



УТВЕРЖДАЮ
Директор ФКУЗ Ставропольский
противочумный институт
Роспотребнадзора
А.Н. Куличенко
«03.» 20/8 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ФЛУОРЕСЦИРУЮЩИХ БРУЦЕЛЛЕЗНЫХ СУХИХ («РИФ-Бру-СтавНИПЧИ»)

1 НАЗНАЧЕНИЕ

Иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие бруцеллезные сухие предназначены для идентификации и качественного определения возбудителей бруцеллеза (*Brucella melitensis*, *Brucella abortus*, *Brucella suis*) в реакции иммунофлуоресценции при исследовании биологического материала человека.

Область применения – клиническая лабораторная диагностика, диагностика инфекционных заболеваний, эпидемиологический надзор. Потенциальные потребители препарата – специализированные лаборатории лечебно-профилактических и санитарно-эпидемиологических учреждений.

Показания – подозрение на инфицирование возбудителями бруцеллеза (*Brucella melitensis*, *Brucella abortus*, *Brucella suis*)

Противопоказаний к использованию препарата – нет.

Бруцеллез – острое инфекционно-аллергическое, зоонозное заболевание с высокой потенциальной возможностью перехода в хроническую форму. Возбудитель заболевания – микроорганизмы рода *Brucella*, относящиеся ко II группе патогенности. Естественным резервуаром бруцелл в природе являются животные. Основными источниками возбудителя инфекции для людей при бруцеллезе являются овцы, козы (*Brucella melitensis*), крупный рогатый скот (*Brucella abortus*) и свиньи (*Brucella suis*).

Пути и факторы передачи инфекции разнообразны, человек в любом возрасте высоко восприимчив к бруцеллезу, заболевание длительное, трудно поддающееся лечению, поражает практически все органы и системы организма и, как правило, сопровождается хронизацией инфекционного процесса с нередкой последующей инвалидностью больного.

Передача возбудителя бруцеллеза и заражение людей происходит контактным, алиментарным и реже – аэрогенным путем, возможны сочетанные пути передачи. Роль человека в передаче бруцеллезной инфекции эпидемиологического значения не имеет.

Применение реакции иммунофлуоресценции для диагностики бруцеллеза и для детекции возбудителя регламентировано методическими указаниями (МУК 3.1.7.3402 – 16) «Эпидемиологический надзор и лабораторная диагностика бруцеллеза».

2 ХАРАКТЕРИСТИКИ ПРЕПАРАТА

2.1 Компонентный состав

Препарат «РИФ-Бру-СтавНИПЧИ» представляет собой специфические иммуноглобулины флуоресцирующие бруцеллезные сухие, выделенные из поливалентной сыворотки кроликов, иммунизированных комплексным антигеном трех видов бруцелл (*B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*) и конъюгированные с флуоресцеин-5-изотиоцианатом (ФИТЦ).

Массовая доля активного вещества (иммуноглобулины бруцеллезные конъюгированные с ФИТЦ) в препарате «РИФ-Бру-СтавНИПЧИ» составляет $(1,2 \pm 0,5) \%$.

Препарат гигроскопичен и светочувствителен.

2.2 Комплектность

В потребительскую упаковку медицинского изделия «РИФ-Бру-СтавНИПЧИ» входят 5 ампул с препаратом по 0,5 мл, инструкция по применению и скарификатор ампульный дисковый керамический СДАК-19-01 «Кулон».

Скарификатор ампульный дисковый керамический СДАК-19-01 «Кулон» (ТУ 9398-001-07610517-2004) – диаметр $(19 \pm 1,0)$ мм, толщина – $(0,5 \pm 0,1)$ мм, масса – не более 0,6 г; обеспечивает надрез не менее 45 стеклянных ампул; сохраняет свои функциональные свойства после дезинфекции; в процессе эксплуатации материал скарификатора не выделяет токсических веществ.

2.3 Количество анализируемых проб

Каждая ампула препарата рассчитана на проведение не менее 80 определений и зависит от рабочего разведения препарата. Потребительская упаковка с медицинским изделием «РИФ-Бру-СтавНИПЧИ» рассчитана на 400 определений (не менее), включая контрольные образцы.

2.4 Принцип действия

Реакция иммунофлуоресценции лежит в основе метода флуоресцирующих антител. Метод позволяет анализировать биологические образцы (материал от больных людей) на присутствие бактериальных специфических антигенных детерминант, характерных для возбудителей бруцеллеза при помощи флуоресцирующих иммуноглобулинов, визуализируя образовавшийся комплекс «антиген-антитело».

3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПРЕПАРАТА

3.1 Рабочее разведение

Не менее 1:8.

3.2 Специфическая активность

Препарат в рабочем разведении должен обеспечивать специфическое зеленовато-желтое свечение интенсивностью на 3-4 креста штаммов возбудителя бруцеллеза СО 009-9388-2016*.

3.3 Специфичность

Препарат в рабочем разведении не должен вызывать специфическую флуоресценцию штаммов гетерологичных микроорганизмов СО 009-9388-2016.

3.4 Диагностическая чувствительность и диагностическая специфичность

Диагностические характеристики набора установлены в клинико-лабораторных испытаниях с применением 12 штаммов *Brucella spp.* и 5 штаммов гетерологичных микроорганизмов из «Государственной коллекции патогенных бактерий» ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора на модельных образцах материала: 135 проб бактериальных суспензий *Brucella spp.* (*Brucella melitensis*, *Brucella abortus*, *Brucella suis*) в концентрации 1×10^8 м.к./мл, 90 проб биологического материала от людей, искусственно контаминированных *Brucella spp.* (*Brucella melitensis*, *Brucella abortus*, *Brucella suis*) в концентрации 1×10^8 м.к./мл; 240 проб, искусственно контаминированных другими видами бруцелл (*Brucella canis*, *Brucella ovis*, *Brucella neotomae*) и гетерологичными микроорганизмами (*Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*, *F. tularensis*, *E. coli*).

Определение *Brucella spp.* с помощью МИ Иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие бруцеллезные сухие («РИФ-Бру-СтавНИПЧИ») по ТУ 9389-47-01897080-2016 подтверждено с использованием образца сравнения

* В стандартный образец ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора «Набор штаммов для контроля качества МИБП для диагностики бруцеллеза» СО 009-9388-2016 входят штаммы следующих микроорганизмов: *Brucella abortus* 19 ВА; *Brucella suis* 61; *Brucella melitensis* Rev-1; *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ; *Yersinia enterocolitica* 383; *Salmonella typhimurium* 9640; *Escherichia coli* 113-3. Штаммы обладают типичными морфологическими, культуральными, биохимическими и серологическими свойствами.

«Набор штаммов для контроля качества МИБП для диагностики бруцеллеза» СО 009-9388-2016 находится на хранении в лаборатории «Коллекция патогенных микроорганизмов» ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора.

«Иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие бруцеллезные сухие» (№ ФСР 2010/08925).

Диагностическая чувствительность – не менее 98,0 % с доверительной вероятностью 95 % при анализе 225 положительных проб (135 проб бактериальных суспензий микроорганизмов, 90 проб искусственно контаминированного биологического материала от людей), содержащих *Brucella spp.* (*Brucella melitensis*, *Brucella abortus*, *Brucella suis*) получен положительный результат – в 223 случаях.

Диагностическая специфичность – не менее 87 % с доверительной вероятностью 95 %; при исследовании 240 отрицательных проб (120 проб бактериальных суспензий микроорганизмов, 120 проб искусственно контаминированного биологического материала от людей), содержащих другие виды бруцелл (*Brucella canis*, *Brucella ovis*, *Brucella neotomae*) и гетерологичные микроорганизмы (*Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Francisella tularensis*, *Escherichia coli*) получен отрицательный ответ в 215 случаях.

При проведении исследования чистых культур бруцелл и биологического материала от человека МИ Иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие бруцеллезные сухие («РИФ-Бру-СтавНИПЧИ») по ТУ 9389-47-01897080-2016 может окрашивать клетки бруцелл другого вида *Brucella neotomae*. В случае получения положительного с помощью МИ Иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие бруцеллезные сухие («РИФ-Бру-СтавНИПЧИ») по ТУ 9389-47-01897080-2016 необходимо подтверждение видовой принадлежности выявленных бруцелл с использованием бактериологического и/или молекулярно-генетического методов.

4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С ПРЕПАРАТОМ

4.1 Информация об инфекционных или микробных рисках

Препарат может быть использован в учреждениях, имеющих Лицензию на деятельность в области использования возбудителей инфекционных заболеваний человека и животных I-IV групп патогенности, стационарных и мобильных лабораториях, имеющих санитарно-эпидемиологическое заключение на проведение работ с микроорганизмами I-IV групп патогенности.

Исследования могут выполнять специалисты не моложе 18 лет с высшим и средним медицинским, биологическим или иным образованием, окончившие соответствующие курсы специальной подготовки с освоением методов безопасной работы с патогенными биологическими агентами (ПБА) I-II групп патогенности.

Следует рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, поэтому этапы подготовки образцов и проведение анализа проводят в соответствии с требованиями СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности».

4.2 Информация об экологических рисках

Уничтожение неиспользованных компонентов препарата или препарата с истекшим сроком годности проводить в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10.

4.3 Информация о физических рисках, в том числе возможность взрыва или возгорания

Набор реагентов следует применять по назначению в комбинации приборами, прошедшими надлежащее техническое обслуживание. Необходимо строгое соблюдение инструкций по эксплуатации электрооборудования, безопасности при работе с электроприборами.

4.4 Информация о рисках применения, приводящих к ошибочному результату исследования:

- использование препарата «РИФ-Бру-СтавНИПЧИ» с истекшим сроком годности;
- нарушение условий транспортирования, хранения набора реагентов;
- нарушения упаковки и внешнего вида компонентов набора реагентов;
- нарушение условий транспортирования, хранения и подготовки проб;
- нарушение условий окружающей среды при эксплуатации набора реагентов;
- нарушение процесса проведения анализа, регистрации и учета результатов.

- применение по назначению МИ в комбинации со средствами измерения, не прошедшими поверку и/или калибровку.

5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С ПРЕПАРАТОМ

При исследованиях используют:

- микроскоп люминесцентный со спектральной областью исследуемой люминесценции 400-440 нм;
- иммерсионное нефлуоресцирующее масло (при его отсутствии можно использовать смесь из 9 частей глицерина и 1 части 0,9 % раствора натрия хлорида; pH смеси доводят до $8,5 \pm 0,5$ 10 % раствором натрия гидроокиси);
- дозаторы полуавтоматические поршневые медицинские с переменным объемом со сменяемыми наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости 20-200 мкл, 100-1000 мкл, аттестованные по объему средней дозы и сходимости результатов пипетирования (отклонение не более 3 %);
- термостат суховоздушный, поддерживающий температуру $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$;
- pH-метр милливольтметр;
- отраслевой стандартный образец мутности 10 МЕ (ОСО 42-28-85-П, соответствующего года выпуска);
- пипетки градуированные вместимостью 1, 2, 5, 10 мл;
- 0,9 % раствор натрия хлорида;
- питательные среды для выделения и культивирования бруцеллезного микроба (агар Альбими и т.д.);
- чашки Петри;
- вату медицинскую гигроскопическую;
- стакан химический мерный или колбу мерную вместимостью 1000 мл;
- стекла предметные;
- флаконы пенициллиновые ФО-1-10;
- пробирки биологические;
- калий двуххромовокислый;
- планшет круглодонный для иммунологических реакций, объемом лунки 2,0 мл;
- воду дистиллированную;
- натрий фосфорнокислый однозамещенный 2-водный;
- натрий хлористый;
- калий фосфорнокислый двухзамещенный;
- наконечники для дозаторов полуавтоматических пипеточных 200 мкл, 1000 мкл;
- спирт этиловый ректификат;
- эфир для наркоза стабилизированный;
- кислоту серную;
- перчатки медицинские резиновые.

6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1 Исследуемые бактериальные культуры с подозрением на содержание возбудителей бруцеллеза; биологический материал от больных и подозрительных на заражение людей (кровь, сыворотка крови, пунктаты). Допускается хранение исследуемого материала до 48 ч при температуре от 2 до 8 $^\circ\text{C}$.

6.2 Интерферирующие вещества – биологические образцы, не достаточно освобожденные от липидной фракции, могут повлиять на результаты анализов.

7 ПОДГОТОВКА К ПРОВЕДЕНИЮ АНАЛИЗА

При исследовании образцов руководствуются требованиями, изложенными в МУК 3.1.7.3402-16 «Эпидемиологический надзор и лабораторная диагностика бруцеллеза».

7.1 Подготовка предметных стекол для РИФ

Предметные стекла для проведения флуоресцентной микроскопии должны быть тонкими, со шлифом на одном конце. Новые стекла кипятят в 5 % растворе синтетического моющего средства в течение 30-40 мин, промывают в горячей воде и помещают в 10 % раствор серной кислоты или в смесь Никифорова (равное количество спирта этилового ректификата 96 % и эфира для наркоза), где и хранят до использования не менее 2-3 сут.

Стекла, бывшие в употреблении, опускают на 2-3 ч в хромовую смесь (150 мл концентрированной серной кислоты и 25 мг бихромата калия на 1-2 сут. Далее стекла промывают в теплой проточной воде и помещают в 10 % раствор серной кислоты или в смесь Никифорова, где и хранят до использования.

Перед использованием стекла ополаскивают дистиллированной водой и сушат.

Чистые стекла хранят до употребления в стеклянных банках с притертыми пробками или по 10 шт. в бумаге оберточной в течение 1 года.

7.2 Подготовка мазков бактериальных культур

7.2.1 Исследуемые бактериальные культуры с подозрением на содержание возбудителя бруцеллеза высевает в пробирки со скошенной питательной средой для выделения и культивирования бруцеллезного микроба (например, агар Альбими) и выращивают в течение (48 ± 2) ч при температуре (37 ± 1) °С. В случае исследования загрязненного материала для задержки роста посторонней микрофлоры к среде следует добавлять генцианвиолет (ТУ 6-09-07-4119-75) из расчета 1:200000. С этой целью также добавляют различные антибиотики, в частности полимиксин – 3 мкг/мл и амфоглюкамин – 3 мкг/мл.

Из выросших культур готовят взвеси в 0,9 % растворе натрия хлорида по отраслевому стандартному образцу мутности 10 МЕ.

Взвеси разводят, используя пипетку стеклянную градуированную, до концентрации $1,0 \times 10^8$ м.к./мл 0,9 % раствором натрия хлорида.

Из приготовленных взвесей готовят мазки на чистых тонких предметных стеклах. Наименование штамма на предметном стекле наносят грифельным карандашом на матовой поверхности. Применение восковых карандашей для надписей на стеклах недопустимо, т. к. воск, растворяясь в фиксаторе, образует на стеклах пленку, препятствующую окраске бактерий.

7.2.2 Мазки подсушивают на воздухе и фиксируют в течение 30 мин в 96 % этиловом спирте ректификате. В процессе фиксации не допускается слипание между собой отдельных предметных стекол.

После окончания времени фиксации мазки вновь подсушивают на воздухе и обводят восковым карандашом.

7.3 Подготовка мазков биологического материала человека

Клинический материал от людей исследуют после его подрачивания в течение 48-72 ч в жидких питательных средах (например, БРУЦЕЛЛА-бульоне, бульоне Хоттингера, Мартена и др.), делают мазки на чистых тонких предметных стеклах. Далее – согласно п. 7.2.2.

Наименование исследуемого материала на предметном стекле наносят грифельным карандашом на матовой поверхности

7.4 Приготовление фосфатно-солевого буфера (ФСБ)

Для приготовления 1,0 л ФСБ отвешивают 1,42 г двуводного натрия гидрофосфата; 0,27 г калия дигидрофосфата; 9,0 г натрия хлористого. Соли растворяют в 700 мл дистиллированной воды. Затем объем раствора доводят дистиллированной водой до 1,0 л в мерном цилиндре.

7.5 Подготовка препарата

Содержимое одной ампулы растворяют в 0,5 мл дистиллированной воды в течение 1 мин при встряхивании. После полного ресуспендирования готовят рабочее разведение препарата, указанное на этикетке, используя ФСБ. Разведение препарата готовят в пробирках, флаконах или в лунках планшета.

8 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

8.1 Проведение РИФ

На поверхность фиксированного и высушенного исследуемого мазка, помещённого во влажную камеру (чашка Петри с кусочком смоченной в воде ваты), дозатором полуавтоматическим наносят по капле рабочего разведения препарата.

Инкубацию проводят в течение 30 мин при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$.

Затем остатки препарата удаляют простым стряхиванием в емкость для использованных растворов, а мазки дважды промываются в стакане с ФСБ в течение 7 мин, ополаскивают в стакане с дистиллированной водой и тщательно высушивают на воздухе.

8.2 Регистрация результатов

Микроскопию мазков осуществляют на люминесцентном микроскопе при длине волны 400-440 нм под иммерсионным объективом, применяя иммерсионное нефлуоресцирующее масло.

8.3 Учет результатов

Для оценки интенсивности специфического свечения бактериальной клетки используют четырехкрестовую систему:

4 креста (++++) – очень яркая флуоресценция зеленовато-желтого цвета с четко выраженным ободком по периферии бактериальной клетки с темным центром;

3 креста (+++) – яркая флуоресценция зеленовато-желтого цвета с четко выраженным ободком по периферии бактериальной клетки с темным центром;

2 креста (++) и 1 крест (+) – заметная, но слабая равномерная флуоресценция микробной клетки без ободков. Такое свечение считают неспецифическим и не учитывают.

За положительный результат принимают специфическое свечение не менее трех микробных клеток с яркостью на 3-4 креста, которое наблюдается у возбудителей бруцеллеза.

9 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ ПРЕПАРАТА

9.1 Транспортирование препарата осуществляют в соответствии с СП 3.3.2.3332-16 и МУ 3.3.2.2437-09 всеми видами крытых транспортных средств с соблюдением условий и требований, установленных на данном виде транспорта, при температуре от 2 до 8 $^\circ\text{C}$. Допускается транспортирование наборов при температуре до 25 $^\circ\text{C}$ не более 7 сут.

9.2 Хранение препарата в упаковке предприятия-изготовителя должно проводиться при температуре от 2 до 8 $^\circ\text{C}$ в сухом, защищенном от света месте в течение всего срока годности.

9.3 Срок годности препарата – 3 года. Препарат с истекшим сроком годности применению не подлежит.

9.4 Сроки годности приготовленных для работы растворов:

ФСБ (рабочий раствор)	В закрытой посуде не более 7 сут. при температуре от 2 до 8 $^\circ\text{C}$
Иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие бруцеллезные растворенные в 0,5 мл дистиллированной воды	В течение 14 сут. при температуре хранения минус $(8 \pm 3)^\circ\text{C}$
Иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие бруцеллезные рабочий раствор	В течение 5 сут. при температуре хранения от 2 до 8 $^\circ\text{C}$

9.5 Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению препарата.

10 БЕЗОПАСНАЯ УТИЛИЗАЦИЯ

Утилизация препарата, не прошедшего контроль, а также серий с истекшим сроком годности не требует специальных мер безопасности (Класс отходов – А). Удалять неиспользованный препарат в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

Ампулы с препаратом вскрывают скарификатором ампульным и погружают в емкость с водой. После экспозиции, приводящей к утрате товарного вида, жидкую часть сливают в канализацию, твердые отходы сбрасывают в мусорные баки.

Большое количество ампул разрушают механически (помещают в мешок, смоченный водой, и разбивают), погружают в воду для придания нетоварного вида. После этого жидкую часть сливают в канализацию, твердую – сбрасывают в контейнеры для сбора отходов.

Потенциально инфицированные отходы биоматериала относятся к классу В (чрезвычайно эпидемически опасные отходы). Отходы класса В подлежат обязательному обеззараживанию (дезинфекции) / обезвреживанию. Выбор метода обеззараживания / обезвреживания определяется возможностями организации, осуществляющей медицинскую деятельность, и выполняется при разработке схемы обращения с медицинскими отходами.

11 ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

Предприятие-изготовитель гарантирует в течение всего срока годности соответствие качества препарата требованиям настоящих технических условий при соблюдении потребителем условий транспортирования, хранения и применения, установленных инструкцией по применению.

12 ИНФОРМАЦИЯ О ПРОИЗВОДИТЕЛЕ

Рекламации направлять в адрес предприятия-изготовителя – ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, 355035, г. Ставрополь, ул. Советская, д. 13-15, тел./факс (865-2) 26-03-12; e-mail: stavnipchi@mail.ru.

«СОГЛАСОВАНО»

Директор ФКУЗ РосНИПЧИ
«Микроб» Роспотребнадзора
академик РАН, д.м.н., профессор



Кутырев В.В.

Прошито, проверено, скреплено печатью.

Количество листов 7

(соль) шт.

Директор ФКУЗ Ставропольский
противочумный институт Роспотребнадзора

Куличенко А.Н.

