

УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор ЗАО "ЭКОлаб"

В.Ю.Борисов
"30" декабря 2014 г.

ИНСТРУКЦИЯ по применению

«Диагностикум для выявления антител класса G
к *Toxoplasma gondii* в реакции иммунофлюоресценции»
«Токсоплазма-Флюороген-IgG»

Регистрационное удостоверение № _____ от _____ 2014г.

НАЗНАЧЕНИЕ

Выявление и определение титра антител класса G в реакции иммунофлюоресценции (РИФ) к *Toxoplasma gondii* в сыворотке крови человека.

СОСТАВ И КОМПЛЕКТАЦИЯ НАБОРА

		Комплект 1	Комплект 2
Антиген <i>Toxoplasma gondii</i> на стекле предметном	инактивированный <i>Toxoplasma gondii</i> (штамм RH), фиксированный в лунках предметного стекла для микроскопии, имеющие матовое гидрофобное тефлоновое покрытие	5 шт	10 шт
ФИТЦ-конъюгат-IgG	козьи антитела против иммуноглобулинов человека класса G, 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 G к <i>Toxoplasma gondii</i> в титре 1:400 - 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 <i>Toxoplasma gondii</i> , 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 °C 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
Монтирующая жидкость	прозрачная бесцветная вязкая жидкость	1 фл. 3,0 мл	1 фл. 3,0 мл
Эванс голубой	прозрачная жидкость синего цвета	1 фл. 3,0 мл	1 фл. 3,0 мл

Набор дополнительно укомплектован принадлежностями: вспомогательным планшетом 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, ФИТЦ-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.

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, инактивированной 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 G (СОП_G⁺-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 G (СОП_G⁻-203), как процентное содержание образцов, определенных набором как отрицательные, и составляет 100%.

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

Диагностическая специфичность при определении на образцах крови, не содержащих иммуноглобулины класса G к *Toxoplasma gondii* – 97,0%.

Диагностическая чувствительность при определении на клинических образцах, содержащих иммуноглобулины класса G к *Toxoplasma gondii* – 99,3 %.

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 (24x60 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 от 20 до 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. стекол	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 от 2 до 8 °С и до 7 сут при температуре от 18 до 25 °С.

Подготовка исследуемых образцов

Исследуемые образцы необходимо развести в 50 раз (до диагностического титра) в РБР. Это удобнее делать в два этапа: сначала развести образец в 10 раз (например, к 90 мкл РБР 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 от 2 до 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 30 мин во влажной камере при температуре 20-25 °C.

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 отмытки 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.

Стряхнуть 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 °C.

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

0Регистрация и учет результатов качественного исследования

Результаты учитывать по наличию и интенсивности желто-зеленого свечения *Toxoplasma gondii* в поле зрения микроскопа, используя шкалу интенсивности, приведенную в табл. 2.

Таблица 2

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

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

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

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

В противном случае исследование необходимо повторить.

Интерпретация результатов:

Результат	Интерпретация
Интенсивность свечения ядра, клеточной мембраны и цитоплазмы от (1+) до (4+) у более чем 70 % клеток в поле зрения	Положительный результат (выявлены IgG антитела к <i>Toxoplasma gondii</i>)
Отсутствие свечения ядра, цитоплазмы и клеточной мембраны (-) у более чем 70 % клеток в поле зрения; допускается свечения полюсов токсоплазм	Отрицательный результат (IgG антитела к <i>Toxoplasma gondii</i> не выявлены).
Все 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 G неспецифическая флюоресценция может быть вызвана наличием аутоиммунных антител (ANA, AMA).

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 предварительное разведение исследуемых образцов. Если интенсивность флюоресценции образца ниже интенсивности положительного контроля, разводите образец до титра, указанного на флаконе с положительным контролем. Если интенсивность флюоресценции выше интенсивности положительного контроля, 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 соответствующих образцов, разведенных 1:50 (диагностический титр), во все остальные - по 50 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 K^+).

Каждое из полученных разведений исследовать, как описано в разделе 1 (качественное 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 не допускается.

После вскрытия упаковки неиспользованные реагенты хранить в плотно закупоренной 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 комплекта набора «Токсоплазма-Флюороген-IgG», 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

Директор ЗАО "ЭКОлаб" по научной работе



С.Г.Марданлы

"СОГЛАСОВАНО"

Зав. кафедрой клинической лабораторной диагностики ГБОУ ДПО РМАПО
Минздрава России д.м.н., профессор

"__" ____ 2015 г.

12 ФЕВ 2015



В.В.Долгов

Каждое из полученных разведений исследовать, как описано в разделе 1 (качественное 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 не допускается.

После вскрытия упаковки неиспользованные реагенты хранить в плотно закупоренной 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 комплекта набора «Токсоплазма-Флюороген-IgG», 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

Директор ЗАО "ЭКОлаб" по научной работе



С.Г.Марданлы

"СОГЛАСОВАНО"

Зав. кафедрой клинической лабораторной диагностики ГБОУ ДПО РМАПО Минздрава России д.м.н., профессор

" " 2015 г.

12 ФЕВ 2015



В.В.Долгов

КРАТКАЯ СХЕМА ПОСТАНОВКИ РИФ **(«Токсоплазма-Флюороген-IgG»)**

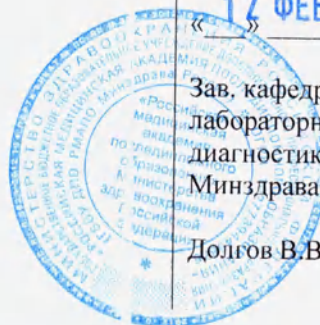
Использовать только после тщательного ознакомления с инструкцией!

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	30 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
Выдержать	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
Провести люминесцентную микроскопию (400х-1000х)	

ПРОШИТО
В КОЛИЧЕСТВЕ 7 ЛИСТОВ

12 ФЕВ 2015

«12» 20 год



Зав. кафедрой клинической
лабораторной
диагностики ГБОУ ДПО РМАПО
Минздрава России, д.м.н., профессор

Долгов В.В. 