«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный Директор
ЗАО «ЭКОлаб»

_____ В.Ю. Борисов
«05» 09 2016 г.

Инструкция по применению
«Набор реагентов для определения антител
к Vi-антигену сальмонелл в реакции пассивной гемагглютинации»
«Vi-Сальмонелла РПГА»

Регистрационное удостоверение №_____ от __.___._____

НАЗНАЧЕНИЕ

«Набор реагентов для определения антител к Vi-антигену сальмонелл в реакции пассивной гемагглютинации» «**Vi-Сальмонелла РПГА**» предназначен для выявления антител к Vi-антигену возбудителя брюшного тифа в реакции пассивной гемагглютинации (РПГА), в формате качественного и полуколичественного тестов.

«Vi-Сальмонелла РПГА» показан к применению для выявления бактерионосителей, в том числе среди работников пищевых предприятий. При обследовании лиц, контактировавших с больными брюшным тифом или носителями S. typhi. Для оценки эффективность вакцинации против брюшного тифа.

Помимо брюшного тифа выявление антител к Vi-антигену возможно при сальмонеллезах обусловленных Salmonella paratyphi C и Salmonella dublin, которые также способны к продукции Vi-антигена.

СОСТАВ И КОМПЛЕКТАЦИЯ НАБОРА

Тест-эритроциты – **ТЭ**	1 фл. (9,0 мл)
Контрольные эритроциты - **КЭ**	1 фл. (9,0 мл)
Раствор для разведения образцов - **РРО**	1 фл. (20 мл)
Контрольный положительный образец - **К+**	1 фл. (0,5 мл)
Контрольный отрицательный образец - **К–**	1 фл. (0,5 мл)
Планшет для микротитрования	2 шт.

- **Тест-эритроциты (ТЭ)** - суспензия формалинизированных эритроцитов барана, сенсибилизированных Vi-антигеном возбудителя брюшного тифа; суспензия красно-коричневого цвета.
- **Контрольные эритроциты (КЭ)** – суспензия формалинизированных, несенсибилизированных эритроцитов барана, суспензия красно-коричневого цвета.
- **Раствор для разведения образцов (РРО)** – раствор для разведения образцов: сыворотки (плазмы) крови, прозрачная жидкость желто-оранжевого цвета.
- **Контрольный положительный образец (К+)** – жидкая сыворотка крови кролика (или барана), содержащая антитела к Vi-антигену (титр указан на этикетке набора).
- **Контрольный отрицательный образец (К–)** жидкая сыворотка крови кролика (или барана), не содержащая антител к Vi-антигену.
- **Планшет для микротитрования** – планшет полимерный для иммунологических реакций, 96-луночный с круглодонными лунками.
- **Принадлежности:**
  Вспомогательные пластиковые емкости – 3 шт.

ЭЛЕКТРОННАЯ КОПИЯ ОФОРМЛЕНА ЦЕНТРОМ ИСПЫТАНИЙ И РЕГИСТРАЦИИ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ

Компоненты набора и принадлежности упакованы в коробку, в коробку вложена инструкция по применению.

ОСНОВНЫЕ ПОТРЕБИТЕЛЬСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

- Набор рассчитан на проведение 64 анализов, включая контроли, в формате качественного (скринингового) метода или на 12 анализов, включая контроли, в формате титрования сывороток (полуколичественного метода).
- Для исследования берутся образцы сыворотки (плазмы) крови в объеме 10 мкл.
- Цветовая индикация внесения образца.
- Все компоненты набора готовы к применению.
- Общая протяженность инкубационных этапов анализа составляет 2 часа.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Метод основан на реакции пассивной (непрямой) гемагглютинации. При наличии антител к Vi-антигену наблюдается гемагглютинация эритроцитов, сенсибилизированных Vi-антигеном. Это приводит к образованию на дне лунок планшета "зонтика" из осевших эритроцитов. При отсутствии антител к Vi-антигену гемагглютинации сенсибилизированных эритроцитов не происходит, оседая эритроциты образуют "точку".

АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Чувствительность и специфичность набора определяется по стандартной панели сывороток предприятия, содержащих и не содержащих антитела к антигенам Salmonella Typhi ($СОП_{725}$АТ(+/-)S.Typhi), как процентное содержание образцов, определенных набором как положительные либо отрицательные, и составляет 100%.

Титром стандартных образцов предприятия $СОП_{725}$АТ(+/-)S.Typhi считается последнее разведение, в котором получен положительный результат не менее чем на (3+). Титр определяется в формате полуколичественного анализа и не должен отличаться от паспортного значения более чем в 2 раза.

Диагностическая чувствительность (с доверительной вероятностью 95%) составила:

Статистическая достоверность результатов диагностической чувствительности испытаний составила:

Заключение	Общее число клинических образцов с истинно положительными результатами анализа (n)	Негативный результат	Позитивный результат	Диагностическая чувствительность (с доверительной вероятностью 95%)
Положительных по антителам к Vi-антигену сальмонелл	122	0	122	98,13% - 100%

Статистическая достоверность диагностической чувствительности для каждого вида биологического материала составила:

Вид клинического материала	Количество образцов от пациентов		Общее количество образцов от пациентов	Диагностическая чувствительность (с доверительной вероятностью 95%), не менее %
	При проведении клинических испытаний	Всего (по результатам внутренних лабораторных и клинических испытаний)		
Сыворотки, содержащие антитела к Vi-антигену сальмонелл	8	16	16	86,59

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Сыворотки, содержащие антитела к Vi-антигену сальмонелл (сыворотки здоровых доноров с добавлением сыворотки диагностической сальмонеллезной Vi)	20	44	44	94,90
Образцы плазмы, содержащие антитела к Vi-антигену сальмонелл	9	18	18	87,99
Образцы плазмы, содержащие антитела к Vi-антигену сальмонелл (плазма здоровых доноров с добавлением сыворотки диагностической сальмонеллезной Vi)	20	44	44	94,90

Оценка результатов:

Полученные результаты показали, что диагностическая чувствительность для клинических **образцов составила:**

Клинический материал	Заключение	Результаты испытаний
		Диагностическая чувствительность (с доверительной вероятностью 95%)
Сыворотка крови	Выявлены антитела к Vi-антигену сальмонелл	96,23% - 100%
Плазма крови	Выявлены антитела к Vi-антигену сальмонелл	96,35% - 100%

Диагностическая специфичность (с доверительной вероятностью 95%) составила:

Статистическая достоверность результатов диагностической специфичности испытаний составила:

Заключение	Общее число клинических образцов с истинно отрицательными результатами анализа (n)	Негативный результат	Позитивный результат	Диагностическая специфичность (с доверительной вероятностью 95 %)
Отрицательных по антителам к Vi-антигену сальмонелл	1432	1432	0	99,84% - 100%

Статистическая достоверность диагностической специфичности для каждого вида биологического материала составила:

Вид клинического материала	Количество образцов от пациентов		Общее количество образцов от пациентов	Диагностическая специфичность (с доверительной вероятностью 95%), не менее %
	При проведении клинических испытаний	Всего (по результатам внутренних лабораторных и клинических испытаний)		

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Сыворотки от здоровых доноров, не содержащие антитела к Vi-антигену сальмонелл	330	680	680	99,66
Сыворотки от пациентов стационарной больницы, не содержащие антитела к Vi-антигену сальмонелл	-	342	342	99,33
Сыворотки, содержащие антитела к О-антигенам сальмонелл групп B,D,C1,C2 и E, не содержащие антитела к Vi-антигену сальмонелл	10	40	40	94,40
Сыворотки, содержащие к возбудителю сифилиса, не содержащие антитела к Vi-антигену сальмонелл	10	40	40	94,40
Сыворотки, содержащие антитела к ВИЧ, не содержащие антитела к Vi-антигену сальмонелл	10	40	40	94,40
Сыворотки, содержащие антитела к вирусу гепатита В, не содержащие антитела к Vi-антигену сальмонелл	10	40	40	94,40
Сыворотки, содержащие антитела к вирусу гепатита С, не содержащие антитела к Vi-антигену сальмонелл	10	40	40	94,40
Образцы плазмы, не содержащие антитела к Vi-антигену сальмонелл	90	210	210	98,91

Оценка результатов:

Полученные результаты показали, что диагностическая специфичность для клинических образцов составила:

Клинический материал	Заключение	Результаты испытаний
		Диагностическая специфичность (с доверительной вероятностью 95%)
Сыворотка крови	Не выявлены антитела к Vi-антигену сальмонелл	95,86% - 100%
Плазма крови	Не выявлены антитела к Vi-антигену сальмонелл	98,91% - 100%

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

ИССЛЕДУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Цельные образцы сыворотки (плазмы) крови человека в объеме 10 мкл.

Для образцов, принятых к исследованию, допускается хранение при 2-8^{0}С в течение 7 суток или в замороженном виде (-20^{0}С и ниже) неограниченно долго. После размораживания образцы следует тщательно перемешать.

Образцы, содержащие агрегированные частицы фибрина или иные видимые глазом примеси, перед исследованием необходимо осветлить центрифугированием.

Для исключения недостоверных результатов не рекомендуется анализировать сыворотки с микробным ростом, гемолизом, повышенным содержанием липидов или подвергшиеся многократному (более 5 раз) замораживанию и оттаиванию.

Перед проведением тестирования анализируемые образцы, изъятые из холодильных камер, необходимо выдержать на лабораторном столе в течение 30-60 мин до достижения ими температуры окружающей среды (от 18 до 30^{0}С).

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Набор биологически безопасен, однако с исследуемыми образцами необходимо обращаться как с потенциально инфицированным материалом.

Потенциальный риск применения набора – класс 2б (Приказ МЗ РФ №4н от 6 июня 2012 г.).

Меры предосторожности при работе с набором – соблюдение правил "Инструкции по мерам профилактики распространения инфекционных заболеваний при работе в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений" (Утв. Минздравом СССР 17 января 1991 г.), ГОСТ Р 52905–2007 (ИСО 15190:2003).

Утилизацию или уничтожение, дезинфекцию наборов реагентов следует проводить в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 "Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами" и МУ 287-113 "Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения".

СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ

Оборудование и материалы

- Секундомер, холодильная камера с температурным режимом 2-8^{0}С.
- Пипетки полуавтоматические с рабочими диапазонами: 5-50 мкл, 20-200 мкл.
- Одноразовые наконечники к указанным пипеткам.
- Контейнеры для жидких и твердых отходов.
- Резиновые или латексные перчатки, средства дезинфекции.

ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ И ОБРАЗЦОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

Все компоненты набора готовы к применению.

Перед проведением анализа извлечь набор из холодильной камеры, выставить компоненты набора, включая планшет, на лабораторный стол, выдержать не менее 30 мин.

Перед вскрытием содержимое флаконов с КЭ и ТЭ перемешать встряхиванием для получения гомогенной суспензии.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

КАЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ

Для каждого исследуемого образца задействовать 3 лунки планшета

Первая лунка - для разведения 1:20 исследуемой сыворотки или К+, или К-.

Вторая лунка - для проведения реакции разведенного 1:20 образца с контрольными эритроцитами (КЭ).

Третья лунка - для проведения реакции разведенного 1:20 образца с тест-эритроцитами (ТЭ).

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Внести по 190 мкл раствора для разведения образцов (РРО) в первый короткий ряд планшета. Во второй ряд планшета внести по 50 мкл КЭ. В третий – по 50 мкл ТЭ.

Внести по 10 мкл контрольных и анализируемых образцов в лунки первого ряда планшета. Например, в первую лунку – К-, во вторую – К+, в остальные лунки - анализируемые сыворотки. При внесении образцов перемешивать содержимое лунок трехкратным пипетированием. Полученное разведение образцов в лунках - 1:20. Цвет РРО в лунке после добавления образца должен измениться с желто-оранжевого на красный.

Из каждой лунки первого ряда внести 50 мкл, разведенного 1:20 образца, в соответствующую лунку второго ряда с КЭ и в соответствующую лунку третьего ряда с ТЭ. При добавлении образцов к эритроцитам перемешайте содержимое лунок трехкратным пипетированием. Конечное разведение образцов в лунках с эритроцитами 1:40.

Если требуется проанализировать более 8-ми образцов и задействовать более трех рядов планшета, удобней пользоваться 8-ми канальной пипеткой и пластиковыми емкостями. В Таблице 1 приведен рекомендуемый расход реагентов.

Например, при использовании всех лунок планшета (12 рядов), необходимо задействовать 3 пластиковые емкости. В первую емкость внести 10 мл РРО, во вторую и третью по 3,0 мл КЭ и ТЭ, соответственно.

С помощью многоканальной пипетки внести по 190 мкл РРО в 1, 4, 7 и 10 ряды планшета, затем, по 50 мкл КЭ внести в ряды: 2, 5, 8 и 11, по 50 мкл ТЭ в ряды: 3, 6, 9 и 12.

В лунки с РРО внести контрольные: К+ и К-, и 30 анализируемых образцов.

После окончания процедуры внесения образцов с помощью 8-ми канальной пипетки перенести по 50 мкл разведенных образцов ряда 1 последовательно в ряд 2 с КЭ и в ряд 3 с ТЭ.

Смените наконечники на 8-ми канальной пипетке и повторите процедуру для следующих рядов: 4-6, и так далее. При добавлении образцов к эритроцитам перемешивайте содержимое лунок трехкратным пипетированием.

Планшет выдержать 2 часа при температуре окружающей среды (от 18 до 30^{0}С) в условиях, исключающих вибрацию, после чего учесть результаты реакции.

Примечание: образцы плазмы, полученные с использованием Глюгицира (гемоконсервант контейнеров типа «Гемасин»), не изменяют цвет РРО.

Таблица 1

Кол-во рядов планшета	РРО (мл)	КЭ (мл)	ТЭ (мл)	Кол-во проб +(К+ и К-)
6	5,0	2,0	2,0	14 (16)
9	7,5	2,5	2,5	22 (24)
12 (1 планшет)	10	3,0	3,0	30 (32)
24 (2 планшета)	20	6,0	6,0	60 (64)

Учет результатов

Результаты анализа исследуемых образцов учитывать при соблюдении условий:

- Контрольный положительный образец (К+) дает положительный результат не ниже (3+) с ТЭ и отрицательный результат с КЭ.
- Контрольный отрицательный образец (К-) дает отрицательный результат как с ТЭ, так и с КЭ.
- При несоблюдении вышеуказанных условий, результаты анализа исследуемых образцов считать недействительными, а набор не подлежит дальнейшему использованию.

При соблюдении вышеуказанных условий, результаты анализа образцов оцениваются в баллах по внешнему виду осадка тест-эритроцитов (ТЭ), как показано на рисунке 1. Контролем

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

служит реакция с контрольными эритроцитами (КЭ), которая в каждом тесте должна давать отрицательный результат.

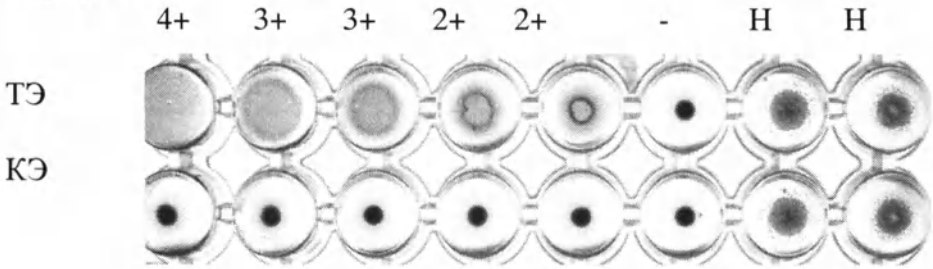

Рис 1.

- **(4+) Резко положительный** – ровный слой ("зонтик") агглютинированных эритроцитов, распределенных по дну лунки.
- **(3+) Положительный** – на фоне агглютинированных эритроцитов на большей части дна лунки формируется заметное кольцо с размытыми краями.
- **(2+) Слабоположительный** – на фоне агглютинированных эритроцитов в центральной части дна лунки формируется маленькое кольцо с четкими краями.
- **(–) Отрицательный** – на свободном от эритроцитов окружающем фоне на дне лунки формируется компактный осадок ("пуговка") или небольшой рыхлый осадок эритроцитов с незначительным просветом в центральной части.
- **Положительным результатом** считают гемагглютинацию не менее чем на (2+) креста.
- **(Н) Неопределенный результат** – эритроциты, как ТЭ, так и КЭ дают положительную реакцию (2+) и выше.

При получении неопределенного результата (положительного результата с ТЭ и КЭ) исследование образца необходимо повторить. Повторное получение аналогичного результата свидетельствует о наличии в исследуемой сыворотке антиэритроцитарных антител, которые необходимо предварительно абсорбировать. Для этого в чистую пробирку (микропробирку на 1,5 мл) внести 200 мкл суспензии КЭ и 10 мкл сыворотки, содержимое пробирки перемешать. Выдержать пробирку 30 мин при температуре окружающей среды (от 18 до 30^0С), после чего осадить эритроциты центрифугированием: 3 мин, с ускорением 2000 g. Надосадочную жидкость непосредственно использовать по 50 мкл в реакциях с КЭ и ТЭ. Время проведения реакции -2 часа, оценка результатов, как указано выше по тексту.

ПОЛУКОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ

Проводить с образцами, давшими положительный и резко положительный результат при качественном анализе.

Проводить с обязательным параллельным титрованием К+.

Для титрования использовать все 8 лунок короткого ряда планшета.

В первые лунки коротких рядов для растительровки исследуемых сывороток внести 90 мкл РРО. Во все остальные лунки вносят по 50 мкл РРО.

В первую лунку первого ряда внести 10 мкл К+, в другие первые лунки следующих рядов по 10 мкл анализируемых сывороток (разведение 1:10). Каждый образец вносят индивидуальным наконечником и перемешивают раствор в лунке трехкратным пипетированием (цвет растворов в лунках должен измениться с желто-оранжевого на красный).

Затем из первых лунок (разведение 1:10) переносят по 50 мкл в следующие лунки рядов, получая двукратные разведения от 1:20 до 1:1280. В конце титрования из последних лунок растворы в объеме 50 мкл удаляют. При разведениях 1:40 и выше цвет РРО практически не изменяется.

После проведения процедуры титрования образцов во все лунки каждого ряда внести по 50 мкл ТЭ.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Планшет осторожно покачать, чтобы перемешать содержимое лунок, и выдержать 2 часа при температуре окружающей среды (от 18 до 30^{0}С) в условиях, исключающих вибрацию, после чего учесть результаты реакции.

Внимание! *Внесение ТЭ увеличивает разведение образцов в 2 раза, что необходимо учитывать при учете титра антител.*

Учет результатов

Результаты титрования учитывают также как при качественном определении.

Титром антител в исследуемом образце считается последнее разведение, в котором получен положительный результат не менее чем на (3+), умноженное на 2 (учет разведения образца при внесении ТЭ).

Титр антител в исследуемом образце учитывают при условии, что титр К+, полученный в реакции, отличается от указанного в паспорте не более чем в 2 раза.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Лица, у которых обнаружены антитела к Vi-антигену в скрининговом тесте: положительная реакция (2+ и выше), рассматриваются как подозрительные на носительство возбудителя брюшного тифа. Причиной обнаружения антител к Vi-антигену может являться вакцинация против брюшного тифа в течение последних 3 лет. Помимо S.typhi к продукции Vi-антигена способны некоторые изоляты S. paratyphi C и S.dublin. Для окончательной постановки диагноза необходимо углубленное бактериологическое обследование.

СРОК ГОДНОСТИ.

Срок годности набора – 18 мес. Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит.

ХРАНЕНИЕ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ

Хранение

В упаковке предприятия-изготовителя при температуре от 2 до 8 °С. Замораживание не допускается.

Хранение после вскрытия компонентов набора- в течение всего срока годности при температуре от 2 до 8 °С.

Транспортирование

При температуре от 2 до 8 °С. Замораживание не допускается. Допускается транспортирование при температуре от 9 до 25 °С в течение 10 сут.

УСЛОВИЯ ОТПУСКА

Для учреждений здравоохранения.

По вопросам, касающимся качества и обращения набора **«Vi-Сальмонелла РПГА»**, следует обращаться по адресу 142530 Московская обл., г. Электрогорск, ул. Буденного, д. 1, ЗАО "ЭКОлаб"; тел. (49643) 3-23-11, факс (49643) 3-30-93 – отдел сбыта, (49643) 3-37-30 – ОБТК.

Консультацию специалиста по работе с набором можно получить по тел: 8-909-993-21-00.

Директор ЗАО "ЭКОлаб" по научной работе С.Г.Марданлы

Генеральный директор ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР» П.К. Варнавичус

«05» 09 2016 г.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

ПРОШИТО
В КОЛИЧЕСТВЕ 8 ЛИСТ
«05» 09 2016 год

Ген. Директор
ООО «ВЫМПЕЛ – МЕДЦЕН

И.К. Варнавичус

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU