

ИНСТРУКЦИЯ
по применению набора реагентов
«Диагностикумы эритроцитарные сальмонеллезные O- антигенные групповые
A (1, 2, 12); B (1, 4, 12); C₁ (6, 7); C₂ (6, 8); D (1, 9, 12); E (3, 10), жидкие»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов №2 предназначен для выявления в сыворотке крови человека специфических антител к O-антигенам сальмонелл в реакции пассивной геммагглютинации (РПГА).

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода

Действующим началом диагностикумов являются специфические антигены сальмонелл, фиксированные на поверхности эритроцитов. При взаимодействии с сыворотками, содержащими антитела к сальмонеллам, наблюдается феномен агглютинации эритроцитов.

2.2. Состав набора

Реагенты	Набор
Диагностикумы эритроцитарные сальмонеллезные отдельных основных O-групп сальмонелл по схеме Кауфмана-Уайта получают путем сенсibilизации эритроцитов барана O -антигенами из сальмонелл серогрупп A (1, 2, 12); B (1, 4, 12); C ₁ (6, 7); C ₂ (6, 8); D (1, 9, 12); E (3, 10). Представляют собой 1% взвесь формализированных эритроцитов барана, сенсibilизированных антигенами из сальмонелл в фосфатном буферном растворе (рН - 7,2±0,2; концентрация – 0,06 моль/л). Консервант – формалин. Гомогенная суспензия коричневого цвета без хлопьев; при отстаивании образуется 2 слоя: плотный коричневый осадок эритроцитов и прозрачная желтоватая надосадочная жидкость	1 флакон – 3 мл
Сыворотка диагностическая сальмонеллезная (гомологичная) неадсорбированная сухая – гомогенная масса от белого с коричневатым оттенком до бежевого цвета	1 флакон –из 0,1 мл
1% взвесь формализированных, несенсibilизированных эритроцитов барана - гомогенная суспензия коричневого цвета без хлопьев; при отстаивании образуется 2 слоя: плотный коричневый осадок эритроцитов и прозрачная желтоватая надосадочная жидкость	1 флакон – 1 мл
Раствор для разведений сыворотки и постановки РПГА - 0,9% раствор натрия хлорида - прозрачная бесцветная жидкость, рН от 6,5 до 7,5	2 флакона – по 8 мл
Планшет круглодонный для иммунологических реакций однократного применения - состоит из 8 рядов, каждый из которых включает в себя 12 лунок с прозрачным, бесцветным, круглым дном	1 шт

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Диагностикумы должны агглютинироваться сыворотками диагностическими сальмонеллезными (гомологичными) неадсорбированными сухими в РПГА в разведении не менее, чем 1:6400, диагностикум группы A (1, 2, 12) – 1:1600.

3.2. Время проведения анализа – 2 ч.

3.3. Набор рассчитан на 8 определений.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

При работе с набором следует соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР (М., 1981 г.).

Анализируемые сыворотки, а также находящиеся с ними в контакте реагенты следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные длительное время сохранять или передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусной инфекции - обращаться с ними следует осторожно:

- работать в резиновых перчатках;
- при пипетировании необходимо пользоваться автоматическими дозаторами;
- при завершении работы анализируемые сыворотки и находящиеся с ними в контакте реагенты, инструменты подвергать обработке дезинфицирующим раствором;
- оборудование до и после работы протирать 70% этиловым спиртом.

Анализируемые сыворотки должны быть инактивированы в течение 30 мин при температуре 56 °С.

Входящая в состав набора сыворотка диагностическая сальмонеллезная (гомологичная) неадсорбированная сухая инактивирована.

Объективные результаты анализа гарантируются при выполнении следующих условий:

- хранение всех реагентов набора осуществлять при температуре от 2 до 8 °С;
- не использовать реагенты с истекшим сроком годности;
- не использовать реагенты набора при отсутствии на их упаковке соответствующей маркировки;
- для проведения РПГА использовать реагенты, входящие только в данный набор.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- растворы для обеззараживания;
- резиновые перчатки;
- спирт этиловый 70 %;
- полуавтоматические пипетки с переменным или фиксированным объемом со сменяемыми наконечниками, аттестованные на точность по значению средней дозы и воспроизводимость результатов пипетирования (отклонение не более 3 %);
- термостат на 37 °С;
- контейнер для слива обеззараженных анализируемых сывороток и реагентов;
- контейнер для твердых отходов.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

В качестве анализируемых образцов используется сыворотка крови человека, полученная в соответствии с рабочими инструкциями диагностической лаборатории, проводящей исследование.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Приготовление растворов для РПГА

7.1.1. Приготовление рабочего раствора сыворотки диагностической сальмонеллезной (гомологичной) неадсорбированной сухой:

Вскрыть флакон и растворить сыворотку 0,1 мл 0,9% раствора натрия хлорида и, после полного растворения, внести во все флаконы еще по 0,9 мл 0,9% раствора

натрия хлорида, получив, таким образом, разведение 1:10.

Разведение 1:100, являющееся рабочим разведением, для сыворотки диагностической сальмонеллезной (гомологичной) неадсорбированной сухой готовить в первой лунке прилагаемого планшета: в 1 лунку первого ряда планшета внести 0,09 мл 0,9% раствора натрия хлорида и 0,01 мл сыворотки диагностической сальмонеллезной (гомологичной) неадсорбированной сухой.

7.1.2. Диагностикум и 1% взвесь формализированных, несенсибилизированных эритроцитов готовы к применению. Перед вскрытием флаконы необходимо осторожно встряхнуть до получения однородной суспензии. В ходе работы встряхивание рекомендуется повторять.

7.1.3. 0,9% раствор натрия хлорида. Готов к применению.

7.1.4. Анализируемые сыворотки крови человека должны быть разведены в 10 раз 0,9 % раствором натрия хлорида.

7.2. Проведение РПГА

Во все лунки 2 рядов планшета, кроме первой лунки внести по 0,05 мл 0,9% раствора натрия хлорида.

Растирать 1 ряд сыворотки диагностической сальмонеллезной (гомологичной) неадсорбированной сухой, начиная с первой лунки (1:100), перенося из лунки в лунку при перемешивании по 0,05 мл до титра, указанного на этикетке флакона сыворотки, сбросив 0,05 мл из последней лунки в емкость для отходов вместе с наконечником.

В первые 2 лунки второго ряда внести по 0,05 мл анализируемой сыворотки в разведении 1:10 и растирать начиная со второй лунки (1:20) до титра 1:2560, сбросив 0,05 мл из последней лунки в емкость для отходов вместе с наконечником.

Во все лунки 2 рядов, начиная с последней лунки каждого ряда, внести по 0,025 мл диагностикума.

7.3. Обязательные контроли

Контроль	Результат, при котором реакция может быть учтена
Подтверждение факта агглютинации диагностикума с сывороткой диагностической сальмонеллезной (гомологичной) неадсорбированной сухой	Диагностикумы должны агглютинироваться сыворотками диагностическими сальмонеллезными (гомологичными) неадсорбированными сухими в РПГА в разведении не менее, чем 1:6400, диагностикум группы А – 1:1600
Контроль на отсутствие спонтанной агглютинации диагностикума - в 2 лунки планшета внести по 0,05 мл 0,9% раствора натрия хлорида и по 0,025 мл диагностикума	Реакция отрицательная - все эритроциты осели на дне лунки в виде «пуговки» или «колечка»
Контроль на отсутствие в сыворотках агглютининов к эритроцитам барана - в 2 лунки планшета внести по 0,05 мл сыворотки диагностической сальмонеллезной неадсорбированной сухой и в 2 лунки внести по 0,05 мл каждой анализируемой сыворотки, затем во все лунки внести по 0,025 мл 1% взвеси формализированных, несенсибилизированных эритроцитов барана	Реакция отрицательная - все эритроциты осели на дне лунки в виде «пуговки» или «колечка»
Контроль всех сывороток - для чего каждую из сывороток, включая анализируемые, внести в 2 лунки по 0,05 мл в том разведении, из которого они растиривались	В лунках с сыворотками не должно быть хлопьев и осадка

По окончании постановки реакции планшет осторожно встряхнуть и поместить в термостат при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ на 2 ч.

8. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. Учет реакции производится по четырехкrestной системе:

(4+) – все эритроциты агглютинированы и равномерно покрывают дно лунки в виде «зонтика».

(3+) – агглютинированы почти все эритроциты, на их фоне имеется малозаметное кольцо из осевших неагглютинированных эритроцитов.

(2+) – наряду с равномерным агглютинатом на дне лунки имеется осадок в виде маленького «колечка» или «пуговки».

(1+) – большинство эритроцитов неагглютинировано и осело в виде маленького «колечка» с неровными краями в центре дна лунки.

(-) – признаков агглютинации нет. Эритроциты осели в виде «пуговки» или «колечка» с ровными краями.

Титром антител анализируемой сыворотки считается последнее разведение сыворотки, которое дает агглютинацию не менее чем на (3+).

8.2. Интерпретация результатов

Диагностически достоверным является увеличение (или падение) титров специфических антител на три разведения при исследовании парных образцов сыворотки в динамике заболевания.

Как правило, антитела в наибольшем титре обнаруживают в сыворотке крови только с одним из диагностикумов. В единичных случаях встречаются сыворотки, в которых антитела в разных титрах обнаруживают в реакции с несколькими антигенами. В таких случаях вопрос о возможной серогруппе возбудителя, вызвавшего заболевание у данного больного, решается по наиболее высокому уровню антител, полученному с тем или другим диагностикумом.

Первоначально анализируемые сыворотки проверяют в РПГА с комплексным диагностикумом эритроцитарным сальмонеллезным (набор № 1), а при получении положительного результата – с диагностикумами эритроцитарными сальмонеллезными 0-антигенными каждой группы (набор № 2).

9. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

9.1. Хранение набора реагентов в упаковке производителя должно осуществляться при температуре от 2 до 8°C в течение всего срока годности в строго вертикальном положении. Транспортирование должно проводиться всеми видами крытого транспорта при температуре от 2 до 8°C . Допускается кратковременное (не более 7 сут) транспортирование при температуре от 9 до 25°C .

Срок годности 18 месяцев.

9.2. После вскрытия флаконы с сывороткой диагностической сальмонеллезной (гомологичной) неадсорбированной сухой в разведении 1:10, диагностикумом и 1% взвесью формализированных, несенсибилизированных эритроцитов барана в закрытом виде можно хранить при температуре от 2 до 8°C в течение одного месяца.

9.3. До проведения анализа возможно хранение анализируемых образцов сыворотки крови при температуре минус 20°C не более 2 мес. Разрешается только однократное замораживание и размораживание анализируемых образцов сыворотки крови.

9.4. Исключается использование для анализа гемолизированных и мутных образцов сыворотки крови.

9.5. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

Рекламации на качество набора реагентов «Диагностикумы эритроцитарные сальмонеллезные 0 – антигенные групповые А (1, 2, 12); В (1, 4, 12); С₁ (6, 7); С₂ (6, 8); Д (1, 9, 12); Е (3, 10), жидкие» (набор № 2) направлять в адрес ООО «Био-Диагностика»: РФ, 111524, г. Москва, вн.тер.г. Муниципальный округ Перово, ул. Электродная, д. 10, стр. 3, тел. +7(495)646-23-51, +7(903)72-896-72, bio-d@mail.ru.