ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для выявления антител к *Treponema pallidum*

методом иммунофлюоресценции

«ЛюмиБест антипаллидум»

комплект 1

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор предназначен для выявления антител к антигенам *Treponema pallidum* в сыворотке крови и спинномозговой жидкости (ликворе) человека в реакции иммунофлюоресценции (РИФ-абс и/или $РИФ_{200}$ и РИФц, соответственно).

1.2. Набор рассчитан на проведение 100 анализов, включая контроли.

2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

2.1. Принцип действия

Принцип определения основан на методе непрямой иммунофлюоресценции: специфические антитела, присутствующие в сыворотке крови больных сифилисом или спинномозговой жидкости больных с нейросифилисом, связываются с антигеном, фиксированным на стекле, и выявляются с помощью люминесцентного микроскопа при добавлении антивидовой сыворотки, меченной флюорохромом – флюоресцеин-5-изотиоцианатом (ФИТЦ).

Для снятия неспецифического свечения трепонем при постановке реакции используется связывание групповых антител сорбентом – солевым экстрактом из культуральных бледных трепонем (штаммы V, VII, VIII, IX и Рейтера), обработанных ультразвуком.

2.2. Состав набора:

Набор содержит все необходимые для проведения анализа реагенты, кроме дистиллированной воды и химически чистого ацетона:

– антиген – лиофилизированная взвесь патогенных бледных трепонем штамма Никольса – 1 фл. или 2 фл.;

– положительный контрольный образец ($К^+$) – лиофилизированная сыворотка крови больных с клинически установленным диагнозом, содержащая антитела к антигенам *Treponema pallidum* (при исследовании дает свечение 4+), инактивированная прогреванием – 1 фл.;

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

– слабоположительный контрольный образец ($К^{+}_{слаб.}$) – лиофилизированная сыворотка крови больных с клинически установленным диагнозом, содержащая антитела к антигенам *Treponema pallidum* (при исследовании дает слабую степень свечения антигена на 2+), инактивированная прогреванием – 1 фл.;

– отрицательный контрольный образец ($К^{–}$) – лиофилизированная сыворотка крови здоровых доноров, не содержащая антитела к антигенам *Treponema pallidum*, ВГС, ВИЧ-1,2, антигена р24 ВИЧ-1 и HBsAg (при исследовании не дает свечения или дает свечение на 1+), инактивированная прогреванием – 1 фл.;

– конъюгат – меченные флюорохромом (флюоресцеин-5-изотиоцианатом, ФИТЦ) козьи антитела к IgG человека, лиофилизированные – 1 фл.;

– физиологический раствор (ФР) – 1 фл., 7,0 мл;

– сорбент – лиофилизированный поливалентный солевой экстракт антигенов из культуральных бледных трепонем штаммов V, VII, VIII, IX и Рейтера, дезинтегрированных ультразвуком – 1 фл.;

– 25-кратный концентрат фосфатного буферного раствора (ФБ×25) – 4 фл. по 28,0 мл.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Результат качественного определения набором антител к антигенам *Treponema pallidum* должен соответствовать требованиям СПП+ (рег. № 05-2-77): чувствительность по антителам к антигенам *Treponema pallidum* – 100%.

3.2. Результат качественного определения набором антител к антигенам *Treponema pallidum* должен соответствовать требованиям СПП– (рег. № 05-2-79): специфичность по антителам к антигенам *Treponema pallidum* – 100%.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Потенциальный риск применения набора – класс 2б

При подготовке реагентов набора и исследуемых образцов, а также при постановке реакции иммунофлюоресценции следует соблюдать меры предосторожности, принятые при работе с потенциально инфекционным материалом:

– работать в резиновых перчатках;

– не пипетировать растворы ртом;

– все использованные материалы подвергать обработке дезинфицирующим раствором (например, 6% раствором перекиси водорода или 3% раствором хлорамина не менее 6 ч).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Для приготовления растворов и проведения анализа следует использовать чистую мерную посуду и автоматические пипетки с погрешностью измерения объёмов не более 5%.

Проведение реакции иммунофлюоресценции не требует соблюдения условий стерильности. Предметные стекла и всю посуду, контактирующую с антигеном, необходимо инактивировать без применения дезинфицирующих средств (прокипятить в мыльном растворе в течение 30 мин).

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ:

– Люминесцентный микроскоп с ртутно-кварцевой лампой и иммерсионной системой, окуляром 4× или 5×, системой фильтров, обеспечивающей измерение свечения ФИТЦ (возбуждающий свет с длиной волны 490 нм и эмиссией 520 нм);

– термостат, поддерживающий температуру (37±1) °С;

– холодильник бытовой;

– плитка электрическая;

– пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным или фиксированным объёмом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкости от 5 до 5000 мкл;

– пипетка полуавтоматическая многоканальная со сменными наконечниками, позволяющая отбирать объёмы жидкостей от 5 до 350 мкл;

– перчатки резиновые хирургические;

– предметное стекло;

– бумага фильтровальная лабораторная;

– цилиндр мерный 2-го класса точности вместимостью 100 мл;

– цилиндр мерный вместимостью 1000 мл;

– пробирки стеклянные (или полиэтиленовые микропробирки типа «Eppendorf» или полистироловые разборные планшеты);

– вода очищенная;

– ацетон;

– 6% раствор перекиси водорода.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Для исследования не пригодны желтушные, хилезные и резко гемолизированные образцы сыворотки крови или спинномозговой жидкости, а также образцы с признаками мик-

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

робной контаминации. Желательно использовать для анализа свежеотобранные образцы. Допускается использование образцов, хранившихся при температуре (2-8) °С не более 5 суток, либо при температуре минус 20 °С не более 1 мес. *Сыворотки перед исследованием инактивировать прогреванием при 56°С в течение 30 мин, спинномозговую жидкость не инактивировать.*

7. ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ ИММУНОФЛЮОРЕСЦЕНЦИИ (РИФабс, РИФц, РИФ$_{200}$)

7.1. Перед постановкой реакции все компоненты набора необходимо выдержать не менее 30 мин при температуре (18-25) °С.

7.2. Подготовка предметных стекол

При проведении реакции иммунофлюоресценции использовать предметные стекла, которые в состав набора не входят. Это могут быть специальные предметные стекла для РИФ с обозначенными «лунками» для нанесения препаратов и гидрофобным покрытием вне «лунок» или обычные предметные стекла для микроскопирования, на обратной стороне которых стеклорезом обозначены кружки диаметром 0,7 см.

Предметные стекла должны быть предварительно подготовлены: чисто вымыты, высушены и обезжирены в 96% этиловом спирте в течение 2 суток. Обезжиренные стекла хранить в 96% этиловом спирте или вытертыми досуха в защищенном от пыли месте.

7.3. Приготовление растворов и реагентов

7.3.1. Антиген

Во флакон с антигеном добавить _____ мкл[1] дистиллированной воды и тщательно взболтать до полного растворения лиофилизированного содержимого. Восстановленную взвесь антигена выдержать в течение 1 ч при комнатной температуре (от 18 до 25 °С), затем тщательно ресуспендировать, используя пипетку или пропуская несколько раз через шприц с тонкой иглой.

Из свежеприготовленной взвеси антигена готовят препараты на предметных стеклах (до 10 препаратов на стекло). Для этого на обезжиренные предметные стекла нанести по 10 мкл разведённого антигена на «лунку» и равномерно распределить его в пределах кружка. Стекла высушить на воздухе и зафиксировать в течение 10 мин в химически чистом ацетоне.

[1] *Объем добавляемой дистиллированной воды подбирается производителем для каждой серии набора.*

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Хранение: стёкла с фиксированным на них антигеном хранить при минус (12–18) °С до 1 мес (в морозильной камере холодильника), проложив их фильтровальной бумагой и поместив в полиэтиленовый пакет.

Восстановленная взвесь антигена хранению не подлежит.

7.3.2. Раствор № 1 (для промывки стекол и приготовления раствора сорбента в рабочем разведении).

Концентрат фосфатного буферного раствора (ФБ×25) тщательно взболтать. При выпадении осадка солей концентрат прогреть перед разведением при температуре (30-40) °С до полного растворения осадка.

Содержимое флакона с концентратом фосфатного буферного раствора развести до 700 мл дистиллированной водой (в случае дробного использования к 10 мл концентрата добавить 240 мл дистиллированной воды).

Хранение: вскрытый флакон с концентратом хранить при (2-8) °С в течение 1 мес; раствор № 1 – при (18-25) °С до 1 недели.

7.3.3. Контрольные образцы

Контрольные образцы ($К^+$, $К^+_{слаб.}$ и $К^-$) растворить добавлением во флаконы по 0,3 мл дистиллированной воды.

Хранение: Приготовленные растворы контрольных образцов хранить при температуре (2-8) °С до 1мес.

7.3.4. Растворы сорбента

Для получения раствора сорбента в предварительном разведении содержимое флакона с сорбентом растворить в 5,0 мл ФР, тщательно перемешать.

Раствор сорбента в рабочем разведении готовить непосредственно перед использованием. Для проведения 10 анализов смешать _____ мкл[2] раствора сорбента в предварительном разведении с 1,0 мл раствора № 1.

Хранение: раствор сорбента в предварительном разведении хранить при (2-8) °С до 1 мес; раствор сорбента в рабочем разведении хранению не подлежит.

7.3.5. Растворы конъюгата

Внимание! Все операции с конъюгатом следует проводить быстро, предохраняя его от воздействия света.

[2] *Объем раствора сорбента в предварительном разведении в расчете на 10 анализов подбирается производителем для каждой серии набора.*

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Раствор конъюгата в предварительном разведении готовить, добавляя во флакон с лиофилизованным конъюгатом _____ мл[3] дистиллированной воды.

Раствор конъюгата в рабочем разведении (в расчете на 10 определений) готовить непосредственно перед использованием, смешивая _____[4] мкл конъюгата в предварительном разведении с _____[5] мл дистиллированной воды.

Хранение: раствор конъюгата в предварительном разведении хранить при (2-8) °С до 1 мес в защищенном от света месте. Раствор конъюгата в рабочем разведении хранению не подлежит.

7.4. Проведение исследования в модификациях РИФабс и РИФц

7.4.1. Подготовить стекла с препаратом антигена (п. 7.3.1), раствор № 1 (п. 7.3.2), контрольные образцы (п. 7.3.3), раствор сорбента в рабочем разведении (п. 7.3.4) и раствор конъюгата в предварительном разведении (п. 7.3.5).

7.4.2. Подготовленные контрольные образцы и инактивированные исследуемые образцы сыворотки крови развести сорбентом в 5 раз. Для этого в чистые пронумерованные пробирки внести по 20 мкл образца сыворотки, добавить по 80 мкл раствора сорбента в рабочем разведении и хорошо перемешать. Ликвор не требует разведения. Для каждого образца использовать новый наконечник для автоматической пипетки.

7.4.3. Нанести по 20 мкл разведенных образцов сывороток или цельного ликвора на антиген, фиксированный на стекле, равномерно распределяя по лунке. Номер препарата на предметном стекле должен соответствовать номеру образца.

7.4.4. Препараты сразу же поместить во влажную камеру, закрыть крышкой и выдержать 30 мин при температуре (37±1) °С (1 фаза реакции).

В качестве влажной камеры можно использовать емкость с крышкой, на дно которой помещена фильтровальная бумага или марля, смоченная водой.

7.4.5. После окончания первой фазы реакции препараты осторожно промыть в первой порции раствора № 1, затем выдержать 10 мин во второй порции раствора № 1 и высушить в термостате при температуре (37±1) °С в течение 20-25 мин.

В это время приготовить необходимое количество раствора конъюгата в рабочем раз-

---

[3] *Объем добавляемой дистиллированной воды подбирается производителем для каждой серии набора.*

[4] *Объем конъюгата в предварительном разведении в расчете на 10 анализов подбирается производителем для каждой серии набора.*

[5] *Объем дистиллированной воды в расчете на 10 анализов подбирается производителем для каждой серии набора.*

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ведении (п. 7.3.5).

7.4.6. На сухие препараты нанести по 20 мкл раствора конъюгата в рабочем разведении, поместить во влажную камеру и выдержать 30 мин при температуре (37±1) °С (2 фаза реакции).

7.4.7. По окончании второй фазы реакции препараты отмыть в новых порциях раствора № 1 и высушить, как описано в п. 7.4.5.

Готовые высушенные препараты следует предохранять от воздействия света.

7.5. Проведение РИФ$_{200}$

В случае необходимости параллельно с РИФабс проводят исследование в модификации РИФ$_{200}$. Набор реагентов позволяет исследовать 50 образцов сыворотки крови (включая контроли) одновременно в двух модификациях РИФ.

Для постановки РИФ$_{200}$ образец необходимо предварительно развести в 200 раз. Это рекомендуется осуществлять в два этапа: сначала развести образец в 10 раз, затем еще в 20 раз, для чего 50 мкл образца добавить к 450 мкл раствора № 1, тщательно перемешать, отобрать 50 мкл разведенного таким образом образца и добавить к 950 мкл раствора № 1. Далее все операции провести согласно пп. 7.4.3 – 7.4.7.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Исследование производить сразу же по окончании реакции. Для этого на поверхность препарата нанести 1 каплю не люминесцирующего иммерсионного масла и приступить к микроскопированию.

Исследование производить в люминесцентном микроскопе с ртутно-кварцевой лампой (например, ДРШ-250) и иммерсионной системой, окуляром 4× или 5×, системой фильтров, обеспечивающей измерение свечения ФИТЦ (возбуждающий свет с длиной волны 490 нм и эмиссией 520 нм), например, с фильтрами СЗС-7 или СЗС-14, ФС-1, БС-8, ЖС-18 или Т-2Н.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

Оценку результатов реакции осуществлять визуально, определяя интенсивность специфического свечения бледных трепонем в «лунках» предметного стекла. Блестящее зелено-желтое свечение трепонем оценивается на 4+, яркое зелено-желтое свечение – на 3+, слабое зелено-желтое свечение – на 2+, очень слабое свечение, при котором трепонемы окрашены чуть интенсивнее фона – на 1+.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Если «лунка» с $К^+$ дает специфическое свечение трепонем на 4+, «лунка» с $К^+_{слаб.}$ – на 2+, а «лунка» с $К^-$ – на 1+ или не дает специфического свечения, результаты исследования учитывать и проводить оценку стекол с исследуемыми образцами.

Если вышеуказанные условия не соблюдаются, исследование считать проведенным неверно и его результаты не учитывать.

При оценке реакции с исследуемыми образцами положительным считают результат, дающий специфическое свечение трепонем на (4+), (3+) и (2+).

Отрицательным считают результат, дающий свечение трепонем на 1+ или совсем не дающий специфического свечения.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

10.1. Наборы хранить и транспортировать при температуре (2-8) °С. Допускается транспортирование при температуре до 25°С не более 10 суток. Замораживание не допускается.

10.2. Срок годности набора реагентов – 12 месяцев со дня выпуска.

По вопросам, касающимся качества набора «ЛюмиБест антипаллидум» обращаться:

АО «Вектор-Бест» по адресу:

630559, Новосибирская область, р.п. Кольцово, Научно-производственная зона, корп.36, комн.211,

тел. (383) 227-67-64, тел./факс (383) 363-13-46.

E-mail: vbobtk@vector-best.ru

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для выявления антител к *Treponema pallidum*

методом иммунофлюоресценции

«ЛюмиБест антипаллидум»

комплект 2

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор предназначен для выявления антител к антигенам *Treponema pallidum* в сыворотке крови и спинномозговой жидкости (ликворе) человека в реакции иммунофлюоресценции (РИФ-абс и/или $РИФ_{200}$ и РИФц, соответственно).

1.2. Набор рассчитан на проведение 80 анализов, включая контроли.

2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

2.1. Принцип действия

Принцип определения основан на методе непрямой иммунофлюоресценции: специфические антитела, присутствующие в сыворотке крови больных сифилисом или спинномозговой жидкости больных с нейросифилисом, связываются с антигеном, фиксированным на стекле, и выявляются с помощью люминесцентного микроскопа при добавлении антивидовой сыворотки, меченной флюорохромом – флюоресцеин-5-изотиоцианатом (ФИТЦ).

Для снятия неспецифического свечения трепонем при постановке реакции используется связывание групповых антител сорбентом – солевым экстрактом из культуральных бледных трепонем (штаммы V, VII, VIII, IX и Рейтера), обработанных ультразвуком.

2.2. Состав набора:

Набор содержит все необходимые для проведения анализа реагенты, кроме дистиллированной воды:

– антиген – взвесь патогенных бледных трепонем штамма Никольса, инактивированная прогреванием, нанесенная на лунки 8-луночного предметного стекла, фиксированная ацетоном – 10 шт.;

– положительный контрольный образец ($К^+$) – лиофилизированная сыворотка крови больных с клинически установленным диагнозом, содержащая антитела к антигенам *Treponema pallidum* (при исследовании дает свечение 4+), инактивированная прогреванием – 1 фл.;

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

– слабоположительный контрольный образец ($К^{+}_{слаб.}$) – лиофилизированная сыворотка крови больных с клинически установленным диагнозом, содержащая антитела к антигенам *Treponema pallidum* (при исследовании дает слабую степень свечения антигена на 2+), инактивированная прогреванием – 1 фл.;

– отрицательный контрольный образец ($К^{–}$) – лиофилизированная сыворотка крови здоровых доноров, не содержащая антител к антигенам *Treponema pallidum*, ВГС, ВИЧ-1,2, антигена р24 ВИЧ-1 и HBsAg (при исследовании не дает свечения или дает свечение на 1+), инактивированная прогреванием – 1 фл.;

– конъюгат – меченные флюорохромом (флюоресцеин-5-изотиоцианатом, ФИТЦ) козьи антитела к IgG человека, лиофилизированные – 1 фл.;

– физиологический раствор (ФР) – по 1 фл., 7,0 мл;

– сорбент – лиофилизированный поливалентный солевой экстракт антигенов из культуральных бледных трепонем штаммов V, VII, VIII, IX и Рейтера, дезинтегрированных ультразвуком – 1 фл.;

– 25-кратный концентрат фосфатного буферного раствора (ФБ×25) – 4 фл. по 28,0 мл.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Результат качественного определения набором антител к антигенам *Treponema pallidum* должен соответствовать требованиям СПП+ (рег. № 05-2-77): чувствительность по антителам к антигенам *Treponema pallidum* – 100%.

3.2. Результат качественного определения набором антител к антигенам *Treponema pallidum* должен соответствовать требованиям СПП– (рег. № 05-2-79): специфичность по антителам к антигенам *Treponema pallidum* – 100%.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Потенциальный риск применения набора – класс 2б

При подготовке реагентов набора и исследуемых образцов, а также при постановке реакции иммунофлюоресценции следует соблюдать меры предосторожности, принятые при работе с потенциально инфекционным материалом:

– работать в резиновых перчатках;

– не пипетировать растворы ртом;

– все использованные материалы подвергать обработке дезинфицирующим раствором (например, 6% раствором перекиси водорода или 3% раствором хлорамина не менее 6 ч).

Для приготовления растворов и проведения анализа следует использовать чистую мерную посуду и автоматические пипетки с погрешностью измерения объёмов не более 5%.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Проведение реакции иммунофлюоресценции не требует соблюдения условий стерильности. Все использованные материалы дезинфицировать в соответствии с требованиями СП 1.3.2322-08 и МУ-287-113-00.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ:

– Люминесцентный микроскоп с ртутно-кварцевой лампой и иммерсионной системой, окуляром 4× или 5×, системой фильтров, обеспечивающей измерение свечения ФИТЦ (возбуждающий свет с длиной волны 490 нм и эмиссией 520 нм);

– термостат, поддерживающий температуру (37±1) °С;

– холодильник бытовой;

– плитка электрическая;

– пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным или фиксированным объёмом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкости от 5 до 5000 мкл;

– пипетка полуавтоматическая многоканальная со сменными наконечниками, позволяющая отбирать объёмы жидкостей от 5 до 350 мкл;

– перчатки резиновые хирургические;

– бумага фильтровальная лабораторная;

– цилиндр мерный 2-го класса точности вместимостью 100 мл;

– цилиндр мерный вместимостью 1000 мл;

– пробирки стеклянные (или полиэтиленовые микропробирки типа «Eppendorf» или полистироловые разборные планшеты);

– вода очищенная;

– ацетон;

– 6% раствор перекиси водорода.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Для исследования не пригодны желтушные, хилезные и резко гемолизированные образцы сыворотки крови или спинномозговой жидкости, а также образцы с признаками микробной контаминации. Желательно использовать для анализа свежеотобранные образцы. Допускается использование образцов, хранившихся при температуре (2-8) °С не более 5 суток, либо при температуре минус 20 °С не более 1 мес. *Сыворотки перед исследованием инактивировать прогреванием при 56°С в течение 30 мин; спинномозговую жидкость не инактивировать.*

7. ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ ИММУНОФЛЮОРЕСЦЕНЦИИ

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

(РИФабс, РИФц, РИФ$_{200}$)

7.1. Перед постановкой реакции все компоненты набора необходимо выдержать не менее 30 мин при температуре (18-25)°С.

7.2. Приготовление растворов и реагентов

7.2.1. Антиген

Необходимое для проведения анализа количество предметных стекол с антигеном выдержать при комнатной температуре (18-25) °С не менее 30 мин, не вскрывая упаковки. Затем вскрыть упаковку и, не касаясь лунок, осторожно вынуть стекло.

Хранение: Стекла с антигеном без упаковки хранению не подлежат.

7.2.2. Раствор № 1 (для промывки стекол и приготовления раствора сорбента в рабочем разведении).

Концентрат фосфатного буферного раствора (ФБ×25) тщательно взболтать. При выпадении осадка солей концентрат прогреть перед разведением при температуре (30-40) °С до полного растворения осадка.

Содержимое флакона с концентратом фосфатного буферного раствора развести до 700 мл дистиллированной водой (в случае дробного использования к 10 мл концентрата добавить 240 мл дистиллированной воды).

Хранение: вскрытый флакон с концентратом хранить при (2-8) °С в течение 1 мес; раствор № 1 – при (18-25) °С до 1 недели.

7.2.3. Контрольные образцы

Контрольные образцы ($К^+$, $К^+_{слаб.}$ и $К^-$) растворить добавлением во флаконы по 0,3 мл дистиллированной воды.

Хранение: (2-8) °С до 1мес.

7.2.4. Растворы сорбента

Для получения раствора сорбента в предварительном разведении содержимое флакона с сорбентом растворить в 5,0 мл ФР, тщательно перемешать.

Раствор сорбента в рабочем разведении готовить непосредственно перед использованием. Для проведения 10 анализов смешать _____ мкл[1] раствора сорбента в предварительном разведении с 1,0 мл раствора № 1.

Хранение: раствор сорбента в предварительном разведении хранить при (2-8) °С до 1 мес; раствор сорбента в рабочем разведении хранению не подлежит.

[1] *Объем раствора сорбента в предварительном разведении в расчете на 10 анализов подбирается производителем для каждой серии набора.*

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

7.2.5. Растворы конъюгата

Внимание! Все операции с конъюгатом следует проводить быстро, предохраняя его от воздействия света.

Раствор конъюгата в предварительном разведении готовить, добавляя во флакон с лиофилизованным конъюгатом _____ мл[2] дистиллированной воды.

Раствор конъюгата в рабочем разведении (в расчете на 10 определений) готовить непосредственно перед использованием, смешивая _____[3] мкл конъюгата в предварительном разведении с _____[4] мл дистиллированной воды.

Хранение: раствор конъюгата в предварительном разведении хранить при (2-8) °С до 1 мес в защищенном от света месте. Раствор конъюгата в рабочем разведении хранению не подлежит.

7.3. Проведение исследования в модификациях РИФабс и РИФц

7.3.1. Подготовить стекла с препаратом антигена (п. 7.2.1), раствор № 1 (п. 7.2.2), контрольные образцы (п. 7.2.3), раствор сорбента в рабочем разведении (п. 7.2.4) и раствор конъюгата в предварительном разведении (п. 7.2.5).

7.3.2. Подготовленные контрольные образцы и инактивированные исследуемые образцы сыворотки крови развести сорбентом в 5 раз. Для этого в чистые пронумерованные пробирки внести по 20 мкл образца сыворотки, добавить по 80 мкл раствора сорбента в рабочем разведении и хорошо перемешать. Ликвор не требует разведения. Для каждого образца использовать новый наконечник для автоматической пипетки.

7.3.3. Нанести по 20 мкл разведенных образцов сывороток или цельного ликвора на антиген, фиксированный на стекле, равномерно распределяя по лунке. Номер препарата на предметном стекле должен соответствовать номеру образца.

7.3.4. Препараты сразу же поместить во влажную камеру, закрыть крышкой и выдержать 30 мин при температуре (37±1) °С (1 фаза реакции).

В качестве влажной камеры можно использовать емкость с крышкой, на дно которой помещена фильтровальная бумага или марля, смоченная водой.

7.3.5. После окончания первой фазы реакции препараты осторожно промыть в первой порции раствора № 1, затем выдержать 10 мин во второй порции раствора № 1 и высушить в

---

[2] *Объем добавляемой дистиллированной воды подбирается производителем для каждой серии набора.*

[3] *Объем конъюгата в предварительном разведении в расчете на 10 анализов подбирается производителем для каждой серии набора.*

[4] *Объем дистиллированной воды в расчете на 10 анализов подбирается производителем для каждой серии набора.*

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

термостате при температуре (37±1) °С в течение 20-25 мин.

В это время приготовить необходимое количество раствора конъюгата в рабочем разведении (п. 7.2.5).

7.3.6. На сухие препараты нанести по 20 мкл раствора конъюгата в рабочем разведении, поместить во влажную камеру и выдержать 30 мин при температуре (37±1) °С (2 фаза реакции).

7.3.7. По окончании второй фазы реакции препараты отмыть в новых порциях раствора № 1 и высушить, как описано в п. 7.3.5.

Готовые высушенные препараты следует предохранять от воздействия света.

7.4. Проведение $РИФ_{200}$

В случае необходимости параллельно с РИФабс можно провести $РИФ_{200}$. В таком случае набор позволит исследовать 40 образцов сыворотки крови (включая контроли) одновременно в двух модификациях РИФ.

Для постановки $РИФ_{200}$ образец необходимо предварительно развести в 200 раз. Это удобно делать в два этапа: сначала развести образец в 10 раз, затем еще в 20 раз, для чего 50 мкл образца добавить к 450 мкл раствора № 1, тщательно перемешать, отобрать 50 мкл разведенного таким образом образца и добавить к 950 мкл раствора № 1. Далее все операции провести согласно пп. 7.3.3 – 7.3.7.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Исследование производить сразу же по окончании реакции. Для этого на поверхность препарата нанести 1 каплю не люминесцирующего иммерсионного масла и приступить к микроскопированию.

Исследование производить в люминесцентном микроскопе с ртутно-кварцевой лампой (например, ДРШ-250) и иммерсионной системой, окуляром 4× или 5×, системой фильтров, обеспечивающей измерение свечения ФИТЦ (возбуждающий свет с длиной волны 490 нм и эмиссией 520 нм), например, с фильтрами СЗС-7 или СЗС-14, ФС-1, БС-8, ЖС-18 или Т-2Н.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

Оценку результатов реакции осуществлять визуально, определяя интенсивность специфического свечения бледных трепонем. Блестящее зелено-желтое свечение трепонем оценивается на 4+, яркое зелено-желтое свечение – на 3+, слабое зелено-желтое свечение – на 2+, очень слабое свечение, при котором трепонемы окрашены чуть интенсивнее фона – на 1+.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Если «лунка» с $К^+$ дает специфическое свечение трепонем на 4+, «лунка» с $К^+_{слаб.}$ – на 2+, а «лунка» с $К^-$ – на 1+ или не дает специфического свечения, результаты исследования учитывать и проводить оценку стекол с исследуемыми сыворотками.

Если вышеуказанные условия не соблюдаются, исследование считать проведенным неверно и его результаты не учитывать.

При оценке реакции с исследуемыми образцами положительным считают результат, дающий специфическое свечение трепонем на (4+), (3+) и (2+).

Отрицательным считают результат, дающий свечение трепонем на 1+ или совсем не дающий специфического свечения.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

10.1. Наборы хранить и транспортировать при температуре (2-8) °С. Допускается транспортирование при температуре до 25°С не более 10 суток. Замораживание не допускается.

10.2. Срок годности набора реагентов – 12 месяцев со дня выпуска.

По вопросам, касающимся качества набора «ЛюмиБест антипаллидум» обращаться в

в **АО «Вектор-Бест»** по адресу:

630559, Новосибирская область, р.п. Кольцово, Научно-производственная зона, корп.36, комн.211,

тел. (383) 227-67-64, тел./факс (383) 363-13-46.

E-mail: vbobtk@vector-best.ru

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru