

УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор ЗАО "ЭКОлаб"
В.И.З.Борисов
" 1 " ноября 2015 г.

ИНСТРУКЦИЯ
по применению набора реагентов
«Диагностикум для выявления антител класса М
к Toxoplasma gondii в реакции иммунофлюоресценции»
«Токсоплазма -Флюороген-IgM»

Регистрационное удостоверение № _____ от _____ 2015г.

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «Диагностикум для выявления антител класса М к Toxoplasma gondii в реакции иммунофлюоресценции» «Токсоплазма-Флюороген-IgM» предназначен для выявления и определения титра антител класса М в реакции иммунофлюоресценции (РИФ) к Toxoplasma gondii в сыворотке крови человека.

СОСТАВ И КОМПЛЕКТАЦИЯ НАБОРА

		Комплект 1	Комплект 2
Антиген Toxoplasma gondii на стекле предметном	инактивированный Toxoplasma gondii (штамм RH), фиксированный в лунках предметного стекла для микроскопии, имеющие матовое гидрофобное тефлоновое покрытие	5 шт	10 шт
ФИТЦ-конъюгат-IgM	козьи антитела против иммуноглобулинов человека класса М, меченные флюоресцеин-5-изотиоционатом (ФИТЦ); прозрачная жидкость с желтоватым оттенком	1 фл. 1,5 мл	1 фл. 2,8 мл
Контрольный положительный образец (K ⁺)	сыворотка крови человека, содержащая антитела класса М к Toxoplasma gondii в титре 1:200 - 1: 12800 (титр указывается для каждой серии набора, содержание антител указывается на этикетке образца); инактивированная; прозрачная бесцветная или слабо желтого цвета жидкость	1 фл. 0,5 мл	1 фл. 0,5 мл
Контрольный отрицательный образец (K ⁻)	сыворотка крови человека, не содержащая антитела к Toxoplasma gondii, инактивированная; прозрачная бесцветная или слабо желтого цвета жидкость	1 фл. 0,5 мл	1 фл. 0,5 мл
Концентрат отмывающего раствора [(OP)к]	прозрачная, слегка опалесцирующая жидкость, возможно выпадение осадка солей белого цвета, растворяющегося при температуре 37 °С в течение 30 мин	1 фл. 40 мл.	2 фл. по 40 мл
Разводящий буферный раствор (РБР)	прозрачная бесцветная жидкость	1 фл. 20 мл	2 фл. по 20 мл

антигнющая дкость	прозрачная бесцветная вязкая жидкость	1 фл. 3,0 мл	1 фл. 3,0 мл
анс голубой	прозрачная жидкость синего цвета	1 фл. 3,0 мл	1 фл. 3,0 мл

Набор дополнительно укомплектован принадлежностями: вспомогательным ланшетом для предварительного разведения образцов -1 шт.

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

Запрещается использование предметных стекол с антигеном, контрольных образцов, ИТЦ-конъюгата из разных серий наборов. Остальные реагенты могут быть использованы для всех постановок РИФ.

ОСНОВНЫЕ ПОТРЕБИТЕЛЬСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Базовые варианты комплектации рассчитаны на исследование 50 и 100 образцов, включая контрольные (на контрольные образцы используется 2 лунки). Возможно проведение раздельных исследований с использованием необходимого количества предметных стекол:

Число предметных стекол	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Число иссл. обр.	1-8	9-18	19- 28	29- 38	39- 48	49- 58	59- 68	69- 78	79- 88	89- 98

ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

Используется метод непрямого иммунофлюоресцентного анализа. При наличии в исследуемых образцах антител к *Toxoplasma gondii* они связываются с антигеном, фиксированном на стекле. После введения в реакционную смесь ФИТЦ-конъюгата образуются комплексы "антиген-антитело к *Toxoplasma gondii* - антитело конъюгата", наличие которых определяется по флюоресценции (желто-зеленое свечение *Toxoplasma gondii*) при просмотре стекол в люминесцентном микроскопе.

ИССЛЕДУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Исследуется сыворотка крови человека объемом 20-25 мкл.

Не допускается исследование образцов с признаками липемии, гемолиза и желтухи, образцов с микробной контаминацией, образцов, подвергшихся многократному замораживанию и оттаиванию, поскольку могут возникнуть неспецифичные результаты.

Допускается исследование гепаринизированных образцов и образцов с ЭДТА.

Допускается исследование сыворотки (плазмы) крови, инаktivированной прогреванием при 56 °C в течение 30 минут.

Образцы, содержащие взвешенные частицы, могут дать некорректный результат. Такие образцы перед использованием следует центрифугировать 10-15 мин при 3000 об/мин.

Перед исследованием образцы могут храниться до 7 сут при температуре от 2 до 8 °C и до 3 мес при температуре минус 20 °C.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Аналитическая чувствительность комплекта набора определяется по стандартной панели положительных сывороток предприятия, содержащих антитела класса М к *Toxoplasma gondii* (СОП_М⁺-203), как процентное содержание образцов, определенных набором как положительные, и составляет 100%.

Аналитическая специфичность комплекта набора определяется по стандартной панели отрицательных сывороток предприятия, не содержащих антитела класса М к *Toxoplasma gondii* (СОП_М⁻-203), как процентное содержание образцов, определенных набором как отрицательные, и составляет 100%.

Диагностический титр IgM-антител к *Toxoplasma gondii* 1:50.

Диагностическая чувствительность при определении на клинических образцах, держащих антитела класса М к *Toxoplasma gondii* – 99,212% (с доверительной вероятностью 90%).

Диагностическая специфичность при определении на образцах крови доноров, не держащих антитела класса М к *Toxoplasma gondii* – 98,872% (с доверительной вероятностью 90%).

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И ОСНОВНЫЕ ПРАВИЛА РАБОТЫ С НАБОРОМ

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

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

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

Цилиндр мерный.

Емкость Коплина или аналогичная для отмывки предметных стекол.

Микропробирки для разведения проб.

Покровные стекла (24х60 мм).

Микропипетки (10-1000мкм) с наконечниками.

Таймер.

Влажная камера (емкость с крышкой и с фильтровальной бумагой или марлей, смоченной водой, на дне).

Емкость полиэтиленовая для промывания с канюлей.

Микроскоп люминесцентный с ртутно-кварцевой лампой и иммерсионной системой, фильтрами СЗС-7 или СЗС-14, ФС-1, БС-8 и ЖС-18.

Вода очищенная (дистиллированная или деионизированная).

Спирт этиловый ректификованный (96 %).

Подготовка реагентов и материалов

Перед работой извлечь набор из холодильника, вскрыть упаковку и выдержать все реагенты перед проведением анализа не менее 30 мин при температуре 20-25 °С.

Приготовление отмывающего раствора (ОР)

(ОР)к интенсивно перемешать (в случае выпадения осадка – прогреть при температуре 37 °С в течение 30 мин до полного растворения солей).

Развести концентрат в 25 раз водой очищенной, для чего при использовании всех стекол набора:

40 мл (ОР)к довести водой очищенной до 1 л,

80 мл (ОР)к довести водой очищенной до 2 л.

При дробном использовании набора развести концентрат водой очищенной, используя объемы концентрата и воды, указанные в табл. 1 для заданного числа предметных стекол.

Таблица 1

Число предм. стекло	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
(ОР)к, мл	8	16	24	32	40	48	56	64	72	80
Вода очищ. мл	до 200	до 400	до 600	до 800	до 1000	до 1200	до 1400	до 1600	до 1800	до 2000

Допускается хранение раствора в течение 14 сут при температуре 2-8 °С и до 7 сут при температуре 18-25 °С.

Подготовка исследуемых образцов

Исследуемые образцы необходимо развести в 50 раз (до диагностического титра) в Р. Это удобнее делать в два этапа: сначала развести образец в 10 раз (например, к 90 мкл Р добавить 10 мкл образца и тщательно перемешать пипетированием), а затем еще в 5 раз (например, к 60 мкл РБР добавить 15 мкл предыдущего разведения образца).

Разведенные образцы могут храниться при температуре 2-8 °С не более 1 сут.

Подготовка других реагентов

Контрольные образцы, РБР, монтирующая жидкость, конъюгат, эванс-голубой готовы к применению.

Проведение анализа

Внимание!

Во время работы со стеклами допускается держать их только за маркированный участок или края. Не допускайте прикосновения к лункам!

Непосредственно перед постановкой проверить целостность вакуумной упаковки (использование стекол с нарушенной вакуумной упаковкой не допускается!), извлечь необходимое число стекол и промаркировать их.

1. Качественное исследование

Рекомендуемая схема постановки.

- | |
|---|
| 1 лунка – K^+ |
| 2 лунка – K^- |
| 3-10 лунки – исследуемые образцы (разведенные 1:50) |

1.1. Осторожно внести по 20 - 25 мкл контрольных и подготовленных исследуемых образцов в соответствующие лунки (полностью покрывая поверхность лунки и не касаясь кончиком пипетки поверхности стекла). Предметные стекла инкубировать 45 мин при температуре 20-25 °С во влажной камере.

Внимание!

Не допускать пересыхания лунок во время инкубаций!

1.2. Осторожно, пользуясь емкостью для промывания с канюлей, один раз промыть предметное стекло ОР. Для предупреждения перекрестной контаминации избегайте промывания одной лунки через другую, промывайте, направляя струю ОР от средней линии предметного стекла последовательно вдоль обоих рядов и не фокусируя ее непосредственно на лунках.

После этого 3 раза промыть предметное стекло ОР в емкости Коплина или аналогичной, предназначенной для отмывки предметных стекол, выдерживая их в ОР при каждой промывке 5 мин и меняя ОР после каждой промывки. Предметное стекло при промывке должно быть полностью погружено в раствор.

Стяхнуть избыток ОР с предметного стекла, нижнюю сторону его осторожно протереть фильтровальной бумагой для удаления влаги.

1.3. В лунки предметного стекла внести по 20 - 25 мкл ФИТЦ-конъюгата.

Предметное стекло инкубировать 30 мин в темноте во влажной камере при температуре 20-25 °С.

1.4. Промыть стекло, как указано в п. 1.2. Внести эванс голубой из расчета 3 капли на 50 мл ОР в емкость Коплина и опустить стекло в раствор.

Использование раствора эванса голубого снижает неспецифичный фон флюоресценции и, таким образом, улучшает читаемость результатов.

Извлечь стекло через 5 минут и промыть ОР, используя емкость для промывания с канюлей.

Нанести на предметное стекло по средней линии (между лунками) монтирующую жидкость, затем сверху осторожно положить покровное стекло, избегая возникновения под ним пузырьков воздуха и убрать излишки монтирующей жидкости фильтровальной бумагой.

микрокопию препарата под люминесцентным микроскопом при общем увеличении 400х-1000х.

Регистрация и учет результатов качественного исследования

Результаты учитывать по наличию и интенсивности желто-зеленого свечения *Toxoplasma gondii* в поле зрения микроскопа, используя шкалу интенсивности, приведенную

Таблица 2

Характер свечения	Запись результата
Максимально яркое (сверкающее) желто-зеленое свечение	(3+)-(4+)
Более яркое желто-зеленое свечение	(2+)
Средне различимое, но слабое желто-зеленое свечение	(1+)
Очень слабое (тусклое) желто-зеленое свечение	(+/-)
Полностью различимое свечение или его полное отсутствие	(-)

Примечание: Различные оптические системы могут давать различия в интенсивности свечения до 1+ и более, поэтому интенсивность свечения следует учитывать только как ориентировочный показатель титра.

Наличие и интенсивность свечения в лунках с исследуемыми образцами можно оценить только при соблюдении следующих условий:

Свечение в лунке с K^+ интенсивностью не ниже 3+ и полное отсутствие свечения в K^- .

В противном случае исследование необходимо повторить.

Интерпретация результатов:

Характеристика	Интерпретация
Наличие свечения ядра, клеточной мембраны и цитоплазмы от (1+) до (4+) у более чем 70 % токсоплазм в поле зрения	Положительный результат (выявлены IgM антитела к <i>Toxoplasma gondii</i>)
Отсутствие свечения ядра, клеточной мембраны и цитоплазмы (-) у более чем 70 % токсоплазм в поле зрения, наблюдается слабое свечение клеточной мембраны и полюсов	Отрицательный результат (IgM антитела к <i>Toxoplasma gondii</i> не выявлены).
Остальные варианты микроскопической картины	Сомнительный результат. Соответствующие образцы должны быть исследованы повторно. При повторном получении сомнительных результатов рекомендуется мониторинг антителообразования у пациента, чтобы исключить возможные неспецифические или перекрестные реакции

Примечание: При выявлении антител класса M слабая клеточная флуоресценция может быть вызвана наличием неспецифических белков.

2. Полуколичественное исследование (определение титра антител)

Проводится только с образцами, давшими положительный результат в качественном исследовании, с обязательным параллельным титрованием K^+ .

При исследовании парных сывороток рекомендуется титрование исследуемых образцов. Если интенсивность флуоресценции образца ниже интенсивности положительного контроля, разводите образец до титра, указанного на флаконе с положительным контролем. Если интенсивность флуоресценции выше интенсивности положительного контроля при качественном исследовании, то разводите образец на два разведения выше контрольного положительного образца.

Для титрования можно воспользоваться вспомогательным планшетом для предварительного разведения образцов. В первые лунки всех рядов внести по 100 мкл

ответствующих образцов, разведенных 1:50 (диагностический титр), во все остальные - по мкл РБР.

Приготовить серийные двукратные разведения каждого образца, для чего в лунку 2 каждого ряда внести 50 мкл соответствующего образца, разведенного 1:50; перемешать и 50 мкл полученного разведения (1:100) внести в лунку 3; перемешать и перенести 50 мкл полученного разведения (1:200) в лунку 4 и т.д. до конечного разведения образца.(или титра).

Каждое из полученных разведений исследовать, как описано в разделе 1 (чистенное исследование).

Титром исследуемого образца считать максимальное разведение, в котором будет получен положительный результат РИФ.

СРОК ГОДНОСТИ

Срок годности 1 год. Набор с истекшим сроком годности использованию не подлежит.

ХРАНЕНИЕ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ

Хранение

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

После вскрытия упаковки неиспользованные реагенты хранить в плотно упоренной таре при температуре от 2 до 8 °С до истечения срока годности набора.

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 «Токсоплазма-люороген-IgM», следует обращаться по адресу 142530 Московская обл., г. Электрогорск, г. Буденного, д. 1, ЗАО "ЭКОлаб"; тел. (49643) 3-23-11, факс (49643) 3-30-93 – отдел сбыта, (49643) 3-37-30 – ОБТК

директор ЗАО "ЭКОлаб" по научной работе



С.Г.Марданлы

СОГЛАСОВАНО"

генеральный директор ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»

Ю.Н. Егоров

» _____ 2015 г.

Handwritten signature

29 ОКТ 2015



КРАТКАЯ СХЕМА ПОСТАНОВКИ РИФ

(«Токсоплазма-Флюороген-IgM»)

Использовать только после тщательного ознакомления с инструкцией

подготовка образцов	Образцы сыворотки крови развести в 50 раз РБР.
нанести	На лунки предметного стекла с фиксированным антигеном по 20 - 25 мкл подготовленных исследуемых и контрольных образцов
инкубация	45 мин, 20-25 °С, во влажной камере
промыть	1 раз ОР с помощью емкости для промывания с канюлей, далее 3 раза по 5 мин в ОР в емкости Коплина
нанести	На каждую лунку по 20 - 25 мкл ФИТЦ-конъюгата
инкубация	30 мин, 20-25 °С, во влажной камере, в темноте
промыть	1 раз ОР с помощью емкости для промывания с канюлей, далее 3 раза по 5 мин в ОР в емкости Коплина
удерживать	5 мин в 50 мл ОР с добавлением 3 капель эванса голубого
промыть	1 раз ОР с помощью емкости для промывания с канюлей
нанести	Монтирующую жидкость, покровное стекло
вести люминесцентную микроскопию (400х-1000х).	

ПРОШИТО
В КОЛИЧЕСТВЕ 7 ЛИСТОВ
« 29 ОКТ 2015 201__ год

Ген. Директор
ООО «ВЫМПЕЛ – МЕДЦЕНТР»

Ю.Н. Егоров

