



ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ФЛУОРЕСЦИРУЮЩИХ ТУЛЯРЕМИЙНЫХ СУХИХ («РИФ-Тул-СтавНИПЧИ»)

1 НАЗНАЧЕНИЕ

Иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие туляремийные сухие предназначены для идентификации и качественного определения возбудителя туляремии в реакции иммунофлуоресценции, для исследования потенциально инфицированного материала.

Только для профессионального использования.

Область применения – клиническая лабораторная диагностика, диагностика инфекционных заболеваний, эпидемиологический надзор. Потенциальные потребители препарата – специализированные лаборатории учреждений, осуществляющие санитарно-эпидемиологический надзор за туляремией в Российской Федерации, лечебно-профилактических и противочумных учреждений.

Показания – подозрение на инфицирование (контаминацию) возбудителем туляремии.

Противопоказаний к применению препарата – нет.

Туляремия - зооноз, поражающий более 150 видов грызунов. Это природно-очаговое заболевание, широко распространенное в различных регионах России. Возбудитель туляремии (*Francisella tularensis*) по патогенности относится к II группе микроорганизмов, выделение и идентификация которых может производиться в специально оборудованных лабораториях подготовленными специалистами, вакцинированными против туляремии.

Туляремия передается человеку контактным (при вскрытии грызунов, при контакте с зараженной водой), алиментарным (при употреблении загрязненной грызунами пищи и воды) и аспирационным путем (при вдыхании пыли, например, при обмолоте контаминированных зерновых культур). Возбудитель может передаваться также кровососущими и другими членистоногими (клещами, блохами, комарами, слепнями, мухами-жигалками). Человек при туляремии является эпидемиологическим тупиком, то есть от человека человеку туляремия не передается.

Применение реакции иммунофлуоресценции (РИФ) в лабораторной диагностике туляремии регламентировано методическими указаниями (МУ 3.1.2007-05) ««Профилактика инфекционных болезней. Эпидемиологический надзор за туляремией»».

2 ХАРАКТЕРИСТИКИ ПРЕПАРАТА

2.1 Компонентный состав

Препарат «РИФ-Тул-СтавНИПЧИ» представляет собой специфические иммуноглобулины флуоресцирующие туляремийные сухие, выделенные из поливалентной сыворотки кроликов, иммунизированных комплексным туляремийным антигеном и конъюгированные с флуоресцеин-5-изотиоцианатом (ФИТЦ), 5 ампул по 0,5 мл. Массовая доля активного вещества (иммуноглобулины туляремийные конъюгированные с ФИТЦ) в препарате составляет $(1,2 \pm 0,5) \%$.

Препарат гигроскопичен и светочувствителен.

2.2 Комплектность

В потребительскую упаковку медицинского изделия «РИФ-Тул-СтавНИПЧИ» входят:

5 ампул с препаратом по 0,5 мл, инструкция по применению и скарификатор ампульный дисковый керамический СДАК-19-01 «Кулон»¹.

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-Тул-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 потенциально инфицированные образцы на присутствие бактериальных специфических антигенных детерминант, характерных для возбудителя туляремии при помощи флуоресцирующих иммуноглобулинов, визуализируя образовавшийся комплекс «антиген-антитело».

3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПРЕПАРАТА

3.1 Рабочее разведение

Не менее 1:16.

3.2 Специфическая активность

Препарат в рабочем разведении должен обеспечивать специфическое зеленовато-желтое свечение интенсивностью на 3-4 креста штаммов возбудителя туляремии СО 008-9388-2015².

3.3 Специфичность

Препарат в рабочем разведении не должен вызывать специфическую флуоресценцию штаммов гетерологичных микроорганизмов СО 008-9388-2015.

3.4. Диагностическая чувствительность и диагностическая специфичность

Диагностические характеристики набора установлены в клинико-лабораторных испытаниях с применением 8 штаммов возбудителя туляремии и 5 штаммов гетерологичных микроорганизмов из Государственной коллекции патогенных бактерий ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» на модельных образцах материала: 72 пробы бактериальных суспензий *F. tularensis* (*F. tularensis tularensis*, *F. tularensis holarctica*, *F. tularensis mediasiatica*) в концентрации 1×10^8 м.к./мл, 108 проб клинического материала, искусственно контаминированных *F. tularensis* (*F. tularensis tularensis*, *F. tularensis holarctica*, *F. tularensis mediasiatica*) в концентрации 1×10^8 м.к./мл, 108 проб биологического материала от биопробных животных, зараженных *F. tularensis* (*F. tularensis tularensis*, *F. tularensis holarctica*, *F. tularensis mediasiatica*) в концентрации 1×10^8 м.к./мл, 36 проб клещей, искусственно контаминированных *F. tularensis* (*F. tularensis tularensis*, *F. tularensis holarctica*, *F. tularensis mediasiatica*) в концентрации 1×10^8 м.к./мл, 72 пробы секционного материала, искусственно контаминированных *F. tularensis* (*F. tularensis tularensis*, *F. tularensis holarctica*, *F. tularensis mediasiatica*) в концентрации 1×10^8 м.к./мл, 168 проб, искусственно контаминированных гетерологичными микроорганизмами (*Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, *B. abortus*, *E. coli*, *S. dysenteriae*) в концентрации 1×10^8 м.к./мл.

¹ Скарификатор ампульный дисковый керамический СДАК-19-01 «Кулон» (ТУ 9398-001-07610517-2004) – диаметр (19±1,0) мм, толщина – (0,5±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. Скарификатор готов к применению, 1 шт.

² В стандартный образец ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора «Набор штаммов для контроля качества МИБП для диагностики туляремии» СО 008-9388-2015 входят штаммы следующих микроорганизмов: *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ, *Francisella tularensis* C-15, *Brucella abortus* 19 ВА; *Yersinia enterocolitica* 383; *Salmonella typhimurium* 9640; *Escherichia coli* 113-3. Штаммы обладают типичными морфологическими, культуральными, биохимическими и серологическими свойствами.

Определение туляремийного микроба с помощью МИ Иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие туляремийные сухие («РИФ-Тул-СтавНИПЧИ») по ТУ 21.20.21-46-01897080-2017 подтверждено с использованием образца сравнения «Иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие туляремийные сухие» (ФСР № 2010/08923), производства ФГБУ «ФНИЦЕМ им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России».

Диагностическая чувствительность - не менее 99,0 % с доверительной вероятностью 95 % при анализе 396 положительных проб (72 пробы бактериальных суспензий микроорганизмов, 108 проб клинического материала, 144 пробы биологического материала, 72 пробы секционного материала), содержащих возбудитель туляремии получен положительный результат - в 396 случаях.

Диагностическая специфичность - не менее 99,0 % с доверительной вероятностью 95 %; при исследовании 56 отрицательных проб (20 проб бактериальных суспензий микроорганизмов, 12 проб клинического материала, 16 проб биологического материала, 24 пробы секционного материала), содержащих гетерологичные микроорганизмы (*Yersinia pestis*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Brucella abortus*, *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae sonnei*) получен отрицательный результат в 56 случаях.

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

Препарат 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-Тул-СтавНИПЧИ» с истекшим сроком годности;
- нарушение условий транспортирования, хранения препарата «РИФ-Тул-СтавНИПЧИ»;
- нарушения упаковки и внешнего вида препарата «РИФ-Тул-СтавНИПЧИ»;
- нарушение условий транспортирования, хранения и подготовки проб;
- нарушение условий окружающей среды при эксплуатации препарата «РИФ-Тул-СтавНИПЧИ»;
- 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 глицерина и 0,9 % раствора натрия хлорида (9:1); 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 туляремийного микроба (агар Мак-Коя, FT-агар);
- чашки Петри;
- вату медицинскую гигроскопическую;
- стакан химический мерный или колбу мерную вместимостью 1000 мл;
- стекла предметные;
- флаконы пенициллиновые ФО-1-10;
- пробирки биологические;
- калий двухромовокислый;
- 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, потенциально содержащие возбудитель туляремии; патологический материал (от больных людей: содержимое кожного аффекта, пунктат бубона, материал из зева, конъюнктивы глаза, отделяемое язвы; от умерших людей: биоптаты легких, трахеи, содержимое увеличенных лимфатических узлов); при эпизоотологических обследованиях: материал от диких млекопитающих или их трупов и биопробных животных (отпечатки органов и тканей животных, гомогенаты органов животных, беспозвоночных переносчиков).

6.2 Информация об интерферирующих веществах – отсутствует.

7 ПОДГОТОВКА К ПРОВЕДЕНИЮ АНАЛИЗА

При исследовании образцов руководствуются требованиями, изложенными в Методических указаниях МУ 3.1.2007-05 «Профилактика инфекционных болезней. Эпидемиологический надзор за туляремией», 2005.

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, потенциально содержащие возбудитель туляремии высевают в пробирки со скошенной питательной средой для выделения и культивирования тулярийного микроба (агар Мак-Коя, FT-агар) и выращивают в течение (72 ± 2) ч при температуре (37 ± 1) °C. В случаях исследования загрязненного материала для задержки роста посторонней микрофлоры к среде следует добавлять антибиотики (ампициллин, полимиксин и др.).

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

Все взвеси дополнительно разводят, используя пипетку стеклянную градуированную, до концентрации $1,0 \times 10^8$ м.к./мл, используя 0,9 % раствор 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.

Мокроту или гной, нанесенные на предметное стекло, накрывают другим предметным стеклом. Стекла слегка придавливают. После этого стекла разводят в противоположные стороны так, чтобы при движении оба стекла плотно прилегали друг к другу. Далее – согласно п. 7.2.2.

Из органов подозрительных на заражение животных делают ряд мазков-отпечатков на предметном стекле или кусочек органа помещают между двумя предметными стеклами. Стекла слегка придавливают. После этого стекла разводят в противоположные стороны так, чтобы при движении оба стекла плотно прилегали друг к другу, получая мазок. Далее – согласно п. 7.2.2.

Иксодовые клещи. Перед исследованием взрослых клещей (около 50 особей в один анализ) помещают в пробирку, приливают 10-15 мл этилового спирта, энергичным стряхиванием промывают клещей 0,5-1 мин, сливают спирт, после чего 3-4 раза таким же образом промывают их в стерильной дистиллированной воде. Отмытых клещей помещают на фильтровальную бумагу для удаления излишней влаги, а затем в ступку. Клещей раздавливают пестиком и растирают в кашицу, избегая разбрызгивания. К растертой массе добавляют 5 мл стерильного физиологического раствора и тщательно перемешивают в однородную суспензию.

зию, которую набирают в шприц через большой кусочек стерильной ваты, делая по возможности тонкий мазок. 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. 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 4-х крестовую 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 возбудителя туляремии.

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 °С
Иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие туляремиальные растворенные в 0,5 мл дистиллированной воды	В течение 14 сут. при температуре хранения минус (8±3) °С
Иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие туляремиальные рабочий раствор	В течение 5 сут. при температуре хранения от 2 до 8 °С

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) 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

(семь) шт.

Директор ФКУЗ Ставропольский
противочумный институт Роспотребнадзора

Куличенко А.Н.

