

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от _____ 200__ г. № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Государственного учреждения

НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи РАМН

(филиал «Медгамал» ГУ НИИЭМ

им. Н.Ф. Гамалеи РАМН)



А.Л.Гинцбург

200__ г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ
Набор реагентов для иммуноферментного выявления
иммуноглобулинов класса М и G к *Pneumocystis carinii*
«ПневмоцистоСтрип»

Пневмоцистоз — заболевание, вызываемое *P.carinii*. Клинические проявления характеризуются тяжелыми интерстициальными пневмониями, нередко со смертельным исходом. Пневмоцистоз чаще поражает ослабленных детей, стариков и лиц молодого возраста со сниженным иммунным статусом. На распространение этой инфекции влияет экологическая обстановка в регионе, высокий радиационный фон и неполноценное питание с низким содержанием белка.

1. НАЗНАЧЕНИЕ НАБОРА

Набор реагентов предназначен для выявления антител к антигену *P.carinii* в сыворотках крови больных людей с подозрением на пневмоцистоз и у здоровых при проведении эпидемиологических исследований.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

Набор для выявления антител классов IgM и IgG к антигену *P.carinii* основан на непрямом иммуноферментном анализе на твердой фазе с использованием пероксидазы хрена в качестве маркерного фермента.

Анализ состоит из следующих этапов:

- I. Исследуемую сыворотку крови человека добавить в лунку планшета с адсорбированными на ее поверхности антигенами *P.carinii*. Если в сыворотке содержатся IgM или IgG антитела, они соединяются с этими антигенами.
- II. Сыворотку удалить отмывкой и в лунку добавить конъюгаты моноклональных антител против IgM или IgG человека, меченные пероксидазой, которые взаимодействуют с иммобилизованными в лунках IgM или IgG антителами к антигену *P.carinii*.
- III. Лунки промыть и добавить хромоген (ТМБ). В результате взаимодействия ТМБ с пероксидазой, соединенной с антителами и фиксированной на стенках лунок, раствор приобретает голубую окраску. Интенсивность окрашивания прямо пропорциональна содержанию антител к антигену *P.carinii* в сыворотке. После остановки реакции кислотой голубая окраска меняется на желтую.



ИНЖЕНЕР ПО КАЧЕСТВУ

Сазонов Ю.С.

2.2. СОСТАВ НАБОРА

1. Планшет полистироловый с адсорбированным антигеном <i>P.carinii</i> (разборный, 12 x 8)	2 шт.
2. Моноклональные антитела к IgM человека, меченные пероксидазой хрена (концентрат конъюгата антител к IgM) – 0,1 мл	1 фл.
3. Моноклональные антитела к IgG человека, меченные пероксидазой хрена (концентрат конъюгата антител к IgG) – 0,1 мл	1 фл.
4. Контрольная сыворотка человека, положительная, содержащая антитела класса IgM к <i>P.carinii</i> , лиофилизированная. Положительный контроль (K1+) – 0,16 мл	4 фл.
5. Контрольная сыворотка человека, положительная, содержащая антитела класса IgG к <i>P.carinii</i> , лиофилизированная. Положительный контроль (K2+) – 0,16 мл	4 фл.
6. Контрольная сыворотка человека, отрицательная, лиофилизированная. Отрицательный контроль (K-) - 0,320 мл	2 фл.
7. Фосфатно-солевой буфер с Твином 20 (ФСБ-Т), концентрат – 12,5 мл	2 фл.
8. Раствор для разведения хромогена – 10 мл	2 фл.
9. Хромоген (ТМБ) – 1,4 мл	1 пр.
10. Бычий сывороточный альбумин (БСА) - 100 мг	2 фл.
11. Стоп-реагент (2М серная кислота)	1 фл.
12. Инструкция по применению	1 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Результат качественного определения набором иммуноглобулинов класса М и G к *Pneumocystis carinii* должен соответствовать требованиям СПП (рег. № 15.001-01), включающей образцы сывороток, содержащие специфические IgM и IgG к *Pneumocystis carinii*: чувствительность по иммуноглобулинам класса М и G к *Pneumocystis carinii* - 100%.

3.2. Результат качественного определения набором иммуноглобулинов класса М и G к *Pneumocystis carinii* должен соответствовать требованиям СПП (рег. № 15.001-01), включающей образцы сывороток, не содержащие специфические IgM и IgG к *Pneumocystis carinii*: специфичность по иммуноглобулинам класса М и G к *Pneumocystis carinii* - 100%.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

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

При работе с исследуемыми сыворотками и контрольными образцами 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 иммуноферментного анализа необходимо наличие холодильника, термостата, центрифуги 10 000 об/мин., автоматических пипеток с погрешностью



Сазонов Ю.С.

измерения объемов не более 5%, одноразовые наконечники для пипеток, кюветы и спектрофотометр (Мультискан) с фильтром для измерения длины волны 450 нм.

6. СБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

- Забор крови производится согласно общепринятой процедуре из вены с соответствующими предосторожностями.
- Свежие образцы могут храниться при +2-8°C в течение одной недели. Образцы могут быть заморожены и оттаяны только один раз, так как повторение этой процедуры может привести к искажению результатов. После размораживания сыворотку следует тщательно размешать. Длительное хранение сывороток должно быть в замороженном виде при -20 °C или ниже.
- Образцы, содержащие осадок, перед анализом должны быть осветлены центрифугированием при 5-10 тыс.об/мин.
- Не использовать образцы с гемолизом, гиперлипидемией.
- В работе должны использоваться автоматические пипетки с погрешностью измерения объемов не более 5%.

7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ К РАБОТЕ

Раствор 1

Содержимое флакона 7 растворить в 250 мл дистиллированной воды и тщательно перемешать.

Раствор 1 применяется:

- а) для промывки лунок планшетов,
- б) для разведения исследуемых сывороток.

Хранение: до 1 недели при 2+6°C.

Раствор 2.

В одном флаконе 8, содержащем 10 мл раствора для разведения хромогена, растворить 0,7 мл ТМБ из флакона 9.

Раствор 2 готовится непосредственно перед использованием.

При приготовлении раствора ТМБ следует исключить воздействие света (использовать флакон из темного стекла).

Раствор 3.

Содержимое флаконов 10 в 20 мл раствора 1. Растворы используются для разведения конъюгатов.

8. ПРОВЕДЕНИЕ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

1. Положительную контрольную сыворотку развести в 160 мкл раствора 1, а отрицательную - в 320 мкл, внести по 50 мкл: в лунки А1-А3 положительную сыворотку, в лунки В1-В3 – отрицательную.
2. Анализируемую сыворотку для определения титра антител класса IgG развести в соотношении 1/100, 1/1000 и 1/10000 раствором 1, для определения антител класса IgM – в соотношении 1/200, 1/2000 и 1/20000 и внести по 50 мкл каждого разведения в лунки с антигеном P.carinii.
3. Планшет закрыть крышкой и инкубировать 18 часов при комнатной температуре или 2 часа при 37°C.
4. Лунки отмыть раствором 1, заполняя их полностью и выдерживая с раствором 1 не менее 2-3 мин. (4 раза).
5. 100 мкл концентрата конъюгата антител к IgM (флакон №2) внести



ИНЖЕНЕР ПО КАЧЕСТВУ

САЗОНОВ Ю.С.

во флакон №10 и 100 мкл концентрата конъюгата антител к IgG (флакон №3) внести во флакон № 10, после чего, полученные растворы внести по 50 мкл на лунку. Инкубировать 2 часа при 37°C. Отмыть, как указано в п.4.

6. Добавить по 50 мкл раствора 2, планшет закрыть крышкой и инкубировать в темноте при комнатной температуре в течение 10-30 мин. Внимательно следить за развитием окраски.
7. Реакцию остановить добавлением 50 мкл стоп – реагента и определить степень окрашивания.

*Таблицу расхода компонентов тест-системы см на стр. 6.

9.УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты иммуноферментного анализа регистрировать с помощью ридера, измеряя оптическую плотность (ОП) при длине волны 450 нм. Результат учитывать при:

$$\frac{ОП_{к1+}}{ОП_{к-}} \geq 2,1 \quad \text{и} \quad \frac{ОП_{к2+}}{ОП_{к-}} \geq 2,1, \text{ где}$$

ОП_{к1+} и ОП_{к2+} - среднее значение оптической плотности положительного контроля.

ОП_{к-} – среднее значение оптической плотности отрицательного контроля.

Сыворотка считается положительной когда ОП_с ≥ ОП_{крит}.

ОП - критическое = 0,5 (ОП_{к+} + ОП_{к-})

Для более точной оценки результатов титрования исследуемых сывороток предлагается следующий метод.

Исходя из величин экстинции конечных растворов в лунках с разведениями сывороток 1:200, 1:2000 и 1:20 000, вычисляется процент связывания антигена, адсорбированного на планшете с антителами исследуемых сывороток.

Так, например, при исследовании разведений сыворотки 1:200 и 1:2000 расчет титра антител может проводиться по следующим формулам:

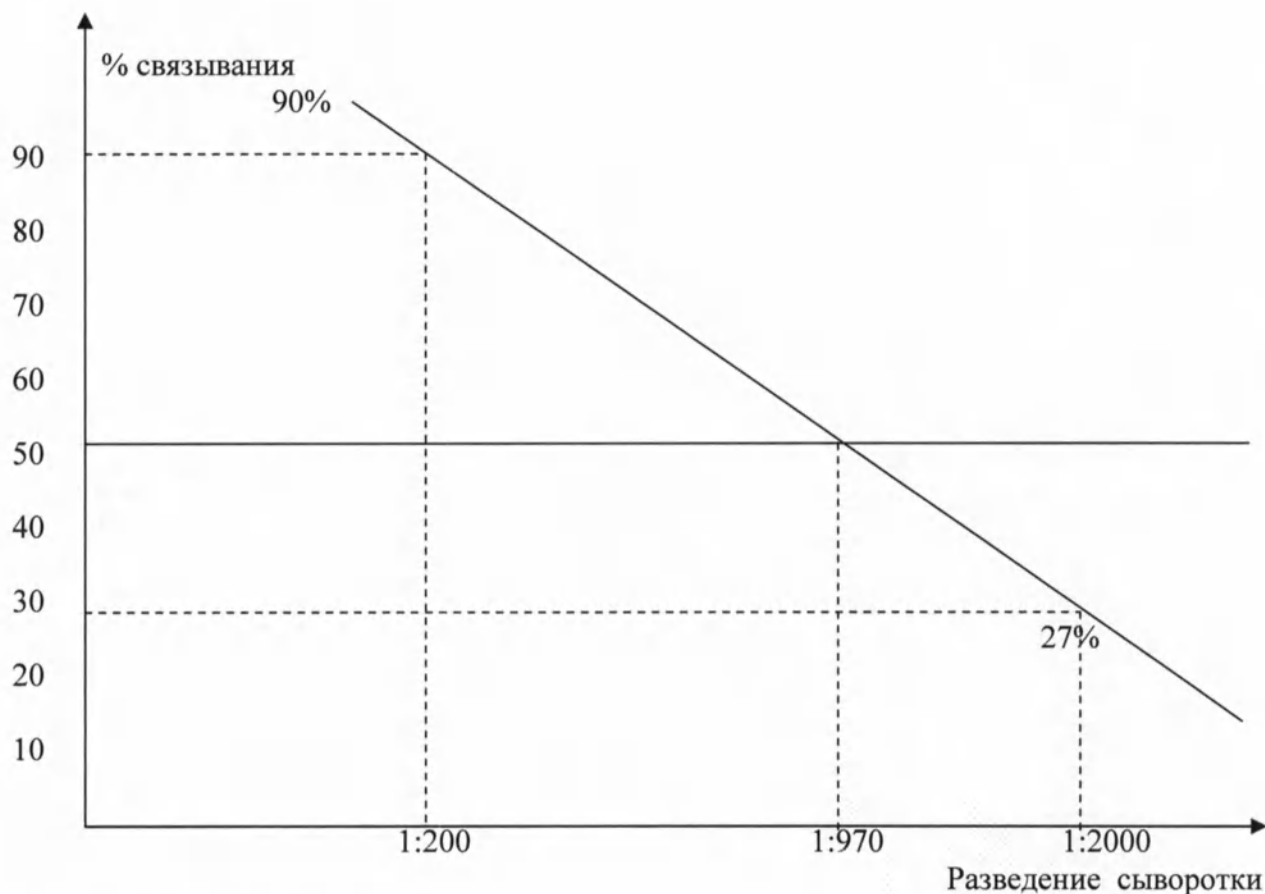
$$S_{200} = \frac{ОП_{с200} - ОП_{к-}}{ОП_{к+} - ОП_{к-}} \times 100\%$$

$$S_{2000} = \frac{ОП_{с2000} - ОП_{к-}}{ОП_{к+} - ОП_{к-}} \times 100\%$$

S₂₀₀; S₂₀₀₀ – процент связывания антигена, адсорбированного на планшете с антителами, содержащимися в исследуемой сыворотке в соответствующем разведении;

Титром антител к P.carinii считают такое разведение сыворотки, в котором она обеспечивает 50% связывание с антигеном. Величину такого разведения высчитывают методом графической интерполяции в полулогарифмической системе координат, где по оси абсцисс (в логарифмическом масштабе) отложены величины разведения исследуемой сыворотки от 1:200 до 1:2000, а по оси ординат (в линейном масштабе) – процент связывания антигена с антителами. В этой системе наносят точки, соответствующие процентам связывания для каждого из разведений (например 1:200 и 1:2000), а затем,

соединяя эти точки прямой, находят точку пересечения этой прямой с горизонтальной, проходящей через 50% на оси ординат.



Пример: $S_{200}=90\%$, $S_{2000}=27\%$

Титр исследуемой сыворотки = 1:970

9.ФОРМА ВЫПУСКА

Набор реагентов «ПневмоцистоСтрип» выпускается упакованным в картонную коробку. Один набор рассчитан на проведение анализов: 30 сывороток на IgM антитела и 30 сывороток на IgG антитела.

10.УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВКИ

Хранить при температуре 2-8 °С. Допускается транспортирование всеми видами транспорта при температуре не выше 10 °С в условиях, исключающих замораживание. Срок годности: 1 год.

Рекламации на качество Набора реагентов просьба направлять в Государственное учреждение ГУ НИИЭМ им. Н.Ф.Гамалеи РАМН (филиал "Медгамал" ГУ НИИЭМ им. Н.Ф.Гамалеи РАМН).

Адрес: 123098, Москва, ул. Гамалеи, 18.

Тел., факс: (499) 193-30-50, (499) 190-43-89,



ИНЖЕНЕР ПО КАЧЕСТВУ

САЗОНОВ Ю.С.

* Таблица расхода компонентов тест-систем

Количество одновременно, используемых стрипов	Конъюгат (мкл)	Раствор для разведения конъюгата (мл)	ТМБ (мкл)	ЦФР (мл)
3	20	2	140	2
6	40	4	280	4
9	60	6	420	6
12	80	8	560	8

Заместитель директора филиала «Медгамал»
ГУ 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.



ИНЖЕНЕР ПО КАЧЕСТВУ

Еазонов Ю.С.