

УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор ЗАО "ЭКОлаб"

В.Ю.Борисов
" 24 " 11 2016 г.

ИНСТРУКЦИЯ по применению набора реагентов

«Диагностикум для выявления антител класса G к цитомегаловирусу в реакции иммунофлюоресценции» «ЦМВ-Флюороген-IgG»

Регистрационное удостоверение № _____ от _____ 201 г.

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «Диагностикум для выявления антител класса G к цитомегаловирусу в реакции иммунофлюоресценции» «ЦМВ-Флюороген-IgG» предназначен для выявления и определения титра антител класса G к цитомегаловирусу (ЦМВ) в реакции иммунофлюоресценции (РИФ) на стекле в сыворотке крови человека.

СОСТАВ И КОМПЛЕКТАЦИЯ НАБОРА

		Комплект №1	Комплект №2
Антиген ЦМВ на стекле предметном	инактивированная клеточная культура, инфицированная ЦМВ, фиксированная в лунках предметных стекол	Исполнени е 1 5 шт. (по 10 лунок) Исполнени е 2 10 шт. (по 5 лунок)	Исполнени е 1 10 шт.(по 10 лунок) Исполнени е 2 20 шт. (по 5 лунок)
ФИТЦ-конъюгат-IgG	козьи антитела к IgG человека, меченные флюоресцеин-5-изотиоционатом (ФИТЦ); прозрачная жидкость с желтоватым оттенком	1 фл. 2,5 мл	2 фл. по 2,5 мл
Контрольный положительный образец (K ⁺)	сыворотка крови человека, содержащая антитела класса G к ЦМВ в титре 1:80-1:5120 (титр указывается для каждой серии набора, содержание антител указывается также 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 ЦМВ, 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	2 фл. по 40 мл	2 фл. по 40 мл

Разводящий буферный раствор (РБР)	прозрачная бесцветная жидкость	1 фл. 20 мл	1 фл. 20 мл
Эванс голубой	прозрачная синего цвета жидкость	1 фл. 3,0 мл	1 фл. 3,0 мл
Монтирующая жидкость	прозрачная бесцветная вязкая жидкость	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 на 10 лунок	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Число предметных стекол на 5 лунок	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20
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 ЦМВ они связываются с антигеном на предметном стекле. После введения в реакционную смесь ФИТЦ-конъюгата образуются комплексы "антиген-антитело к ЦМВ - антитело конъюгата", наличие которых определяется по флюоресценции (желто-зеленое свечение ЦМВ) при просмотре стекол в люминесцентном микроскопе.

ИССЛЕДУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Исследуется сыворотка крови человека объемом 10 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 сыворотки 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 2-8 °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 к ЦМВ (СОП⁺-212), 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 к ЦМВ (СОП⁻-212), как процентное содержание образцов, определенных набором как отрицательные, и составляет 100%.

Диагностическая чувствительность (с доверительной вероятностью 95%) составила:
Сыворотка крови человека-99,24% - 100%

Диагностическая специфичность (с доверительной вероятностью 95%) составила:
Сыворотка крови человека-99,53% - 100%

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 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 детальном 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 на 10 лунок	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Число предм. стекол на 5 лунок	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20
(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 кончиком пипетки поверхности стекла). Поместить предметные стекла во влажную камеру.

Инкубировать 30 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 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.

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 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 200х-1000х.

Учет результатов

Результаты учитывать по наличию и интенсивности желто-зеленого свечения клеток, инфицированных ЦМВ 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
Свечение цитоплазмы и крупных включений округлой формы в ядре интенсивностью от (2+) до (4+) в колониях из более чем 3 клеток	Положительный результат (выявлены антитела класса G к ЦМВ)
Полное отсутствие флюоресценции или едва различимое свечение цитоплазмы всех клеток. Возможно точечное свечение цитоплазмы и ядра (неспецифическая реакция с Fc-рецепторами).	Отрицательный результат (антитела класса G к ЦМВ 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 G неспецифическая флюоресценция может быть вызвана наличием аутоиммунных антител (АНА, АМА).
2. Возможны перекрестные реакции с близкородственными вирусами, такими как ВПГ-1, ВПГ-2, ВЭБ, вирус ветряной оспы. Для дифференциации

необходимо исследование образца в соответствующих специфических диагностикумах и определение титров антител.

2. Полуколичественное исследование (определение титра антител)

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

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 выше интенсивности положительного контроля, рекомендуется продолжить разведение образца выше титра контрольного положительного образца.

Для титрования можно воспользоваться вспомогательным планшетом для предварительного 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, согласно рекомендованной схеме разведения:

Разведение	Схема разведения
1:20	190 мкл РБР + 10 мкл неразведенного образца
1:40	100 мкл РБР + 100 мкл образца разведенного 1:20
1:80	100 мкл РБР + 100 мкл образца разведенного 1:40
1:160	100 мкл РБР + 100 мкл образца разведенного 1:80
1:320	100 мкл РБР + 100 мкл образца разведенного 1:1600
1:640	100 мкл РБР + 100 мкл образца разведенного 1:320
1:1280	100 мкл РБР + 100 мкл образца разведенного 1:640
1:2560	100 мкл РБР + 100 мкл образца разведенного 1:1280
1:5120	100 мкл РБР + 100 мкл образца разведенного 1:2560
1:10240	100 мкл РБР + 100 мкл образца разведенного 1:5120

Каждое из полученных разведений исследовать, как описано в разделе I (качественное исследование).

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

СРОК ГОДНОСТИ

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

ХРАНЕНИЕ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ

Хранение

Хранение наборов должно осуществляться в холодильных камерах или холодильниках, обеспечивающих регламентируемый температурный режим, в упаковке предприятия-изготовителя при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности. Замораживание не допускается.

После вскрытия упаковок неиспользованные реагенты допускается хранить в плотно закрытых упаковках в холодильных камерах или холодильниках, обеспечивающих регламентируемый температурный режим, при температуре от 2 до 8 °С до истечения срока годности. Замораживание не допускается.

Транспортирование

При температуре от 2 °С до 8 °С транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида. Замораживание не допускается. Допускается транспортирование при температуре от 9 °С до 25 °С в течение 10 сут.

УСЛОВИЯ ОТПУСКА

Для учреждений здравоохранения.

ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

По вопросам, касающимся качества и обращения набора «ЦМВ-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"

Генеральный директор
ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»

«21» 11 2016 г.

П.К. Варнавичус

**КРАТКАЯ СХЕМА ПОСТАНОВКИ РИФ
«ЦМВ-Флюороген-IgG»**

Использовать только после тщательного ознакомления с инструкцией

Подготовка образцов	Образцы сыворотки крови развести РБР в 20 раз
Нанести	На лунки предметного стекла с фиксированным антигеном по 25-50 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 25-50 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 ОР с добавлением 5 капель Эванса голубого
Промыть	1 раз ОР с помощью емкости для промывания с канюлей
Нанести	Монтирующую жидкость, закрыть покровным стеклом
Провести люминесцентную микроскопию (200х-1000х).	

Возможные причины ошибок при интерпретации результатов

Ошибка	Возможные причины
Перекрестная 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
Слишком мало клеток в поле зрения микроскопа	- Буфер направлен напрямую на субстрат в лунке (промывайте, 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
Неровная флюоресценция	- 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
Нечёткая картина	- Слишком много монтирующей жидкости, или образование воздушных зон при монтировании покровного стекла - грязный объектив микроскопа
Слабая флюоресценция 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)
Сильная фоновая флюоресценция	- 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)

Четкое следование инструкции поможет избежать ошибок!

ПРОШИТО
В КОЛИЧЕСТВЕ 9 ЛИСТОВ

«21» 11 2016 год

Ген. Директор
ООО «ВЫМТЕЛ-МЕДЦЕНТР»
Варнавичус И.К.

Прошнуровано, пронумеровано
и скреплено печатью

9 лист 06
Начальник ОНД ЗАО "ЭКОлаб"
Гашенко Т.Ю.
«21» 11 2016 г.