью выработки иммобилизинов в указанные периоды заболевания, хотя данные антитела в крови и ликворе остаются в наличии.

В связи с этим была предложена постановка РИТ с общепринятым и увеличенным в 2 и 4 раза объемом сыворотки крови, то есть вместо 0,05 мл испытуемой сыворотки крови в реакцию вводится 0,05; 0,1 и 0,2 мл сыворотки. Помимо этого методика постановки РИТ остается аналогичной классической. Доказано, что при использовании такой модификации с диагностической целью следует ориентироваться на процент иммобилизации бледных трепонем с 0,2 мл сыворотки крови. При этом чувствительность РИТ значительно повышается при сохранении высокой специфичности теста.

МЕТОДИКА ПОСТАНОВКИ РЕАКЦИИ ИММОБИЛИЗАЦИИ БЛЕДНЫХ ТРЕПОНЕМ ДЛЯ ЛИКВОРОДИАГНОСТИКИ СИФИЛИСА

При исследовании крови в общепринятой РИТ, в реакцию вводят 0,05 мл исследуемой сыворотки крови, 0,15 мл комплемента и 0,35 мл антигена. Для приготовления антигена взвесь бледных трепонем разводят в среде выживания так, чтобы в поле зрения было 10-15 микроорганизмов. Однако такая техника постановки реакции при исследовании ликвора не обеспечивает высокой чувствительности теста.

По новой методике при исследовании ликвора в РИТ его объем увеличивают в 4 раза, т.е. в реакцию вводят 0,2 мл. Объемы комплемента (0,15 мл) и антигена (0,35 мл) не меняются, лишь при изготовлении антигена взвесь бледных трепонем разводят в среде выживания до 20-25 микроорганизмов в поле зрения.

После пункции ликвор помещают в сухую, химически чистую и стерильную пробирку. Мутный или с примесью крови ликвор центрифугируют и отсасывают надосадочную жидкость. В реакцию ликвор вводят цельным и неинактивированным. Перед исследованием ликвор можно сохранять в морозильном отделении холодильника при температуре от -12 град. С до -18 град. С в пробирках под резиновыми пробками до 1 месяца. Размораживание производят при комнатной температуре. Повторное замораживание и размораживание не допускается.

В остальном методика постановки РИТ с увеличенным объемом ликвора и учет результатов аналогичны общепринятой РИТ. Диагностическая эффективность вышеописанной методики близка к РИФ-ц.

МЕРОПРИЯТИЯ В СЛУЧАЕ АВАРИИ В СЕРОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ

При аварии во время работы с инфекционным материалом (бой посуды, разбрызгивание из шприца при заражении животных, а также во всех случаях, ведущих к загрязнению заразным материалом окружающих предметов, одежды открытых частей тела работников) присутствующий при этом персонал обязан немедленно прекратить работу, известить о случившемся заведующего лабораторией и провести обеззараживание помещения, оборудования и предметов, которые могли быть инфицированы, а также провести самообеззараживание.

Для ликвидации последствий аварии применяют следующие методы обеззараживания:

- горизонтальную поверхность, на которую попал заразный материал, заливают дезинфицирующим раствором (5% раствором хлорамина или 5% раствором карболовой кислоты);
- вертикальные поверхности (загрязненные стены, поверхность мебели, приборов) протирают ватными или марлевыми тампонами, обильно смоченными дезинфицирующим раствором;
- загрязненную одежду снимают и замачивает в дезинфицирующем растворе;
- загрязненную обувь обмывают тампонами, смоченными дезинфицирующим раствором;

- открытые участки кожи лица, рук и других частей тела в случае загрязнения их заразным материалом (взвесь бледных трепонем, сыворотка крови из инфекционного отделения) обрабатывают 70% этиловым спиртом;

- при загрязнении слизистых оболочек рот прополаскивают 5% раствором соды или 0,5% раствором соляной кислоты, глаза промывают водой и закапывают свежеприготовленный 1% раствор азотнокислого серебра или 30% альбуцида, в нос закапывают 1-2 капли 1% раствора протаргола. Проводят профилактическое лечение;

- при несчастном случае, связанном с ранением или укусом зараженным животным или другими нарушениями целостности кожных покровов, необходимо выдавить из ранки кровь, смазать рану 5% настойкой йода и провести курс профилактического лечения. При оцарапывании кожи зараженным животным на место ранения кладут на 5 минут компресс с 5% раствором лизола или делают ванночку из того же раствора.

РАБОТА С ИНФЕКЦИОННЫМ МАТЕРИАЛОМ

Оперативные вмешательства на зараженных животных и заражение должны производиться в фартуке, резиновых перчатках и защитных очках. После работы фартук и перчатки обрабатывают дезинфицирующим раствором, перчатки кипятят в течение 30 минут.

Тушки убитых животных, больных сифилисом, необходимо собирать в специальное хранилище с последующим сжиганием. При невозможности сжигания, тушки заливают 5% раствором хлорамина на сутки, а затем закапывают в землю вдали от жилых помещений на достаточную глубину (0,7-1 метр), не допускающую выкапывания их другими животными (крысами, собаками, кошками и т. п.).

В процессе работы и после ее окончания применяют следующие способы дезинфекции. Посуду, соприкасающуюся с бледными трепонемами или содержащую кусочки зараженных тканей, погружают в мыльную воду комнатной температуры без применения дезинфицирующих средств, кипятят в течение 30 минут в указанном растворе, охлаждают и моют водопроводной, сначала теплой, затем холодной водой, с последующим прополаскиванием дистиллированной водой.

Просвет верхнего конца пипетки, с помощью которой насасывают инфицированный материал, должен быть плотно закрыт ватным тампоном.

Пипетки, загрязненные бледными трепонемами, помещают в 3-5% раствор карболовой кислоты на 1 час, затем промывают 5-6 раз водопроводной водой и один раз - дистиллированной. Если пипетки при этом не становятся прозрачными, их погружают в раствор хромовой смеси на сутки, после чего промывают 9 раз водопроводной водой и один раз дистиллированной.

Поступившую на исследование кровь и полученную из нее сыворотку крови после работы сливают в канализационную сеть, предварительно обработав дезинфицирующим средством.

Посуду после использования промывают под проточной водой, затем замачивают в горячем (50 град. С) моющем растворе на 30 минут, полностью погружая ее в раствор и заполняя полости. Затем посуду моют ершами или ватно - марлевыми тампонами, в среднем 25-30 секунд один предмет. Вымытую посуду прополаскивают в проточной воде, затем в дистиллированной и высушивают при температуре 180-200 град. С в течение 45 минут.

В качестве моющего раствора применяют 0,5% комплекс перекиси водорода с моющими средствами - "Новость", "Прогресс", "Сульфанол", "Лотос", "Астра" и др. (33% раствор пергидроля - 20 мл + 975 мл воды + 5 г моющего средства).

Поверхность рабочих столов в конце каждого рабочего дня, а также при загрязнении их кровью, сывороткой крови обрабатывают дезинфицирующим раствором (80 мл 96град. спирта + 20 мл дистиллированной воды + 7 мл 33% пергидроля, раствором сулемы 1:1000 и др.)

В случае загрязнения рук кровью их следует вымыть теплой водой с хозяйственным мылом, насухо вытереть обработать тампоном, смоченным антисептиком (6% раствором перекиси водорода, 0,1% раствором дезоксана или 70% раствором этилового спирта).

Все манипуляции, при которых может произойти загрязнение рук кровью и сывороткой крови, следует проводить в резиновых перчатках.

При работе с кровью, сывороткой крови нужно пользоваться резиновой грушей. Насасывание ртом не допускается.

При работе в лабораториях, осуществляющих серо- и ликвородиагностику сифилиса, должны

выполняться "Санитарные правила" СП 1.2. 731 - 99, 1.2. Эпидемиология. Безопасность работы с микроорганизмами III - IV групп патогенности и гельминтами". Минздрав России, Москва, 1999 г.

Эффективность использования метода:

В ГУ ЦНИКВИ МЗ РФ на большом материале изучена результативность приведенных в инструкции методов. При серодиагностике сифилиса МР - 95,8%, РСК с трепонемным антигеном - 95,8%, с кардиолипиновым антигеном - 90,2%, РИТ - 87,7%, РИФ - 99,1%, ИФА - 99,1%, РПГА - 99,4%, положительных результатов у больных сифилисом.

Наиболее экономичной и простой является МР с кардиолипиновым антигеном, которую широко используют как отборочный тест на сифилис. Подобной чувствительностью обладает и КСР, но он более специфичен в связи с использованием трепонемного антигена.

Ввиду того, что в организме больного сифилисом выработка иммобилизинов наступает позже других специфических антител и их концентрация в крови уменьшается при поздних формах сифилиса, РИТ более эффективно при вторичном и скрытом сифилисе. Закономерно, при поздних формах сифилиса выявляются гемагглютинины (РПТА), флюорисцирующие антитела (РИФ, ИФА), как правило вырабатываются в организме больных сифилисом при всех формах сифилиса. При диагностике сифилиса нервной системы наиболее эффективна РИФ-ц с ликвором (100% чувствительность и специфичность).

Приложение N 2
Утверждено приказом
Минздрава России
от 26.03.2001 г. N 87

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

РАСЧЕТНЫЕ НОРМЫ ВРЕМЕНИ ПРОВЕДЕНИЯ ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ ПРИ ДИАГНОСТИКЕ СИФИЛИСА МЕТОДОМ РЕАКЦИИ ПАССИВНОЙ ГЕМАГГЛЮТИНАЦИИ

Краткая аннотация

В методических указаниях излагаются впервые разработанные научно - обоснованные функциональные обязанности врача - лаборанта, лаборанта, медицинского регистратора и расчетные нормы времени на проведение исследований для диагностики сифилиса методом реакции пассивной гемагглютинации (РПГА).

Нормы предназначены для использования в лабораториях кожно - венерологических диспансеров, в том числе в централизованных, и других лечебно - профилактических учреждений Российской Федерации.

Математическая и статистическая обработка произведена в ГУ ЦНИКВИ МЗ РФ по специальной методике обсчета, рекомендованной в НИИ Социальной гигиены и управления здравоохранением им. Н.А. Семашко РАМН.

Методические указания разработаны и составлены в отделениях эпидемиологии и микробиологии ГУ ЦНИКВИ МЗ РФ м.н.с. Р.А. Андреасяном и м.н.с. З.П. Акоповой при непосредственном участии и консультативной помощи доктора медицинских наук М.В. Яцухи и доктора биологических наук, профессора Г.А. Дмитриева.

Нормы времени разработаны на материале хронометражных замеров деятельности работников лабораторий ЦНИКВИ МЗ РФ и различного типа кожно - венерологических диспансеров: городского кожно - венерологического диспансера г. Мытищи, Московского Областного кожно - венерологического диспансера; при консультативной помощи московских районных кожно - венерологических диспансеров

N 3 и 9.

При разработке методических указаний были использованы материалы методических пособий для врачей, разработанных в отделе микробиологии ЦНИКВИ и утвержденных Ученым Советом ЦНИКВИ МЗ РФ, Протокол N 7 от 24.06.98 г.

Введение

Актуальность совершенствования диагностики сифилиса несомненна. Особенности течения данной инфекции (изменчивая симптоматика или ее полное отсутствие) требуют постоянного внимания к себе и совершенствования возможностей раннего, достоверного и экономичного способов ее лабораторного выявления. Данные методические указания посвящены теме затрат рабочего времени и функциональным обязанностям персонала лабораторий при диагностике сифилиса методом РПГА.

Формула метода

Указанные расчетные нормы времени разработаны впервые.

При разработке расчетных норм времени на лабораторные исследования использованы следующие принципы:

- разработка осуществлена для РПГА по методике изложенной в данном приказе;
- при использовании в лаборатории средств механизации и автоматизации, а также специализированной диагностической аппаратуры, время должно учитываться по фактическим затратам;
- нормы времени разработаны на исследование одной сыворотки крови пациента.

Показания к применению метода

Расчетные нормы времени могут быть использованы для:

- решения вопросов совершенствования организации деятельности лабораторий;
- планирования и организации труда врачей - лаборантов, лаборантов и медицинских регистраторов, распределения их функциональных обязанностей в соответствии со свойственной должности работой;
- анализа трудозатрат персонала лабораторий;
- формирования численности персонала лабораторий в зависимости от объема и видов исследований;
- оптимизации качества исследований;
- определения расценок на исследования в бюджетных учреждениях здравоохранения в новых условиях хозяйствования.

Материально - техническое обеспечение метода

Реакция пассивной гемагглютинации при лабораторной диагностике сифилиса.

Описание метода

РАСЧЕТНЫЕ НОРМЫ ВРЕМЕНИ
ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ
ПРИ ДИАГНОСТИКЕ СИФИЛИСА МЕТОДОМ РПГА

N п/п	Наименование исследования	Время, затраченное на исследование 1 сыворотки крови, в минутах и секундах		
		врачом - лаборантом	лаборантом	мед. регистратором
1.	Исследование сыворотки крови	1 мин 13 сек	14 мин 30 сек	3 мин 26 сек

	пациента качественным методом при заборе крови в лаборатории			
2.	Исследование сыворотки крови пациента качественным методом при заборе крови вне лаборатории	1 мин 13 сек	10 мин 21 сек	2 мин 30 сек
3.	Исследование сыворотки крови пациента качественным и количественным методами одновременно при заборе крови в лаборатории	2 мин 34 сек	16 мин 41 сек	4 мин 51 сек
4.	Исследование сыворотки крови пациента качественным и количественным методами одновременно при заборе крови вне лаборатории	2 мин 34 сек	12 мин 32 сек	3 мин 55 сек

Время, затраченное на переходы (переезды) для взятия крови в стационаре лечебно - профилактического учреждения, в другом учреждении или на дому, должно учитываться по фактическим затратам.

Расчетные нормы на проведение лабораторных исследований для диагностики сифилиса методом РПГА рассчитаны с учетом выполнения врачом - лаборантом и лаборантом подготовительной работы и непосредственно постановки реакции. Подготовительная работа на каждую группу исследований (после расчета необходимого количества ингредиентов на рабочую смену или рабочий день) должна полностью производиться только 1 лаборантом (см. функциональные обязанности лаборанта за исключением пп. "проводит постановку реакции строго в соответствии с требованиями технологий проведения этих исследований с соблюдением техники безопасности при работе с исследуемой кровью").

Затраты труда остальных лаборантов меньше, так как они осуществляют свою трудовую деятельность по проведению исследований без проведения подготовительной работы.

Расчетные нормы времени при проведении лабораторных исследований для диагностики сифилиса методом РПГА включают затраты времени врачей - лаборантов на выполнение следующих видов работ:

- проверяет соответствие серий и сроков годности полученных тест - систем;
- проверяет деятельность лаборантов по проведению исследований в строгом соответствии с требованиями их проведения, соблюдения ими техники безопасности;
- читает результаты исследований и диктует их медицинскому регистратору;
- отбирает сыворотки крови, давшие положительные результаты, для дальнейшего исследования количественным методом или другими диагностическими тестами на сифилис;
- подписывая бланки результатов исследования, контролирует правильность занесенных в них результатов исследования медицинским регистратором, положительные результаты регистрирует в журнале положительных ответов;
- проверяет деятельность лаборантов и медицинских регистраторов по дозировке ингредиентов в процессе постановки реакций; приему крови, доставленного на исследование; регистрации результатов исследования в общем лабораторном журнале, заполнению и выдаче бланков с результатами исследований и раскладке их по ячейкам врачей и лечебно - профилактических учреждений, приславших их, а также другую их деятельность.
- проверяет кровь, полученную от больных, заполняет бланки положительных ответов;
- проверяет взятие крови и обработку ее в строгом соответствии с требованиями технологии приготовления диагностического материала, а также прием пробирок с кровью, доставленных на исследование из других лечебно - профилактических учреждений.

Расчетные нормы времени при проведении лабораторных исследований для диагностики сифилиса методом РПГА включают затраты времени лаборантов на выполнение следующих видов работ:

- подбирает наборы тест - систем, необходимую концентрацию спирта, лабораторную посуду,

перевязочный материал и другое;

- подготавливает лабораторную посуду, необходимую для проведения исследований, маркирует ее и, в процессе проведения исследований, многократно промывает планшеты;
- проверяет точность работы оборудования в течение рабочего дня;
- подготавливает свое рабочее место и другие условия для забора крови, соответствующей обработки ее и приготовлению из нее диагностического материала;
- производит расчет необходимого количества диагностических растворов на рабочий день, готовит их для обработки и ведет записи в журнале;
- регистрирует в журнале дату и количество приготовленных растворов, ведет документацию по расходу спирта;
- производит маркировку крови взятой от больных и подготавливает ее к исследованию;
- готовит дистиллированную воду, моющий и маточный растворы дезинфицирующих средств;
- доводит до комнатной температуры положительную и отрицательную контрольные сыворотки крови, контрольные и тест - эритроциты, а также буфер для постановки реакции, входящие в набор тест - систем;
- проводит постановку реакции строго в соответствии с требованиями технологий проведения этих исследований с соблюдением техники безопасности при работе с исследуемой кровью;
- после проведения исследований заливает дезинфицирующими, моющими средствами использованную лабораторную посуду; перчатки и оставшуюся после исследования кровь или сыворотки крови; обрабатывает рабочие места дезинфицирующими, моющими растворами; убирает в холодильник оставшиеся после исследования ингредиенты и исследуемую кровь;
- проверяет работу младшего медицинского персонала, в том числе деятельность санитарок по правильному мытью и сушке лабораторной посуды, соблюдению ими хлорного режима;
- комплектует и укладывает лабораторную посуду для работы на следующий рабочий день;
- другие обязанности связанные с индивидуальными условиями работы.

Расчетные нормы времени при проведении лабораторных исследований для диагностики сифилиса методом РПГА включают затраты времени медицинских регистраторов на выполнение следующих видов работ:

- принимает кровь, доставленную на исследование из других лечебно - профилактических учреждений, маркирует ее и регистрирует в журнале регистрации анализов и их результатов;
- проверяет правильность заполнения бланков - направлений на исследование; расставляет пробирки с исследуемой кровью в штативы и переносит их на рабочий стол лаборанта; выдает чистые пробирки и бланки с результатами исследований за предыдущий день курьерам, доставившим кровь на исследование;
- под диктовку врача - лаборанта отмечает результаты исследований в рабочий лабораторный журнал, затем эти результаты переносит в бланки результатов анализов, проставляет в них дату и передает врачу - лаборанту для подписания;
- подготавливает и оформляет лабораторные журналы для работы, обеспечивает правильность их ведения;
- в случае приема больных в лаборатории опрашивает их на предмет подготовленности, проверяет наличие документов, удостоверяющих личность, регистрирует в журнале регистрации больных, направляет их в кабинеты для сдачи анализов;
- регистрирует бланки результатов исследований, переносит результаты исследований с бланков результатов исследований в регистрационный журнал;
- раскладывает бланки с результатами исследований по ячейкам врачей - лаборантов и конвертам учреждений, приславших их на исследование, в последующем отправляет корреспонденцию по почте;
- ведет учет количества анализов, выполненных в лаборатории за рабочий день, по различным лечебно - профилактическим учреждениям, направившим больных на исследование, оказывает помощь заведующему лаборатории по составлению отчетов (ежедневных, квартальных, годовых).

Кроме вышеизложенного, лабораторные работники выполняют другие виды работ, непосредственно не связанные с диагностикой заболеваний и не вошедшие в указанные затраты рабочего времени.

I. Врач - лаборант:

- проведение внутрилабораторного и межлабораторного контролей качества;
- оказание консультативной помощи врачам и врачам - лаборантам лечебно - профилактических учреждений обслуживаемых районов на рабочем месте и по телефону;
- участие в конференциях и рабочих собраниях;
- участие в процессе повышения квалификации врачей - лаборантов курируемых учреждений;
- практическое участие в разработке, совершенствовании, апробации и внедрении новых диагностических методик;
- участие в процессе повышения квалификации среднего и младшего медицинского персонала своих и курируемых лабораторий;
- оказание помощи заведующему лабораторией в проведении организационно - технических мероприятий по деятельности лаборатории.

II. Лаборант:

- оказание помощи заведующему лабораторией и врачам - лаборантам в проведении организационно - технических мероприятий по деятельности лаборатории;
- участие в рабочих собраниях коллектива;
- участие в апробации и внедрении новых диагностических методик;
- участие в учебе по повышению собственной квалификации;
- оказание помощи заведующему лабораторией и врачам - лаборантам в составлении отчетов;
- участие в повышении квалификации младшего медицинского персонала, а также выполнение другой работы, предусмотренной администрацией учреждения в правилах внутреннего распорядка в соответствии с местными условиями.

III. Медицинский регистратор:

- участие в рабочих собраниях коллектива;
- оказание помощи заведующему лабораторией и врачам - лаборантам в выполнении другой работы, предусмотренной администрацией учреждения в правилах внутреннего распорядка в соответствии с местными условиями;
- постоянное совершенствование качества выполняемых работ.

Данное распределение обязанностей не исключает взаимозаменяемости в тех случаях, когда это диктуется необходимостью или условиями работы. При отсутствии в лаборатории медицинского регистратора его функции выполняет лаборант. В таких случаях затраты времени учитываются для выполнявшего эти функции.

Нормы времени на исследование, применяемые эпизодически, а также используемые в отдельных лечебно - профилактических учреждениях вновь разработанные или заимствованные за рубежом подлежат разработке на местах в соответствии с общими принципами нормирования труда.

Затраты рабочего времени персонала лабораторий при постановке микромодификации реакции РПГА, указанных в пособии для врачей, нами не разработаны, так как они не используются в учреждениях практического здравоохранения.

На основе анализа проделанной работы отдельного сотрудника или лаборатории в целом принимаются управленческие и организационные решения, направленные на совершенствование труда персонала, рациональную расстановку и формирование численности медицинского персонала, внедрение более эффективных методов исследования, позволяющих повысить качество и информативность выполняемых исследований, чтобы наиболее полно удовлетворить потребность в этом виде диагностики.

На основании приведенных нами расчетных норм времени и результатов выкопировки числа исследований, проведенных лабораторией за год (полугодие, квартал), определяется годовой (полугодовой, квартальный) объем деятельности структурного подразделения (или отдельного работника) по формуле:

$$T = t_1 n_1 + t_2 n_2 + \ldots + t_n n_n,$$

где: T - годовой объем деятельности, выраженный в минутах;
t_1 - время в минутах для первого вида исследований;
t_2 - время в минутах для второго вида исследований;
n_1 - число исследований первого вида, проведенных за учетный период;
n_2 - число исследований второго вида, проведенных за учетный период.

Затем рассчитывают годовой бюджет рабочего времени каждой должности (врач - лаборант, лаборант, медицинский регистратор) по образцу, изложенному в таблице.

Таблица. Расчет годового бюджета рабочего времени медицинского персонала лаборатории за 1998 год.

Наименование должности	Общегодовой бюджет рабочего времени должности (в минутах)	Годовой бюджет рабочего времени должности на проведение исследований (в минутах)
Врач - лаборант (при 6-часовом рабочем дне)	250 x 6 x 60 x 0,923 = 83070	83070 x 80 : 100 = 66456
Врач - лаборант (при 6,5-часовом рабочем дне)	(250 x 6,5 - 28) x x 60 x 0,923 = 88442	88441 x 80 : 100 = 70754
Лаборант, фельдшер - лаборант (при 6-часовом рабочем дне)	250 x 6 x 60 x 0,923 = 83070	83070 x 75,0 : 100 = 62302
Лаборант, фельдшер - лаборант (при 6,5-часовом рабочем дне)	(250 x 6,5-28) x 60 x 0,923 = 88442	88442 x 75,0 : 100 = 66331
Мед. регистратор (при 6,5-часовом рабочем дне)	(250 x 6,5 - 28) x x 60 x 0,923 = 88442	88442 x 80 : 100 = 70754

Примечание: Число рабочих дней должности врача - лаборанта, лаборанта (фельдшера - лаборанта) и медицинского регистратора в течение года при 24-дневном отпуске и 6-дневной рабочей неделе составляет 278 дней. Накануне праздничных и выходных дней рабочий день продолжительностью 6,5 часов сокращается на 0,5 часа. При числе выходных и праздничных в течение года, равном 63, один из праздничных дней в году, как правило, совпадает с выходным, а два праздника - по 2 дня каждый, то сокращение рабочих дней в течение календарного года составляет (60 x 0,5) = 30 часов, а за исключением отпуска - 28 часов.

Практика нормирования показывает, что коэффициент непосредственного использования рабочего времени при проведении исследований составляет 0,923. Основная диагностическая работа при проведении нормируемых исследований у врачей - лаборантов и медицинских регистраторов занимает 80%, а у лаборантов (фельдшеров - лаборантов) - 75,0% их рабочего времени. При ежегодном расчете годового бюджета времени надо учитывать переменные величины: 1) число рабочих дней в году, зависящее от изменения календаря по годам и числа дней отпуска; 2) число часов перед праздничными и выходными днями; 3) число рабочих часов в день, зависящее от должности.

При определении числа должностей врачей - лаборантов, лаборантов и медицинских

регистраторов, необходимых лаборатории, в зависимости от объемов и видов лабораторных исследований, необходимо фактический годовой объем деятельности должности разделить на годовой бюджет рабочего времени той же должности: А=Т:Б, где А - число необходимых единиц должностей; Т - фактический объем деятельности должности за год, выраженный в минутах в соответствии с нормами времени; Б - годовой бюджет рабочего времени должности в минутах.

Например, если в лаборатории в течение года проведено 10000 исследований сыворотки крови пациента качественным методом, из которых 7000 исследований с забором крови пациента в лаборатории (1), а 3000 исследований с забором крови пациента вне лаборатории (2), а также 15000 исследований сыворотки крови пациента качественным и количественным методами в том числе 10000 исследований с забором крови пациента в лаборатории (3), а 5000 исследований при заборе крови пациента вне лаборатории (4), то затраты времени, необходимые для проведения вышеперечисленных работ в соответствии с расчетными нормами - Т составляют для врача - лаборанта с 6 - часовым рабочим днем: 1 мин 13 сек x 7000 + 1 мин 13 сек x 3000 + 2 мин 34 сек x 10000 + 2 мин 34 сек x 5000 = 50666 мин 40 сек. Таким образом число необходимых должностей врачей - лаборантов с 6-часовым рабочим днем для производства указанного объема работы будет равно частному от деления 50666 мин (фактически затраченное время) на 66456 мин (годовой бюджет рабочего времени) = 0,76 ~= 0,75 должности. Следовательно, лаборатории при данном объеме работы и видах производимых исследований для оптимальной нагрузки требуется 0,75 должности врача - лаборанта с 6-часовым рабочим днем. Аналогично рассчитывается потребность в лаборантах и медицинских регистраторах.

Таким же способом можно рассчитать и потребность в должностях сотрудников лаборатории на полугодие, квартал, месяц. Такая необходимость возникает, при расширении диапазона используемых в лаборатории методов диагностики или при резком увеличении объема работы в лаборатории (новые контингенты, увеличение обслуживаемого населения и др.)

Должности врачей - лаборантов, лаборантов и медицинских регистраторов устанавливаются в зависимости от объема работы в соответствии с данными расчетными нормами времени на проведение лабораторных исследований для диагностики сифилиса методом РПГА. При определении норм затрат рабочего времени для врачей - лаборантов и лаборантов не производящих подготовительную работу, необходимо вычесть из указанных расчетных норм времени соответствующие затраты труда врача - лаборанта и лаборанта на подготовительную работу, приходящуюся на одно исследование.

Для проведения организационно - методической работы в лаборатории приказом главного врача учреждения устанавливается должность заведующего лабораторией.

Для заведующих лабораториями может быть установлен дифференцированный объем работы по непосредственному выполнению диагностических исследований в зависимости от местных условий - фактического или планируемого годового объема работы лаборатории, численности медицинского персонала и др. Так, врач - лаборант, назначенный заведующим лабораторией, в штате которой до 3 должностей врачей - лаборантов, лаборантов и медицинских регистраторов, обязанности заведующего выполняет вместо 0,25 должности врача - лаборанта; от 3 до 6 должностей врачей - лаборантов, лаборантов и медицинских регистраторов - вместо 0,5 должности врача - лаборанта; от 6 до 12 должностей врачей - лаборантов, лаборантов и медицинских регистраторов - вместо 0,75 должности врача - лаборанта, свыше 12 должностей врачей - лаборантов, лаборантов и медицинских регистраторов - освобожденная от диагностической работы должность заведующего лабораторией.

Должности санитарок в лаборатории устанавливаются соответственно числу должностей врачей - лаборантов, включая должность заведующего.

Эффективность использования метода

Внедрение в практику лабораторий предлагаемых расчетных норм времени на проведение исследований для диагностики сифилиса методом РПГА приведет к оптимизации числа должностей в лаборатории в целом, будет способствовать улучшению организации труда, установлению фактического объема работы и производственной мощности, определению функциональных обязанностей и более правильных соотношений между врачами - лаборантами, лаборантами и медицинскими регистраторами при расстановке и использовании кадров лабораторий кожно - венерологических диспансеров и других лечебно - профилактических учреждений.

Данные нормы предусматривают выполнение названных исследований в соответствии с действующими утвержденными данным приказом методами и методиками. Однако, научно - технические

Документ предоставлен КонсультантПлюс
Дата сохранения: 16.08.2013

достижения в современной медицине неизбежно приводят к тому, что появляются новые методы диагностики, новые приборы, новые средства механизации и автоматизации и т.д. Отсутствие утвержденных норм времени не должно быть препятствием к их внедрению. В таких случаях временные расчетные нормы времени могут быть самостоятельно разработаны в лаборатории и с согласия профсоюзной организации по приказу главного врача учреждения использоваться в своей лаборатории. Разработка новых расчетных норм включает в себя проведение хронометражных замеров фактических затрат времени на отдельные элементы труда и методы исследований, статистическую обработку этих данных, расчет затрат времени на одно исследование. Минимальным числом хронометражных замеров по каждой трудовой операции является 20-25.