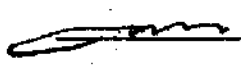


«УТВЕРЖДАЮ»

Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере здравоохранения
и социального развития

 Р.У. Хабриев
« 16 »  2005 г.

ИНСТРУКЦИЯ

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

методом активированных частиц

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

Набор рассчитан на проведение 100 и 150 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,

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



прочно связанные с моноклональными мышинными антителами к эндотоксину бактерий *Klebsiella*. В результате взаимодействия этих микросфер с 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 мышинными антителами к общему, роду и видам *Klebsiella* (МАЧ – *Kleb.* общий, рода и видов);
- МАЧ – *Klebsiella* spp, готов к использованию – 1 флакон (1,0 или 2,0 мл);
- МАЧ – *Klebsiella oxytoca*, готов к использованию – 1 флакон (1,0 или 2,0 мл);
- МАЧ – *Klebsiella pneumoniae*, 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 *Klebsiella*, 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 30 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.



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°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 – *Klebsiella* spp (1-й планшет);
- МАЧ – *Klebsiella oxytoca* (2-й планшет);
- МАЧ – *Klebsiella pneumoniae* (3-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 (К+) 0,1 мл положительного контроля, а в лунку с маркировкой (К-) 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.

Аннотация

9. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА.

9.1. Набор реагентов МАЧ - *Klebsiella* общий, рода и видов должен храниться в упаковке предприятия - изготовителя при температуре 2-8°C в течение всего срока годности (12 месяцев). 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 – *Klebsiella* 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.

Начальник
5.09.2011
И.А. Наумов

