

УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор ЗАО "ЭКОлаб"



В.Ю.Борисов
2015 г.

**ИНСТРУКЦИЯ
по применению набора реагентов**

«Диагностикум для выявления антител класса М и G к вирусу простого герпеса 2 типа в реакции иммунофлюоресценции»
«ВПГ-2-Флюороген-скрин»

Регистрационное удостоверение № _____ от _____ 2015г.

Комплект №1
«Диагностикум для выявления антител класса М к вирусу простого герпеса 2 типа в реакции иммунофлюоресценции»
«ВПГ-2-Флюороген-IgM».

НАЗНАЧЕНИЕ

Выявление и определение титра антител класса М к вирусу простого герпеса 2 типа (Г-2) в реакции иммунофлюоресценции (РИФ) в сыворотке крови человека.

СОСТАВ И КОМПЛЕКТАЦИЯ НАБОРА

		Комплект 1/1	Комплект 1/2
аген ВПГ-2 стекле метном	инактивированная клеточная культура инфицированная ВПГ-2, фиксированная в лунках предметного стекла для микроскопии, имеющие матовое гидрофобное тефлоновое покрытие	5 шт	10 шт.
Ц-конъюгат-	козьи антитела к IgM человека, меченные флюоресцеин-5-изотиоционатом (ФИТЦ); прозрачная жидкость с желтоватым оттенком	1 фл. 2,5 мл	2 фл. по 2,5 мл
трольный ужительный изец (K ⁺)	сыворотка крови человека, содержащая антитела класса М к ВПГ-2 в титре 1:40-1:5120 (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
трольный щательный изец (K ⁻)	сыворотка крови человека, не содержащая антитела к ВПГ-2, инактивированная; прозрачная бесцветная или слабо-желтого цвета жидкость	1 фл. 0,5 мл	1 фл. 0,5 мл
центрат ывающего вора [(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

ПРОШИТО
В КОЛИЧЕСТВЕ 8 ЛИСТ
« 06 НОЯ 2015 » 201__ год

Ген. Директор
ООО «ВЫМПЕЛ – МЕДЦЕН



Г. Рахров

одящий рный раствор)	прозрачная бесцветная жидкость	1 фл. 20 мл	1 фл. 20 мл
с голубой	прозрачная синего цвета жидкость	1 фл. 3,0 мл	1 фл. 3,0 мл
тирующая кость	прозрачная бесцветная вязкая жидкость	1 фл. 3,0 мл	1 фл. 3,0 мл

Набор дополнительно укомплектован принадлежностями: вспомогательным шетом 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, Ц- конъюгата из разных серий наборов. Остальные реагенты могут быть использованы всех постановок РИФ.

ОСНОВНЫЕ ПОТРЕБИТЕЛЬСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Базовые варианты комплектации рассчитаны на исследование 50 и 100 образцов, алая контрольные (на контрольные образцы используется 2 лунки). Возможно едение отдельных исследований с использованием необходимого количества метных стекол:

Число едметных стекол	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
по 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 ВПГ-2 они связываются с антигеном редметном стекле. После введения в реакционную смесь ФИТЦ-конъюгата образуются плексы "антиген-антитело к ВПГ-2-антитело конъюгата", наличие которых определяется флюоресценции (желто-зеленое свечение ВПГ-2) при просмотре стекол в инесцентном микроскопе.

ИССЛЕДУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Исследуется сыворотка крови человека.

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

Допускается исследование гепаринизированных образцов и образцов с ЭДТА.

Допускается исследование сыворотки крови, инаktivированной прогреванием при в течение 30 минут.

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

Перед исследованием образцы могут храниться до 7 сут. при температуре 2-8 °С и до с. при температуре минус 20 °С.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Аналитическая чувствительность комплекта набора определяется по стандартной ели положительных сывороток предприятия, содержащих антитела класса М к ВПГ-2 (ОПМ⁺-202), как процентное содержание образцов, определенных набором как ожительные, и составляет 100%.

Аналитическая специфичность комплекта набора определяется по стандартной панели икательных сывороток предприятия, не содержащих антитела класса М к ВПГ-2 (СОПМ⁻), как процентное содержание образцов, определенных набором как отрицательные, и

По данным клинических испытаний, проанализировано 394 образца (проб), из них:
В 86 пробах обнаружены антитела класса М к вирусу простого герпеса 2 типа (ВПГ-

В 308 пробах не обнаружены антитела класса М к вирусу простого герпеса 2 типа (Г-2);

Воспроизводимость – 100%.

Таким образом, диагностическая чувствительность набора составила 97,388%,
диагностическая специфичность – 99,255% с доверительной вероятностью 90%.

Диагностический титр антител класса М к ВПГ-2 – 1:20.

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 (10-1000 мкм) с наконечниками.

Таймер.

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

Емкость полиэтиленовая для промывания с канюлей.

Микроскоп люминесцентный с ртутно-кварцевой лампой и иммерсионной системой, объективами 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 компоненты 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 компонентов 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. стекл	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 20 раз (до диагностического титра) в РБР, для чего 10 мкл образца внести в 190 мкл РБР.

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 – К ⁺
2 лунка – К ⁻
3-10 лунки – исследуемые образцы (разведенные 1:20)

1.1. Осторожно внести по 25-50 мкл контрольных и подготовленных исследуемых образцов в соответствующие лунки (полностью покрывая поверхность лунки и не касаясь никаким пипетки поверхности стекла). Поместить предметные стекла во влажную камеру.

Инкубировать 45 мин при температуре 20-25 °С.

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 логичной, 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.

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

1.3. В лунки предметного стекла внести по 25-50 мкл ФИТЦ-конъюгата.

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

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

Использование раствора эванса голубого снижает неспецифичный фоновый флуоресценции 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 стеклом пузырьков воздуха и убрать излишки монтирующей жидкости фильтровальной бумагой.

ести микроскопию препарата под люминесцентным микроскопом при общем увеличении 200х-1000х.

Учет результатов

Результаты учитывать по наличию и интенсивности желто-зеленого свечения клеток, инфицированных ВПГ-2 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+)
Средне яркое желто-зеленое свечение	(2+)
Различимое, но слабое желто-зеленое свечение	(1+)
Слабое (тусклое) желто-зеленое свечение	(+/-)
Различимое свечение или его полное отсутствие	(-)

Примечание: Различные оптические системы могут давать различия в интенсивности свечения до 1+ и более, поэтому интенсивность свечения следует интерпретировать 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
Наличие цитоплазмы и ядра клеток с интенсивностью от (1+) до (4+) в колониях более чем 3 клеток	Положительный результат (выявлены IgM антитела к ВПГ-2)
Полное отсутствие флюоресценции или едва различимое свечение цитоплазмы клеток	Отрицательный результат (IgM антитела к ВПГ-2 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

Примечания:

1. При выявлении антител класса М слабая флюоресценция цитоплазмы клеток может быть вызвана наличием неспецифических белков.
2. Возможны перекрестные реакции с близкородственными вирусами, такими как ВПГ-1, ЦМВ, ВЭБ, вирус ветряной оспы. Для дифференциации необходимо исследование образца в соответствующих специфических диагностических тестах и определение титров антител.

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 флюоресценции образца ниже интенсивности положительного контроля, разводите образец до титра, указанного на флаконе с положительным контролем. Если интенсивность флюоресценции исследуемого образца ниже интенсивности положительного контроля, рекомендуется продолжить разведение образца выше титра контрольного положительного образца.

Для титрования можно воспользоваться вспомогательным планшетом для аритметического разведения образцов. В первых лунках всех рядов приготовить по 200 мкл соответствующих образцов в разведении 1:20 (диагностический титр), во все остальные - по 100 мкл РБР.

Приготовить серийные двукратные разведения каждого образца, для чего в лунку 2 того же ряда внести 100 мкл соответствующего образца, разведенного 1:20; перемешать и в лунку 3 внести 100 мкл полученного разведения (1:40); перемешать и перенести 100 мкл полученного разведения (1:80) в лунку 4 и т.д. до конечного разведения образца.

Каждое из полученных разведений исследовать, как описано в разделе «Методика исследования» (естественное 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 закрытой 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 в течение 10 сут.

УСЛОВИЯ ОТПУСКА

Для учреждений здравоохранения.

По вопросам, касающимся качества и обращения набора «ВППГ-2-Флюороген-IgM», следует обращаться по адресу 142530 Московская обл., г. Электрогорск, ул. Буденного, д. 1, "ЭКОлаб"; тел. (49643) 3-23-11, факс (49643) 3-30-93. Для оптового сбыта, (49643) 3-37-30 – К.

Директор ЗАО "ЭКОлаб" по научной работе



С.Г.Марданлы

"СОГЛАСОВАНО"

Генеральный директор ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»

Ю.Н. Егоров

« 06 НОЯ 2015 » 2015 г.



КРАТКАЯ СХЕМА ПОСТАНОВКИ РИФ (ВПГ-2-Флюороген-IgM)

Использовать только после тщательного ознакомления с инструкцией

товка образцов	Образцы сыворотки крови развести РБР в 20 раз
ти	На лунки предметного стекла с фиксированным антигеном по 25-50 мкл подготовленных исследуемых и контрольных образцов
бация	45 мин, 20-25 °С, во влажной камере
ыть	1 раз ОР с помощью емкости для промывания с канюлей, далее 3 раза по 5 мин в ОР в емкости Коплина
ти	На каждую лунку по 25-50 мкл ФИТЦ-конъюгата
бация	30 мин, 20-25 °С, во влажной камере, в темноте
ыть	1 раз ОР с помощью емкости для промывания с канюлей, далее 3 раза по 5 мин в ОР в емкости Коплина
ржать	5 мин в ОР с добавлением 3 капель Эванса голубого
ыть	1 раз ОР с помощью емкости для промывания с канюлей
сти	Монтирующую жидкость, покровное стекло
ести люминесцентную микроскопию (200х-1000х)	

Ошибка	Возможные причины
Крестная контаминация	- На лунки предметного стекла наносится избыточный объем реагентов, что способствует их перетеканию в соседние лунки (соблюдайте точность дозировки согласно инструкции). - Жидкость осталась на предметном стекле между лунками, ее рекомендуется аккуратно удалить фильтровальной бумагой, не повреждая клеточный монослой.
В поле зрения мало клеток в поле зрения микроскопа	- Буфер направлен напрямую на субстрат в лунке (промойте, направляя струю ОР от средней линии предметного стекла последовательно вдоль обоих рядов и не фокусируя ее непосредственно на лунках). - Механическое повреждение клеточного монослоя при проведении реакции.
Слабая флуоресценция	- Реагенты не полностью покрывают лунки предметного стекла (обращайте внимание на то, чтобы реагенты полностью покрывали всю поверхность лунки, не допускайте образования пузырей при нанесении реагентов). - Кристаллизация ОР на поверхности лунок предметного стекла (обратите внимание на процедуру отмывки). - Неправильно настроен микроскоп (проверьте настройки микроскопа). - Неподходящее иммерсионное масло.
Пятнистая картина	- Слишком много монтирующей жидкости, или образование воздушных зон при монтировании покровного стекла. - Грязный объектив микроскопа.
Слабая флуоресценция или её отсутствие	- Бактериальная контаминация образца или конъюгата (проверьте соблюдение условий хранения). - Микроскоп неправильно настроен. - Значение pH РБР слишком низкое (значение pH должно соответствовать 7.4 ± 0.2). - Конъюгат подвергался длительному воздействию света (храните конъюгат в защищенном от света месте).
Слабая фоновая флуоресценция	- Может быть вызвана недостаточной влажностью во время инкубации (не допускать высыхания реагентов во время проведения реакции). - Может возникнуть при исследовании образцов с признаками липемии, гемолиза и желтухи, образцов с микробной контаминацией, образцов, подвергшихся многократному замораживанию и оттаиванию. - Маркировка предметного стекла восковым карандашом образует пленку на поверхности лунок (используйте водостойкий маркер).

Следование инструкции поможет избежать ошибок!