

Конфиденциальность гарантируется
получателем информации

Для служебного пользования. Экз. №

УТВЕРЖДАЮ

Директор ФГУЗ СтавНИПЧИ

Роспотребнадзора

А.Н. Куличенко

" 26 " 2010 г.

ПРОМЫШЛЕННЫЙ РЕГЛАМЕНТ № 01897080-15-10

на производство

набора реагентов диагностикума эритроцитарного

туляремийного иммуноглобулинового жидкого

(«РНГА-Тул-Иг-СтавНИПЧИ»)

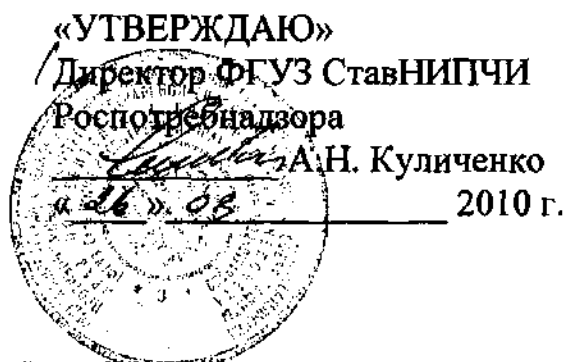
Срок действия регламента

до " " 20 г.

Взамен РП № 01897080-06-03

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора
от _____ 2010 г. № _____



**ИНСТРУКЦИЯ
ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДИАГНОСТИКУМ ЭРИТРОЦИТАРНЫЙ
ТУЛЯРЕМИЙНЫЙ ИММУНОГЛОБУЛИНОВЫЙ ЖИДКИЙ
(РНГА-Тул-Иг-СтавНИПЧИ)**

1 НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов диагностикум эритроцитарный туляремиальный иммуноглобулиновый жидкий «РНГА-Тул-Иг-СтавНИПЧИ» (далее по тексту – набор), предназначен для идентификации возбудителя туляремии в бактериальных культурах, обнаружения туляремиального антигена в биологическом материале и объектах окружающей среды в реакции непрямой гемагглютинации (РНГА), а также для выявления антител в сыворотках крови животных и людей больных, переболевших и вакцинированных против туляремии в реакции нейтрализации антигена (РНАг).

Туляремия – зооноз, поражающий более 150 видов грызунов. Это природно-очаговая инфекция, широко распространенная в различных регионах России. Возбудитель туляремии (*F. tularensis*) патогенности относится к микроорганизмам II группы, 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 загрязненных зерновых культур). Возбудитель может передаваться также кровососущими и другими членистоногими (клещами, блохами, комарами, слепнями, мухами-жигалками). Человек при туляремии является эпидемиологическим тупиком.

Применение РНГА для диагностики туляремии в сыворотках и для детекции возбудителя в объектах окружающей среды регламентировано методическими указаниями (МУ 3.1.2007-05) «Профилактика инфекционных болезней. Эпидемиологический надзор за туляремией» [2005].

2 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1 ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

В основу метода положена схема реакции непрямой гемагглютинации. При постановке РНГА туляремиальный антиген, содержащийся в исследуемом материале, специфически взаимодействует с туляремиальными иммуноглобулинами, сорбированными на активированных эритроцитах барана. Эритроциты выпадают на дно лунок равномерным слоем в виде «зонтика», занимая не менее 2/3 диаметра сферической поверхности в лунке (в ряде случаев отмечается фестончатое оплывание краев агглютината).

2.2 СОСТАВ НАБОРА

В комплект поставки входят: набор реагентов, инструкция по применению, паспорт.

В состав набора реагентов входят следующие компоненты:

Диагностикум эритроцитарный туляремиальный иммуноглобулиновый жидкий 5 % 3 флакона

Взвесь убитой культуры туляремиального микроба (<i>F. tularensis</i> 15 НИИЭГ)	1 ампула
концентрацией $1,0 \times 10^9$ микробных клеток (м.к.)/мл жидкая	
Эритроциты барана формализированные 50 % жидкие	1 флакон
Сыворотка диагностическая туляремиальная адсорбированная сухая 1:10 (СО 001-9389-2008)	1 ампула
Твин-80 в разведении 1:500 жидкий	1 ампула
Скарификатор дисковый ампульный керамический	1 шт.

3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Специфическая активность – набор должен выявлять штаммы туляремиального микроба в разведении $3,12 \times 10^6$ м.к./мл в РНГА макрометодом, $6,25 \times 10^6$ м.к./мл – в РНГА микрометодом.

В РНАг набор должен выявлять антитела в сыворотке туляремиальной агглютинирующей в разведении не менее 1:16000 – макрометодом, не менее 1:8000 – микрометодом.

Специфичность – набор не выявляет гетерологичные штаммы в разведении $1,0 \times 10^8$ м.к./мл в РНГА.

4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Потенциальный риск применения набора – класс 2Б (ГОСТ Р 51609-2000, приказ Минздрава России № 735 от 30 октября 2006 г.).

Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

При работе с набором следует соблюдать Санитарно-эпидемиологические правила (СП 1.3.1285-03) «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)» [2003].

Утилизация компонентов набора, не прошедшего контроль, а также серий с истекшим сроком годности не требует специальных мер безопасности. Ампулы и флаконы с реагентами вскрывают 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.

5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

При исследованиях используют:

- планшет полимерный для иммунологических реакций круглодонный с объемом лунок 2,0 мл;
- планшет полимерный для иммунологических реакций однократного применения (стерильный) круглодонный с объемом лунки 0,4 мл;
- дозаторы полуавтоматические с переменным объемом со сменяемыми наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости 2-20 мкл, 50-200 мкл, 200-1000 мкл, аттестованные по объему средней дозы и сходимости результатов пипетирования (отклонение не более 3 %);
- дозатор полуавтоматический многоканальный с переменным объемом со сменяемыми наконечниками, позволяющий отбирать объемы жидкости 50-300 мкл, аттестованный по объему средней дозы и сходимости результатов пипетирования (отклонение не более 3 %);
- микротитратор «Такачи»;
- баню водяную;
- термостат суховоздушный, поддерживающий температуру $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$;
- бумагу фильтровальную или салфетки марлевые;
- стакан химический мерный или колбу мерную вместимостью 1000 мл;
- воду дистиллированную;
- 0,9 % раствор натрия хлорида, готовый к употреблению;
- вату медицинскую белую;
- формалин;

- спирт этиловый ректификат;
- перчатки резиновые.

6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Бактериальные культуры с подозрением на принадлежность к возбудителю туляремии, биологический материал и объекты окружающей среды. Допускается хранение исследуемого материала до 48 ч при температуре $(5\pm 3)^{\circ}\text{C}$.

7 ПРОВЕДЕНИЕ 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 ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Набор извлекают из холодильника и выдерживают при комнатной температуре $(18-25^{\circ}\text{C})$ в течение не менее 30 мин.

Перед проведением анализа подготовка набора проводится следующим образом:

1. Диагностикум эритроцитарный туляремиальный иммуноглобулиновый жидкий 5 % (содержимое одного флакона) для макрометода разводят в два раза 0,9 % раствором натрия хлорида для получения 2,5 % взвеси эритроцитов. Для микрометода 2,5 % взвесь дополнительно разводят 0,9 % раствором натрия хлорида в 5 раз для получения 0,5 % концентрации препарата.

Перед проведением реакций диагностикум встряхивают до образования равномерной взвеси.

2. Твин-80 в качестве разводящей жидкости используют в разведении 1:50000, для чего раствор в концентрации 1:500 дополнительно разводят в 100 раз 0,9 % раствором натрия хлорида.

3. Эритроциты барана формализированные 50 % перед использованием тщательно встряхивают до образования равномерной взвеси.

4. Содержимое ампулы с сывороткой диагностической туляремиальной адсорбированной сухой (СО 001-9389-2008) растворяют в 2,0 мл дистиллированной воды, получая разведение 1:10, затем разводят в 50 раз 0,9 % раствором натрия хлорида, получая разведение 1:500 для постановки РНАг и реакции торможения непрямой агглютинации (РТНГА).

5. Взвесь убитой культуры туляремиального микроба, прилагаемую в наборе, разводят 0,9 % раствором натрия хлорида до концентрации $5,0 \times 10^7$ м.к./мл.

7.2 ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Исследуемые бактериальные культуры, подозрительные на принадлежность к возбудителю туляремии, высевают на питательную среду для выделения и культивирования туляремиального микроба (FT-агар)*, скошенную в пробирках, и выращивают в течение (72 ± 2) ч при температуре $(37\pm 1)^{\circ}\text{C}$. Из выросших культур готовят взвеси в 0,9 % растворе натрия хлорида концентрацией $1,0 \times 10^9$ м.к./мл по стандартному образцу мутности ГИСК им. Л.А. Тарасевича (ОСО 42-28-85-П соответствующего года выпуска) 10 единиц, эквивалентных $5,0 \times 10^9$ м.к./мл туляремиального микроба.

*Состав FT-агара (ТУ 9398-028-78095326-2007), г/л:

Сернокислотный гидролизат рыбной муки марки ФКС – 17,7;	
Стимулятор роста гемофильных микроорганизмов – 5,0;	
Экстракт пекарных дрожжей	– 2,3;
Магний сернокислый	– 0,5;
Натрия сульфит	– 0,7;
Цистеин	– 0,5;
Агар-ага	– $10,0 \pm 2,0$

Взвеси прогревают при температуре $(100 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 20 мин, с последующим добавлением формалина до 2 % концентрации и оставляют на 2 ч при температуре $(22 \pm 4)^\circ\text{C}$.

Перед исследованием взвеси разводят 0,9 % раствором натрия хлорида до концентрации $5,0 \times 10^7$ м.к./мл.

Материал от подозрительных на заражение животных растирают в ступке, добавляя 10-кратный объем 0,9 % раствора натрия хлорида с 2 % раствором формалина, отбирают жидкую часть и кипятят ее на водяной бане при температуре $(100 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 20 мин, выдерживают в течение 2 ч при температуре $(22 \pm 4)^\circ\text{C}$. Надосадочную жидкость фильтруют через марлевый или бумажный фильтр.

Подготовку к исследованию погадок хищных птиц проводят следующим образом. Погадки (каждую в отдельности или группу из 2-3 штук) заливают 1 % раствором формалина так, чтобы избыток его составлял примерно 5-10 мл, и разминают. После отстаивания в течение 1-6 ч надосадочную жидкость отбирают, прогревают ее при температуре $(100 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 20 мин и при необходимости фильтруют через ватный тампон.

Для исследования субстрата гнезда грызунов желательно брать его целиком вместе с прилегающими слоями почвы. Менее желательным, но допустимым является исследование части субстрата гнезда; в таких случаях еще в поле или уже после доставки материала в лабораторию субстрат хорошо перемешивают и берут для исследования не менее 100 см^3 . Материал, после того как из него будут выбраны блохи, заливают 1 % раствором формалина с избытком в 10-11 мл, через 1-2 ч отбирают надосадочную жидкость, прогревают ее при температуре $(100 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 20 мин и, при необходимости, фильтруют.

При исследовании объектов водной среды отбирают 0,5 л воды, прогревают при температуре $(100 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 20 мин, после чего инактивируют формалином до конечной концентрации 2 % (на 500 мл пробы – 10 мл формалина) и оставляют на 2 ч при температуре $(22 \pm 4)^\circ\text{C}$.

Исследуемые сыворотки разводят 0,9 % раствором натрия хлорида 1:10, инактивируют прогреванием в водяной бане в течение 30 мин при температуре $(56 \pm 1)^\circ\text{C}$ и адсорбируют эритроцитами барана формализированными 50 % из расчета 0,1 мл на 1,0 мл исследуемого материала. Смесь перемешивают и выдерживают при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение $(1,5 \pm 0,5)$ ч или при температуре $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ в течение (19 ± 1) ч для удаления гетерологичных гемагглютинирующих антител сыворотки. Надосадочную жидкость исследуют.

7.3 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Анализ проводят в лунках планшета полистиролового круглодонного с объемом лунок 2,0 мл макрометодом или в лунках планшета круглодонного для иммуноферментного анализа однократного применения с объемом лунок 0,2 мл – микрометодом.

Полистироловые пластины, используемые для постановки макрометода, промывают в мыльном растворе, ополаскивают в проточной, а затем в дистиллированной воде и сушат. Перед постановкой реакции каждую лунку протирают тампоном, смоченным 0,9 % раствором натрия хлорида.

Постановку каждой реакции осуществляют в 2 повторностях.

РНГА (макротест). В лунки рядов полимерного планшета с помощью пипетки вместимостью 1,0 или 2,0 мл или дозатором автоматическим вносят по 0,4 мл Твин-80 в разведении 1:50000. В первую лунку первого ряда добавляют 0,4 мл взвеси убитой культуры тулярийного микроба, прилагаемой в наборе, в концентрации $5,0 \times 10^7$ м.к./мл, а в первые лунки последующих рядов по 0,4 мл исследуемого материала, с подозрением на содержание антигена тулярийного микроба. Делают последовательные двукратные разведения переносом по 0,4 мл из одной лунки в другую до 11 лунок включительно. Из последних лунок по 0,4 мл удаляют. Получают разведения культур от $2,5 \times 10^7$ до $2,4 \times 10^4$ м.к./мл, 12 лунки используют для контроля диагностикума. После титрации во все лунки добавляют по 0,05 мл диагностикума эритроцитарного тулярийного иммуноглобулинового в концентрации 2,5 %. Содержимое лунок осто-

рожно перемешивают покачиванием пластины и оставляют при температуре $(22\pm 4)^\circ\text{C}$ на неподвижной поверхности.

РНГА (микрометод). В лунки рядов полимерного планшета с помощью микротитратора «Такачи» или дозатором автоматическим вносят по 0,05 мл Твин-80 в разведении 1:50000. В первую лунку первого ряда добавляют 0,05 мл взвеси убитой культуры туляремиального микроба, прилагаемой в наборе, в концентрации $5,0 \times 10^7$ м.к./мл, а в первые лунки последующих рядов по 0,05 мл исследуемого материала, с подозрением на содержание антигена туляремиального микроба. Делают последовательные двукратные разведения переносом по 0,05 мл из одной лунки в другую до 11 лунок включительно. Из последних лунок по 0,05 мл удаляют. Получают разведения культур от $2,5 \times 10^7$ до $2,4 \times 10^4$ м.к./мл, 12 лунки используют для контроля диагностикума. После титрации во все лунки добавляют по 0,025 мл диагностикума эритроцитарного туляремиального иммуноглобулинового в концентрации 0,5 %. Содержимое лунок осторожно перемешивают покачиванием пластины и оставляют при температуре $(22\pm 4)^\circ\text{C}$ на неподвижной поверхности.

РТНГА. Определение специфичности РНГА проводят путем постановки ее торможения. При постановке РТНГА в лунки рядов полимерного планшета вносят по 0,2 мл (макрометод) и 0,025 мл (микрометод) твин-80 в разведении 1:50000. В первую лунку первого ряда вносят взвесь убитой культуры туляремиального микроба, прилагаемую в наборе, в концентрации $5,0 \times 10^7$ м.к./мл по 0,2 мл (макрометод) и 0,025 мл (микрометод), а в первые лунки последующих рядов – исследуемый материал в таких же объемах. Затем делают последовательные двукратные разведения переносом по 0,2 мл (макрометод) и 0,025 мл (микрометод), получая разведения от $2,5 \times 10^7$ до $2,4 \times 10^4$ м.к./мл. В каждую лунку добавляют по 0,2 мл (макрометод) и 0,025 мл (микрометод) сыворотки диагностической туляремиальной адсорбированной, прилагаемой в наборе, в разведении 1:500. Содержимое лунок перемешивают покачиванием планшета и оставляют на (60 ± 5) мин при температуре $(22\pm 4)^\circ\text{C}$ на неподвижной поверхности. После этого во все лунки вносят при проведении реакции макрометодом – по 0,05 мл 2,5 %, а при проведении реакции микрометодом – по 0,025 мл 0,5 % диагностикума эритроцитарного туляремиального иммуноглобулинового.

Содержимое лунок перемешивают покачиванием пластины и оставляют при температуре $(22\pm 4)^\circ\text{C}$ на неподвижной поверхности.

Постановка РНАг. Перед постановкой РНАг определяют 2 антигенсвязывающие единицы (АЕ) в РНГА (см. «РНГА (макрометод)»).

За 1 АЕ принимают положительную агглютинацию в последней лунке. В РНАг используют 2 АЕ. Например, положительная агглютинация наблюдается в лунке с концентрацией $7,8 \times 10^5$ м.к./мл, что соответствует 1 АЕ. Для получения 2 АЕ необходимо использовать микробную взвесь концентрацией $1,56 \times 10^6$ м.к./мл или исходную взвесь, содержащую $5,0 \times 10^7$ м.к./мл, развести в 32 раза и использовать в РНАг.

Определение 2 АЕ для постановки РНАг микрометодом проводят аналогично макрометоду, но в меньшем объеме.

РНАг (макрометод). В лунки каждого ряда полистиролового планшета вносят по 0,2 мл Твин-80 в разведении 1:50000. Затем в первую лунку первого ряда добавляют 0,2 мл сыворотки диагностической туляремиальной адсорбированной, прилагаемой в наборе, в разведении 1:500, а в первые лунки последующих рядов – по 0,2 мл исследуемых сывороток в разведении 1:10. Делают ряд последовательных двукратных разведений переносом по 0,2 мл из 1 лунки в последующие до 11 лунок, из которых 0,2 мл удаляют, 12 лунки используют для контроля диагностикума. Далее во все лунки вносят 2 АЕ в 0,2 мл взвеси убитой культуры туляремиального микроба, прилагаемой в наборе. Смесь перемешивают покачиванием планшета и оставляют на (60 ± 5) мин при температуре $(22\pm 4)^\circ\text{C}$. Затем во все лунки добавляют по 0,05 мл 2,5 % диагностикума эритроцитарного туляремиального иммуноглобулинового. Содержимое лунок перемешивают покачиванием планшета и оставляют при температуре $(22\pm 4)^\circ\text{C}$ на неподвижной поверхности.

РНАг (микрометод). В лунки каждого ряда полистиролового планшета вносят по 0,025 мл Твин-80 в разведении 1:50000. Затем в первую лунку первого ряда добавляют 0,025 мл сыворотки диагностической туляремийной адсорбированной, прилагаемой в наборе, в разведении 1:500, а в первые лунки последующих рядов – по 0,025 мл исследуемых сывороток в разведении 1:10. Делают ряд последовательных двукратных разведений переносом по 0,025 мл из 1 лунки в последующие до 11 лунок, из которых 0,025 мл удаляют, 12 лунки используют для контроля диагностикума. Далее во все лунки вносят 2 АЕ в 0,025 мл взвеси убитой культуры туляремийного микроба, прилагаемой в наборе. Смесь перемешивают покачиванием планшета и оставляют на (60 ± 5) мин при температуре $(22 \pm 4) ^\circ\text{C}$. Затем во все лунки добавляют по 0,025 мл 0,5 % диагностикума эритроцитарного туляремийного иммуноглобулинового. Содержимое лунок перемешивают покачиванием планшета и оставляют при температуре $(22 \pm 4) ^\circ\text{C}$ на неподвижной поверхности.

8 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Учет и регистрация результатов проводится визуально без использования дополнительного оборудования.

9 УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

Учет результатов РНГА. Проводят через $(2,5 \pm 0,5)$ ч предварительный для макрометода и окончательный для микрометода. Окончательный учет результатов для макрометода осуществляют через (21 ± 3) ч.

Результат РНГА считают положительным, если эритроциты выпадают на дно лунок равномерным слоем в виде «зонтика», занимая не менее $2/3$ диаметра сферической поверхности в лунке (в ряде случаев отмечается фестончатое оплывание краев агглютината). При отрицательном результате эритроциты выпадают на дно лунки в виде «пуговики» или узкого колечка с ровным краем.

В контрольных лунках результат должен быть отрицательным.

Учет результатов РТНГА. Проводят через $(2,5 \pm 0,5)$ ч предварительный для макрометода и окончательный для микрометода. Окончательный учет результатов для макрометода осуществляют через (21 ± 3) ч.

РНГА считают специфичной, если в РТНГА гемагглютинация отсутствует или наблюдается в меньшем числе лунок по сравнению с РНГА (на 3-4 лунки меньше).

Учет результатов РНАг. Проводят через $(2,5 \pm 0,5)$ ч предварительный для макрометода и окончательный для микрометода. Окончательный учет результатов для макрометода осуществляют через (21 ± 3) ч.

Последнюю лунку с отрицательной гемагглютинацией учитывают как титр сыворотки, при этом разведение сыворотки в первой лунке принимают за 1:2000 при постановке РНАг макро- и микрометодами.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1 Транспортирование наборов в соответствии с СП 3.3.2.1248-03 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.

10.2 Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно производиться при температуре от 2 до $8 ^\circ\text{C}$ в течение всего срока годности – 12 месяцев. Допускается хранение наборов при температуре до $25 ^\circ\text{C}$ не более 7 сут. Замораживание компонентов набора не допускается. Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит.

10.3 Компоненты набора перед использованием необходимо выдержать при комнатной температуре ($18-25 ^\circ\text{C}$) не менее 30 мин.

10.4 Для отбора и добавления реагентов необходимо использовать полуавтоматические дозаторы со сменными наконечниками, аттестованные на точность по значению средней дозы и воспроизводимости результатов пипетирования.

10.5 Не допускается использование компонентов из наборов, производимых другими фирмами.

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

По вопросам, касающимся качества набора реагентов диагностикума эритроцитарного туляремиального иммуноглобулинового жидкого «РНГА-Тул-Иг-СтавНИПЧИ», следует обращаться в ФГУЗ СтавНИПЧИ Роспотребнадзора (355035, г. Ставрополь, ул. Советская, 13-15, тел./факс (865-2) 26-03-12; тел./факс (865-2) 26-40-05; тел./факс (865-2) 26-40-39, электронный адрес: snipchi@mail.stv.ru

Заместитель директора
по научно-производственной работе
ФГУЗ СтавНИПЧИ Роспотребнадзора

Л.В. Ляпустина

«СОГЛАСОВАНО»

Зав. кафедрой клинической лабораторной
диагностики ГОУ ДПО «РМАПО Росздрава»
д.м.н., профессор



В.В. Долгов

2010 г.

