

УТВЕРЖДАЮ
Директор РНПЦ эпидемиологии и
микробиологии
_____ В.А. Горбунов
«__» _____ 2019 г.

ИНСТРУКЦИЯ
по применению набора для лабораторной диагностики герпесвирусной
инфекции 1 и 2 типа методом прямой иммунофлуоресценции

ТУ ВУ 100558032.286-2014

Минск, 2019

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

РНПЦ эпидемиологии и микробиологии
ул. Филимонова, 23, 220114 Минск, Беларусь
тел/факс 264-30-93, e-mail: belriem@gmail.com

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для лабораторной диагностики герпесвирусной инфекции 1 и 2 типа методом прямой иммунофлуоресценции

Набор представляет собой иммуноглобулины флуоресцирующие к вирусу герпеса простого 1 и 2 типа. Иммуноглобулины выпускаются в лиофилизированном виде во флаконах по 1,0 мл, по внешнему виду представляют собой пористую массу желтовато-оранжевого цвета. Основным свойством иммуноглобулинов является способность образовывать специфические комплексы антиген-антитело, наличие которых выявляют прямым методом флуоресцирующих антител (МФА).

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор предназначен для выявления антигенов вируса герпеса простого 1 и 2 типа в материале от пациентов и в инфицированной культуре клеток. Каждый флакон иммуноглобулина рассчитан на 60–80 исследований в МФА.

Ком- плектация	Состав набора	Количе- ство
№ 1	- иммуноглобулин флуоресцирующий сухой для лабораторной диагностики герпеса 1 типа - раствор Эванса голубого - стекло предметное (или деколированное) - инструкция по применению	1 фл. 1 фл. 1 шт. 1 шт.
№ 2	- иммуноглобулин флуоресцирующий сухой для лабораторной диагностики герпеса 2 типа - раствор Эванса голубого - стекло предметное (или деколированное) - инструкция по применению	1 фл. 1 фл. 1 шт. 1 шт.
№ 3	- иммуноглобулин флуоресцирующий сухой для лабораторной диагностики герпеса 1 типа - иммуноглобулин флуоресцирующий сухой для лабораторной диагностики герпеса 2 типа - раствор Эванса голубого - стекла предметные (или деколированные) - инструкция по применению	1 фл. 1 фл. 1 фл. 2 шт. 1 шт.

СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ

Приготовление препаратов для флуоресцентной микроскопии

а) Клетки, содержащиеся непосредственно в материале. Для обследования пациентов с предполагаемой вирусной инфекцией забор материала производят из очагов поражения. Используют ватный тампон или одноразовый зонд. Затем тампон помещают в пробирки с физиологическим раствором. Для получения суспензии клеток ватные тампоны отжимают, полученную жидкость центрифугируют 5–6 мин при 3 000 об/мин. Надосадочную жидкость сливают, осадок ресуспендируют в нескольких каплях оставшегося раствора и наносят на предметные стекла отдельными каплями. Полученные препараты высушивают и фиксируют 1 мин в холодном ацетоне (х.ч. или ч.д.а.).

б) Инфицированная культура клеток. Клетки, выращенные во флаконах, отмывают физиологическим раствором, соскабливают стеклянной палочкой, доводят концентрацию

клеток до 80–100 тыс. в 1 мл и раскапывают по 20 мкл в лунку. Фиксируют холодным ацетоном. Аналогично готовят контрольные препараты незараженных культур клеток.

Приготовление рабочих растворов иммуноглобулина

Сухой флуоресцирующий иммуноглобулин растворяют в 1,0 мл дистиллированной воды. Затем, непосредственно перед употреблением, разводят дистиллированной водой до получения рабочего разведения, указанного на этикетке. Для гашения неспецифической флуоресценции добавляют раствор Эванса голубого из расчета 10 мкл на 100 мкл иммуноглобулина.

Разведенный иммуноглобулин при необходимости можно хранить в течение 30 дней при 2–8⁰ С, рабочее разведение рекомендуется готовить по мере надобности, допускается хранение в течение 7 дней при температуре 2–8⁰ С.

Обработка препаратов иммуноглобулином

Фиксированные препараты помещают во влажную камеру (специальную или чашку Петри с влажной фильтровальной бумагой на дне); на каждый препарат наносят каплю (20 мкл) рабочего разведения иммуноглобулина и выдерживают в течение 30 мин при 37⁰ С. Затем препарат промывают дистиллированной водой трижды по 1–2 мин и высушивают.

Оценка результатов

Исследование подготовленных препаратов проводят на люминесцентном микроскопе с использованием иммерсионного объектива $\times 90$ и сине-фиолетовых светофильтров возбуждения. При этом следует пользоваться только нефлуоресцирующим иммерсионным маслом или его заменителями (диметилфталат, водная иммерсия). Допускается просмотр препаратов без иммерсии.

Обращают внимание на характер и локализацию специфического ярко-зеленого свечения и его интенсивность. Для вируса герпеса характерно многообразие в характере свечения, от глыбок в ядрах и свечения в околядерной области цитоплазмы до диффузного свечения всей клетки. Возможно обнаружение многоядерных гигантских клеток. При исследовании препаратов, приготовленных непосредственно из материала от пациентов, следует учитывать, что неспецифическая бактериальная микрофлора окрашивается в оранжевый цвет, клетки эпителия, лейкоциты, сперматозоиды окрашиваются в оранжевый и красно-бурый цвет. Допускается неспецифическое слабо-зеленое свечение цитоплазмы эпителиальных клеток, слизи и посторонней микрофлоры.

Результат считается положительным при наличии не менее 5 морфологически неизменных клеток с интенсивным ярко-зеленым специфическим свечением типичной локализации. Результат считается отрицательным, если в мазке отсутствует специфическое свечение при обязательном наличии не менее 50 клеточных элементов.

Оценку интенсивности иммунофлуоресцентной окраски проводят по 4-бальной условной шкале яркостей.

ТРЕБОВАНИЯ БЕЗОПАСНОСТИ

Применение набора включает этап фиксации мазков от пациентов с использованием летучих веществ (ацетона и др.). Работа на этом этапе должна проводиться в боксе с вентиляцией в соответствии с требованиями СанПиН «Требования безопасности при осуществлении работ с условно-патогенными микроорганизмами и патогенными биологическими агентами, к организации и проведению их учета, хранения, передачи и транспортировки». Набор содержит раствор Эванса голубого. Раствор токсичен, при работе избегать контакта, использовать соответствующие средства индивидуальной защиты.

Утилизация отходов после использования набора проводится в соответствии с требованиями Санитарных норм и правил «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

СРОК ГОДНОСТИ, УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ

Срок годности набора — 1 год с даты приемки ОБК изготовителя.

Хранение и транспортирование набора осуществляют при температуре от плюс 2 до плюс 8 С. Допускают транспортирование при более высокой температуре (до +20 С) не более 1 сут.

.