

- буфер для разведения конъюгата;
- отмывающий раствор (при этом делают корректировку в зависимости от применения ручного или автоматизированного способа отмывания планшетов).

Растворы конъюгата, субстрата и хромогена разводят непосредственно перед внесением в лунки, так как растворы не стойки и подвергаются разложению при хранении на свету даже в течение очень короткого времени.

Флаконы с реагентами после приготовления рабочих растворов плотно закрывают крышками. Неиспользуемые стрипы сразу же убирают в металлизированную фабричную упаковку, содержащую пакетики с силикагелем. Все компоненты тест-системы используют в течение 1 месяца после начала работы с наборами, их хранят в условиях бытового холодильника  $+2...8^{\circ}\text{C}$ .

#### **12.1.4. Методика постановки ИФА с отдельными тест-системами**

Перед началом исследования лаборант или врач КЛД, ответственный за проведения исследования, проверяют правильность расстановки пробирок с сывороткой крови в штативах.

Целесообразно использовать прием, когда в начале работы первый ряд в штативе оставляют свободным, чтобы по мере отбора и внесения проб отработанные пробирки переставлять в штативе вперед на свободный ряд; при этом в любой рабочий момент можно точно определить, какую пробирку следует брать следующей.

Каждую пробу набирают индивидуальным наконечником пипеточного дозатора.

##### **2.1.4.1. Применение тест-системы иммуноферментной для выявления антител к возбудителю сифилиса «ИФА-АНТИ-ЛЮИС» Набор 1: «ИФА-АНТИ-ЛЮИС-GM» (НПО «Диагностические системы», г. Нижний Новгород):**



- перед началом исследования планшет или стрипы, сенсibilизированные рекомбинантными антигенами бледной трепонемы, промывают 2 раза фосфатно-солевым раствором с добавлением твина (ФСР-Т, приготовленным в соответствии с указаниями инструкции из 10- или 25-кратного концентрата), внося в каждую лунку по 350–400 мкл ФСР-Т (лунки заполняют до краев), выдерживают 30–60 секунд и удаляют промывочный раствор в емкость для сбора инфицированного материала;
- в 1 лунку планшета вносят 100 мкл положительного контроля (К+); в 4 лунки — по 100 мкл отрицательного контроля (К-), в остальные лунки планшета вносят по 90 мкл буфера для разведения контрольных образцов (БР) и по 10 мкл исследуемых образцов биологического материала (при этом достигают разведения 1:10) (см. рис. 16-а); тщательно перемешивают содержимое лунок повторным 3–4 кратным пипетированием при внесении материала или осторожным постукиванием по краю планшета после завершения работы; планшет накрывают крышкой, отмечают время постановки реакции и ставят для инкубации в течение 30 минут в термостат с температурой  $+37\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ ;

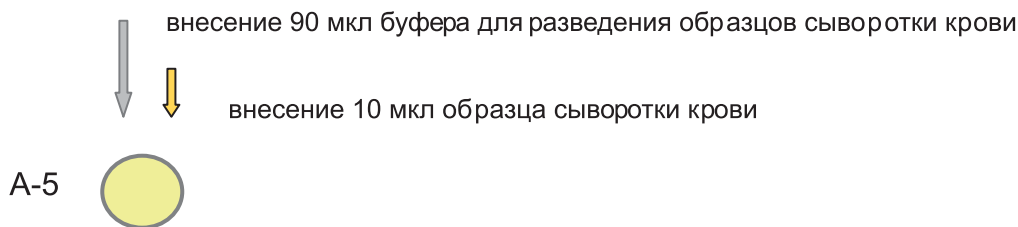


Рис. 16-а. Схема разведения образца биологического материала (вариант I).

- после инкубации содержимое лунок удаляют в емкость для инфицированного материала, планшет промывают 4 раза ФСР-Т;
- во все лунки планшета вносят по 100 мкл свежеприготовленного раствора конъюгата в рабочем разведении, накрывают крышкой, вновь отмечают время и ставят в термостат с температурой  $+37 \pm 0,5$  °C на 30 минут;
- по завершении этапа содержимое лунок удаляют в емкость для инфицированного материала, планшет промывают 4 раза ФСР-Т;
- во все лунки вносят по 100 мкл свежеприготовленной субстратной смеси (СС) и выдерживают в защищенном от света месте 30 минут при комнатной температуре ( $+20 \dots 24$  °C);
- останавливают реакцию внесением в каждую лунку 50 мкл стоп-реактанта;
- через 3-5 минут производят учет результатов на спектрофотометре при двух длинах волн — 450 и 620-680 нм с настройкой прибора на нулевой уровень «по воздуху», допустимо учитывать на одной длине волны — 450 нм;
- критерии приемлемости результатов:
  - значение оптической плотности (ОП) в лунке с К+ не менее 0,6;
  - среднее значение ОП в лунках с К- не более 0,2;
  - значения ОП в отдельных лунках с К- не могут отличаться от среднего значения  $ОП_{К-}$  не более чем на 30%; если одно из значений  $ОП_{К-}$  выходит за пределы этих значений, то его исключают из подсчета среднего значения;
  - более одного значения  $ОП_{К-}$  не может быть исключено из подсчета среднего значения  $ОП_{К-}$ ;
  - при отклонении от указанных параметров исследование повторяют;
- оценку результатов исследования проводят при подсчете коэффициента позитивности (коэффициента реактивности, R) по формуле:

$$R = ОП_{\text{образца}} : (\text{среднее значение } ОП_{К-} + 0,2);$$

- при значениях R более 1,1 — результат положительный;
- при значениях R менее 0,9 — результат отрицательный;
- результаты в интервале от 0,9 до 1,1 попадают «в серую зону» с неопределенным ответом; исследование таких образцов рекомендуют повторить или провести новое исследование этого образца и образца, полученного от пациента через 1–2 недели после получения первого (исследование «парных» сывороток).