

УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор ЗАО "ЭКОлаб"

В.Ю.Борисов

"03" 08 2016 г.



ИНСТРУКЦИЯ
по применению набора реагентов
«Диагностикум для выявления антител класса М к вирусу
простого герпеса 1 типа в реакции иммунофлюоресценции»
«ВПГ-1-Флюороген-IgM»

Регистрационное удостоверение № _____ от _____ 2016г.

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «Диагностикум для выявления антител класса М к вирусу простого герпеса 1 типа в реакции иммунофлюоресценции» «ВПГ-1-Флюороген- IgM» предназначен для выявления и определения титра антител класса М к вирусу простого герпеса 1 типа (ВПГ-1) в реакции иммунофлюоресценции (РИФ) в сыворотке крови человека.

СОСТАВ И КОМПЛЕКТАЦИЯ НАБОРА

		Комплект 1	Комплект 2
Антиген ВПГ-1 на стекле предметном	инактивированная клеточная культура, инфицированная ВПГ-1, фиксированная в лунках предметного стекла для микроскопии, имеющего матовое гидрофобное тефлоновое покрытие	5 шт.	10 шт.
ФИТЦ-конъюгат- IgM	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.
Контрольный положительный образец (K ⁺)	сыворотка крови человека, содержащая антитела класса М к ВПГ-1 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.
Контрольный отрицательный образец (K ⁻)	сыворотка крови человека, не содержащая антитела класса М к ВПГ-1, инактивированная; прозрачная бесцветная или слабо-желтого цвета жидкость	1 фл. 0,5 мл.	1 фл. 0,5 мл.
Концентрат отмывающего раствора [(ОР)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.	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 отдельных 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 иммунофлуоресцентного анализа.

При наличии в исследуемых образцах антител к ВПГ-1 они связываются с антигеном на предметном стекле. После введения в реакционную смесь ФИТЦ-конъюгата образуются комплексы "антиген-антитело к ВПГ-1 -антитело конъюгата", наличие которых определяется по флуоресценции (желто-зеленое свечение ВПГ-1) 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 крови, инактивированной прогреванием при 56°C в течение 30 мин.

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 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 М к ВПГ-1 (СОП_М⁺-201), 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 ВПГ-1 (СОП_М⁻-201), как процентное содержание образцов, определенных набором как отрицательные, и составляет 100%.

Диагностическая чувствительность (с доверительной вероятностью 95%):

Сыворотка крови человека-99,0% - 100%

Диагностическая специфичность (с доверительной вероятностью 95%):

Сыворотка крови человека-99,4% - 100%

Диагностический титр антител класса М к ВПГ-1– 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 (10-1000мкм) 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	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 – K^+
2 лунка – K^-
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 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 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 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 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 ВПГ-1 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 ядра интенсивностью от (1+) до (4+) в колониях из 1-3 клеток	Положительный результат (выявлены IgM антитела к ВПГ-1)
Полное отсутствие флюоресценции или едва различимое свечение цитоплазмы всех клеток	Отрицательный результат (IgM антитела к ВПГ-1 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-2, ЦМВ, 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 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 выше интенсивности положительного контроля в качественном исследовании, то разводите образец на два разведения выше 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 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 в течение 10 сут.

УСЛОВИЯ ОТПУСКА

Для учреждений здравоохранения.

По вопросам, касающимся качества и обращения набора «ВПГ-1-Флюороген-IgM», 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»



И.К. Варнавичус

" 03 " 08 2016 г.

КРАТКАЯ СХЕМА ПОСТАНОВКИ РИФ (ВПГ-1-Флюороген-IgM)

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	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 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 3 капель Эванса голубого;
Промыть	1 раз ОР с помощью емкости для промывания с канюлей
Нанести	Монтирующую жидкость, покровное стекло
Провести люминесцентную микроскопию (200х-1000х).	

ПРОШИТО
В КОЛИЧЕСТВЕ 8 ЛИСТОВ
« 03 » 08 201 6 год

Ген. Директор
ООО «ВЫМПЕЛ - МЕДЦЕНТР»

Н.К. Варлавичус

