

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от _____ 200__ г. № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи
РАМН (филиал «Медгамал» НИИЭМ
им. Н.Ф. Гамалеи РАМН)

А.Л.Гинцбург

200__ г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Набора реагентов для проведения непрямой реакции флуоресценции для выявления специфических антигенов *Pneumocystis carinii* «ПневмоцистоФлюоАГдиагностика»

Пневмоцистоз – заболевание, вызываемое *Pneumocystis carinii*. Клинические проявления характеризуются тяжелыми интерстициальными пневмониями, нередко со смертельным исходом. Пневмоцистоз чаще поражает ослабленных детей, стариков и лиц молодого возраста со сниженным иммунитетом, ВИЧ-инфицированных, больных СПИДом, онкологических и гематологических больных. На распространение этой инфекции влияет экологическая обстановка, высокий радиационный фон и неполноценное питание с низким содержанием белка.

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов предназначен для выявления всех форм пневмоцист в материалах от больных бронхо-легочными заболеваниями с подозрением на пневмоцистоз.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Состав набора

- | | |
|--|----------|
| 1. Компонент №1. 18-ти луночные стекла с нанесенным на 5 и 6 лунки второго и третьего рядов антигеном <i>P. carinii</i> | 6 стекол |
| 2. Флакон № 2. Контрольная сыворотка, положительная (K^+) содержащая антитела к <i>P. carinii</i> , инактивированная, человеческая, лиофильно высушенная | 6 фл. |
| 3. Флакон № 3. Контрольная сыворотка, отрицательная (K^-), не содержащая антитела к <i>P. carinii</i> , инактивированная, человеческая, лиофильно высушенная | 1 фл. |
| 4. Флакон № 4. Иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие против иммуноглобулинов человека, сухие | 1 фл. |
| 5. Флакон № 5. Альбумин бычий, меченный родамином, сухой (БСА-R) | 1 фл. |
| 6. Инструкция по применению | 1 шт. |

2.2. Принцип метода

Набор для выявления антигена *P. carinii* основан на непрямом иммунофлуоресцентном методе с использованием целых, инактивированных формалином клеток *P. carinii*, высокоспецифических сывороток человека и иммуноглобулинов диагностических флуоресцирующих против иммуноглобулинов человека.

Анализ состоит из следующих этапов:

I. Исследуемые образцы биологического материала человека помещают в лунки 18-ти луночного предметного стекла. В 5-х и 6-х лунках второго и третьего рядов адсорбирован антиген *P. carinii* для контроля. Во все лунки вносят положительную сыворотку (K^+), кроме 5 и 6 лунок третьего ряда, в них вносят отрицательную сыворотку (K^-).



ИНЖЕНЕР ПО КАЧЕСТВУ

САЗОНОВ Ю.С.

II. Остатки непрореагировавших положительной и отрицательной сыворотки удаляют отмывкой, и в лунку наносят смесь иммуноглобулинов диагностических флюоресцирующих против иммуноглобулинов человека, и альбумина, меченного родамином, которые взаимодействуют с антителами.

III. Лунки отмывают, подсушивают и исследуют под люминисцентным микроскопом.

IV. В исследуемых материалах, содержащих антиген P.carinii, наблюдается желто-зеленое свечение.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Чувствительность набора, определенная на стандартной панели предприятия (СПП СПП, рег.№ 15.001-01) составляет 100 %.

3.2. Специфичность набора, определенная на стандартной панели предприятия (СПП СПП, рег.№ 15.001-01) составляет 100 %.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Потенциальный риск применения набора - класс 2Б (ГОСТ Р 51609-2000).

При работе с исследуемыми образцами биологических материалов и контрольными образцами положительной и отрицательной сыворотки следует соблюдать меры предосторожности, принятые при работе с потенциально инфекционным материалом:

- работать в резиновых перчатках;
- не пипетировать растворы ртом;
- все использованные материалы дезинфицировать в соответствии с требованиями СП 1.3.2322-08 и МУ-287-113.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

Для проведения НРИФ необходимы:

- холодильник бытовой,
- термостат, поддерживающий температуру 37 ± 1 °С,
- центрифуга со скоростью вращения ротора 3000-5000 об/мин,
- люминисцентный микроскоп,
- автоматические пипетки, позволяющие отбирать объёмы жидкости от 5 до 1000 мкл, с погрешностью измерения объемов не более 5%.
- одноразовые наконечники автоматическим пипеткам,
- физиологический раствор,
- ацетон.

6. СБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

1. Забор материала (лаважа, мокроты и др.) производится в стерильные флаконы, объемом 15 мл. Мокроту собирать несколько раз (3-4) в течение 12 ч, сохраняя флакон при температуре от 2 до 8°С.

2. Свежие образцы могут храниться при температуре от 2 до 8 °С в течение одних суток.

3. Допускается хранение материала при температуре минус 20 °С и ниже в течение 3-х месяцев.

4. В работе должны использоваться автоматические пипетки с погрешностью измерения объемов не более 5%.

7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ К РАБОТЕ

Перед проведением анализа компоненты набора выдержать при комнатной температуре не менее 30 мин. Стекла, хранившиеся при температуре минус 20°С, разморозить и просушить при комнатной температуре в течение 10 минут.



7.1. Приготовление раствора №1.

Содержимое флаконов №2 (K^+) растворить в 100 мкл физиологического раствора.
Хранение: 24 ч при температуре от 2 до 8 °С.

7.2. Приготовление раствора №2.

Содержимое флакона №3 (К⁻) растворить в 100 мкл физиологического раствора.
Хранение: 24 ч при температуре от 2 до 8 °С.

7.3. Приготовление раствора №3.

Содержимое флакона №4 (Иммуноглобулины диагностические флюоресцирующие против иммуноглобулинов человека) растворить в 0,2 мл физиологического раствора, получая исходное разведение.

Хранение: в течение 3-х недель при температуре от 2 до 8 °С.

7.4. Приготовление раствор № 4.

Содержимое флакона №5 (альбумин, меченный родамином) растворить в 0,2 мл физиологического раствора, получая исходное разведение.

Хранение: в течение 3-х недель при температуре от 2 до 8 °С.

7.5. Приготовление раствора люминесцентной сыворотки № 5.

Из исходных разведений иммуноглобулинов диагностических флюоресцирующих против иммуноглобулинов человека (Раствор 3) и альбумина, меченного родамином (Раствор 4) приготовить смесь рабочих разведений согласно указаниям на этикетках флаконов. Порядок приготовления раствора приведен ниже в таблице 1.

Таблица 1. Приготовления смеси растворов иммуноглобулинов диагностических флюоресцирующих против иммуноглобулинов человека и БСА-Р

Наименование компонента	Рабочее разведение препарата, указанное на флаконе	Количество препарата (мкл)	Количество физиологическо го раствора (мкл)
иммуноглобулины диагн. флюоресц. против иммуноглобулинов человека БСА-Р	1:8 1:16	20 10	130
иммуноглобулины диагн. флюоресц. против иммуноглобулинов человека БСА-Р	1:8 1:32	20 5	135
иммуноглобулины диагн. флюоресц. против иммуноглобулинов человека БСА-Р	1:8 1:64	20 2,5	137,5
иммуноглобулины диагн. флюоресц. против иммуноглобулинов человека БСА-Р	1:16 1:16	10 10	140
иммуноглобулины диагн. флюоресц. против иммуноглобулинов человека БСА-Р	1:16 1:32	10 5	145
иммуноглобулины диагн. флюоресц. против иммуноглобулинов человека БСА-Р	1:16 1:64	10 2,5	147,5
иммуноглобулины диагн. флюоресц. против иммуноглобулинов человека БСА-Р	1:32 1:16	5 10	145
иммуноглобулины диагн. флюоресц. против иммуноглобулинов человека БСА-Р	1:32 1:32	5 5	150
иммуноглобулины диагн. флюоресц. против иммуноглобулинов человека БСА-Р	1:32 1:64	5 2,5	152,5

^{*)}160 мкл смеси необходимо для обработки одного стекла



ИНЖЕНЕР ПО КАЧЕСТВУ
САЗОНОВ Ю. С.

Приготовленные растворы стабильны в течение 24 ч при температуре от 2 до 8 °С.

7.6. Подготовка влажной камеры

В чашку Петри положить круг фильтровальной бумаги, смоченной водопроводной водой.

8. ПРОВЕДЕНИЕ НЕПРЯМОЙ ИММУНОФЛЮОРЕСЦЕНТНОЙ РЕАКЦИИ (НРИФ)

8.1. Осадок биологического материала после центрифугирования наносится в пустые лунки (одну или две) по 5 мкл.

8.2. Препарат фиксировать холодным ацетоном в течение 30 мин (после высыхания образца).

8.3. Во все лунки с исследуемым материалом, а также в две средние лунки 5-го и 6-го ряда с положительным контролем антигена (с адсорбированными пневмоцистами) внести по 5 мкл раствора № 1, содержащего положительную сыворотку (K^+).

8.4. В последние лунки 5-го и 6-го рядов с положительным контролем антигена (с адсорбированными пневмоцистами) внести по 5 мкл раствора № 2, содержащего отрицательную сыворотку (K^-).

8.5. Инкубировать стекла 30 мин при 37 °С во влажной камере.

8.6. Отмыть стекла 1 раз водопроводной водой в течение 2 мин и 2 раза физиологическим раствором в течение 5 мин, поместив их в емкость с растворами; высушить стекла на воздухе при комнатной температуре в течение 10 мин.

8.7. Внести в каждую лунку по 5 мкл раствора № 5, содержащего смесь иммуноглобулинов диагностических флюоресцирующих против иммуноглобулинов человека и альбумина, меченого родамином.

8.8. Инкубировать стекла 30 мин при 37 °С во влажной камере.

8.9. Отмыть два раза по 5 мин физиологическим раствором (рН 7,2-7,4), поместив стекла в емкость с раствором и один раз дистиллированной водой; высушить на воздухе при комнатной температуре в течение 10 мин.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

9.1. Результат реакции непрямо́й иммунофлюоресценции учитывается с помощью люминесцентного микроскопа (объектив х40, окуляр х6,3), используя водную иммерсию. Порядок расположения фильтров в микроскопе (от лампы): БС 8-3, СЗС-24-4, ФС 1-1 и запирающий свет ЖС-18+19 №1.

9.2. В положительных контрольных образцах (K^+) должна наблюдаться яркая флюоресценция желто-зелёного цвета на 3-4 креста в клетках овальной или круглой формы величиной от 2 μ (трофозоиты) до 5-10 μ (прецисты и цисты). В контроле с отрицательными контрольными образцами (K^-) свечение должно отсутствовать или быть не более чем на один крест.

10. ФОРМА ВЫПУСКА

Набор реагентов «ПневмоцистоФлюоАГдиагностика» выпускается в виде упакованного в картонную пачку набора. Стекла упакованы в полиэтиленовый пакет с замком. Один набор рассчитан на проведение 84 анализов.



ИНЖЕНЕР ПО КАЧЕСТВУ

САЗОНОВ Ю.С.

4

11. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВКИ И ХРАНЕНИЯ

Допускается транспортирование всеми видами транспорта при температуре до 25°C не более 3 суток. Не допускать замораживания.

Хранить при температуре от 2 до 8°C.

Стекла с нанесенным на них антигеном хранить отдельно при температуре минус 20°C.

Срок годности 1 год.

Рекламации на качество Набора реагентов просьба направлять в НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи РАМН (филиал "Медгамал" НИИЭМ им. Н.Ф.Гамалеи РАМН).
Адрес: Россия, 123098, Москва, ул. Гамалеи, 18. Тел. (499)193-30-50, (499)190-43-89, факс: (499)190-66-71

Заместитель директора филиала «Медгамал»
НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи РАМН



Филиппова Н.Е.

200__ г.

«СОГЛАСОВАНО»

зав. кафедрой клинической
лабораторной диагностики ГОУ ДПО
«РМАПО Росздрава»



д.м.н., профессор Долгов В.В.

«__» 200__ г.

Подпись В.В. Долгова

удостоверяю: специалист по
кадровой работе ГОУ ДПО
РМАПО Росздрава

подпись И.И. Ушаков



ИНЖЕНЕР ПО КАЧЕСТВУ

САЗОНОВ Ю.С. 5