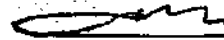


«УТВЕРЖДАЮ»

Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере здравоохранения
и социального развития

 Р.У. Хабриев

«12» апреля 2005 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению Набора реагентов для определения общего, рода и видового
эндотоксина бактерий *Pseudomonas* в сыворотке крови

методом активированных частиц

(МАЧ – *Pseudomonas* общий, рода и видов)

Рекомендована к утверждению экспертной комиссией по наборам реагентов для
иммуноферментного (неинфекционные), радиоиммунологического и других видов
иммунохимического анализа Комитета по новой медицинской технике

Министерства здравоохранения и социального развития РФ

(протокол № 3 от 24 марта 2004 г.)

1. НАЗНАЧЕНИЕ.

Набор реагентов МАЧ– *Pseudomonas* общий, рода и видов (МАЧ–*Pseudo. spp.*,
рода и видов) предназначен для определения эндотоксина, представляющего
собой липополисахарид (ЛПС) бактерий *Pseudomonas* в сыворотке крови человека
методом активированных частиц (МАЧ).

Набор рассчитан на проведение 100 и 300 определений (с учетом
положительного и отрицательного контролей) при расходе 0,02 мл каждого
диагностикума на один анализ.

2. ПРИНЦИП МЕТОДА.

Основой постановки реакции являются полимерные химические микросферы,
прочные связанные с моноклональными мышными антителами к эндотоксину
бактерий *Pseudomonas*. В результате взаимодействия этих микросфер с

Инструкция составлена: академиком РАМН Л.А. Бокерия – директором НЦ ССХ
им. А.Н. Бакулева РАМН, и кандидатом биологических наук А.А. Ниязматывым –
директором Научно-производственной фирмы «Рохат».



сывороткой крови человека, содержащей эндотоксин, образуется комплекс антиген - антитело, вызывающий активирование (склеивание) микросфер. Реакция оценивается визуально по степени активирования частиц - микросфер.

3. СОСТАВ НАБОРА.

В состав набора входят:

- диагностикумы - синтетические полимерные химические микросферы с иммобилизованными на их поверхности моноклональными мышными антителами к общему, роду и видам *Pseudomonas* (МАЧ – *Pseudo. spp*, рода и видов):

- МАЧ – *Pseudomonas spp*, готов к использованию – 1 флакон (1,0 или 2,0 мл);
- МАЧ – *Pseudomonas aeruginosa*, готов к использованию – 1 флакон (1,0 или 2,0 мл);
- МАЧ – *Pseudomonas ceracia*, готов к использованию – 1 флакон (1,0 или 2,0 мл);
- МАЧ – *Pseudomonas fluorescences*, готов к использованию – 1 флакон (1,0 или 2,0 мл);
- МАЧ – *Pseudomonas maltophilia*, готов к использованию – 1 флакон (1,0 или 2,0 мл);
- МАЧ – *Pseudomonas stutzeri*, готов к использованию – 1 флакон (1,0 или 2,0 мл);
- 10% фосфатный буферный раствор, состоящий из двузамещенного фосфата натрия и гидроксида натрия, pH 7,0 – 1 флакон (10 мл);
- положительный контроль (инактивированная культура смеси бактерий *Pseudomonas*, или ЛПС *Escherichia coli*, или *Salmonella typhimurium*, или *Shigella sonnei*), готов к использованию – 1 флакон (2,0 мл);
- отрицательный контроль (0,9% раствор NaCl), готов к использованию – 1 флакон (2,0 мл);
- планшеты картонные 6-луночные одноразовые – 17 или 60 штук.

4. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ.

Свежая негемолизированная сыворотка крови человека. Полученную сыворотку крови следует использовать для анализа не позднее 2 часов после взятия крови. Возможно длительное хранение (до 3 месяцев) образцов при температуре минус 20°C и ниже; допускается только двукратное замораживание и размораживание образцов сыворотки крови.



5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.

5.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2а.

5.2. Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

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

5.4. При работе с набором необходимо надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

6. ОБОРУДОВАНИЕ И РЕАГЕНТЫ:

- Термостат, обеспечивающий поддержание температуры $+37\pm 1^{\circ}\text{C}$;
- пипетки полуавтоматические одноканальные со сменяемыми наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости 0,02 и 0,1 мл;
- колба мерная вместимостью 100 мл;
- вода дистиллированная;
- перчатки резиновые или пластиковые.

7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ И ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА.

7.1. В мерную колбу вместимостью 100 мл перенести количественно содержимое флакона с 10% фосфатным буферным раствором, добавить дистиллированную воду до метки и перемешать.

Полученный 1% фосфатный буферный раствор можно хранить при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ не более 1 года.

7.2. Перед проведением анализа компоненты набора и исследуемые образцы сыворотки крови следует выдержать при температуре $+37^{\circ}\text{C}$ в течение времени не менее 30 минут.

7.3. Подготовить 6 планшетов. Внести во все лунки соответствующего 6-луночного планшета по 0,1 мл 1% фосфатного буферного раствора. В 1-ую лунку каждого планшета добавить 0,1 мл исследуемого образца сыворотки крови и последовательно титровать с двукратным шагом, перенося в последующую лунку по 0,1 мл жидкости, до 6-ой лунки. 0,1 мл жидкости из 6-ой лунки удалить. Полученное разведение в 6-ой лунке составляет 1:64.

7.4. В каждую лунку соответствующего планшета добавить по 0,02 мл диагностикума:

- МАЧ - *Pseudomonas* spp (1-й планшет);
- МАЧ - *Pseudomonas aeruginosa* (2-й планшет);
- МАЧ - *Pseudomonas cepacia* (3-й планшет);
- МАЧ - *Pseudomonas fluorescences* (4-й планшет);
- МАЧ - *Pseudomonas maltophilia* (5-й планшет);
- МАЧ - *Pseudomonas stutzeri* (6-й планшет);

и плавно покачивать каждый планшет при комнатной температуре (+18-25°C) в течение 2 минут до полного перемешивания реагентов.

7.5. Инкубировать планшеты в термостате при температуре +37°C в течение 10 минут; в процессе инкубации следует 3 раза производить перемешивание реагентов осторожным покачиванием планшета.

7.6. Извлечь планшеты из термостата и визуально оценить результат реакции.

7.7. Внести лунку с маркировкой (K+) 0,1 мл положительного контроля, а в лунку с маркировкой (K-) 0,1 мл отрицательного контроля. Далее провести процедуры, указанные в п.п. 7.4. - 7.6.

8. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.

Учет результатов реакции произвести по степени активирования в 3-ей лунке (разведение 1:8) следующим образом.

1. 4-я степень активирования частиц (4 СА) - крупные хлопья на прозрачном фоне (резко положительный результат);
2. 3-я степень активирования частиц (3 СА) - хлопья или крупные зерна на слегка мутном фоне (положительный результат);
3. 2-я степень активирования частиц (2 СА) - много зерн на мутном фоне (слабо положительный результат);



4. 1-я степени активирования частиц (1 СА) – мутный фон или едва заметные зерна (отрицательный результат).

Результаты, полученные с положительным контролем, должны соответствовать 4 СА, 3 СА, или 2 СА; результаты полученные с отрицательным контролем, должны соответствовать 1 СА.

9. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА.

9.1. Набор реагентов МАЧ - *Pseudomonas* общих, рода и видов должен храниться в упаковке предприятия - изготовителя при температуре +2-8°C в течение всего срока годности (12 мес). Допускается хранение набора при температуре до +20°C не более 3 суток. Замораживание компонентов набора не допускается.

9.2. Компоненты набора после вскрытия флаконов можно хранить при температуре +2-8°C в течение всего срока годности набора при условии достаточной герметичности флаконов.

9.3. Приготовленный 1% фосфатный буферный раствор можно хранить при температуре +2-8°C не более 1 года.

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

По вопросам, касающимся качества набора МАЧ – *Pseudomonas* общий, рода и видов, следует обращаться в НЦ ССХ им. А.Н. Бакулева РАМН по адресу:

121552 г. Москва, Рублевское шоссе, д. 135, тел. (095) 414-76-96, факс 414-78-45.

и в Институт государственного контроля лекарственных средств ФГУ «НЦЭСМП»
Минздрава РФ по адресу:

117246, Москва, Научный проезд, 14 А, тел. (095) 120-60-95, 120-60-96.

Kodak Super-8

ПОЯСНИТЕЛЬНАЯ ЗАПИСКА

к техническим условиям на Набор реагентов для
определения общего, рода и видов эндотоксина
бактерий *Pseudomonas* методом активированных частиц
в сыворотке крови

(МАЧ-*Pseudo.spp*, рода и видов)

Технические условия на Набор реагентов для определения общего, рода
и видового эндотоксина бактерий *Pseudomonas* методом активированных
частиц в сыворотке крови (МАЧ-*Pseudo.spp*, рода и видов) разработаны НЦ
ССХ им. А.Н. Бакулева РАМН и НПФ "Рохат", впервые.

Основной задачей разработки технических условий является устано-
вление норм, требований и методов контроля, обеспечивающих оптимальный
уровень качества стандартизируемого образца.

Введение в действие технических условий позволит установить
качественную и полуколичественную оценку набора МАЧ-*Pseudo.spp*, рода и
видов.

Набор МАЧ-*Pseudo.spp*, рода и видов предназначен для определения
эндотоксина (ЛПС) бактерий *Pseudomonas* в сыворотке крови доноров и
больных людей методом активированных частиц (МАЧ).

Один набор рассчитан на проведение анализа 100 и 300 образцов с
учетом положительного и отрицательного контролей.

Область применения - клиническая медицина.

В состав набора входят следующие компоненты:

- диагностикум;
- фосфатный буферный раствор;
- положительный контроль;
- отрицательный контроль;
- планшеты 6-луночные картонные.

Принцип метода. Основой постановки реакции по методу активированных частиц (МАЧ) являются полимерные химические микросферы, прочно связанные с моноклокальными антителами. В результате взаимодействия этих микросфер с эндотоксин-содержащей сывороткой крови образуется комплекс антитело-антиген, вызывающий активирование (склеивание) микросфер. Реакция оценивается визуально по степени активирования частиц - агглютинации микросфер.

Для стандартизации набора считаем обязательным проверить следующие показатели:

- внешний вид компонентов;
- образование активирования частиц с диагностикумом-положительный контроль
- отсутствие активирования частиц с диагностикумом-отрицательный контроль.

Технические условия по построению, изложению и оформлению соответствуют требованиям ГОСТ 2.114-95.

Директор
научно-производственной фирмы
"Рохат"
канд. биол. наук

 А. А. НИЯЗМатов
Испол. Вектор - 2 сф