

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ КАЗЁННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОСТОВСКИЙ - НА- ДОНУ ОРДЕНА ТРУДОВОГО КРАСНОГО ЗНАМЕНИ
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ПРОТИВОЧУМНЫЙ ИНСТИТУТ
ФЕДЕРАЛЬНОЙ СЛУЖБЫ ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ
ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА**

УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора
от _____ 20 ____ г. № _____

УТВЕРЖДЕНО
Директор ФКУ «Ростовский-на-Дону
научно-исследовательский противочумный институт»

А.Б. Мазрухо
2012



ИНСТРУКЦИЯ
по применению на изделие медицинское для диагностики in vitro
Набор реагентов
«Иммуноглобулины моноклональные диагностические
флуоресцирующие сухие
для серологической идентификации V. cholerae O1 и O139 (in vitro) методом РИФ
«Иг - V. cholerae O1/O139 – РИФ»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор относится к изделиям медицинского назначения для использования in vitro и применяется в клинической лабораторной диагностике (микробиологическая диагностика).

1.2. Набор предназначен для выявления и серологической идентификации холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп, выделенных от человека и из объектов окружающей среды (ООС), в реакции прямой иммунофлуоресценции (РИФ).

1.3. Набор может применяться как в стационарных, так и мобильных лабораториях в полевых условиях и даёт возможность получать оперативную информацию при проведении мониторинга объектов окружающей среды. Набор может применяться для выявления возбудителя холеры в нативном материале от больных и из объектов окружающей среды, а также после выделения чистой культуры V. cholerae O1 и O139.

2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

Определение серогруппы холерных вибрионов основывается на реакции прямой иммунофлуоресценции (РИФ) при смешивании моноклональных антител O1 и O139 с исследуемым образцом. При наличии в исследуемом образце возбудителя холеры O1 или

О139 серогрупп флуоресцирующие моноклональные антитела специфически соединяются с О-антигеном, что выявляется при люминесцентной микроскопии за счет интенсивного зеленого свечения указанных комплексов. Специфическим считается свечение с яркостью на «4+» и «3+», свечение с яркостью на «2+» или «1+» принято считать неспецифическим. Обнаружение светящегося ареола на 3+/4+ хотя бы у единичных клеток свидетельствует о наличии в исследуемом материале холерного вибриона.

3. СОСТАВ НАБОРА И ЕГО ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. В состав Набора входят:

- иммуноглобулины моноклональные диагностические холерные О1 флуоресцирующие - для выявления холерных вибрионов О1 серогруппы; сухие - 1 флакон (6 мг);
- иммуноглобулины моноклональные диагностические холерные О139 флуоресцирующие - для выявления холерных вибрионов О139 серогруппы; сухие - 1 флакон (6 мг);
- смесь солей для приготовления промывающего раствора; сухая, концентрат х 10 - 1 флакон (12,1 г).

К Набору прилагается инструкция по применению и аналитический паспорт на поставляемую серию набора.

3.2. Описание реагентов:

Иммуноглобулины моноклональные холерные О1 и О 139 представляют собой иммуноглобулиновые фракции классов G и M, выделенные с помощью насыщенного раствора сульфата аммония из асцитической жидкости мышей линии BALB/c и культуральной жидкости гибридом-продуцентов и меченные флуоресцеин-5-изотиоцианатом (ФИТЦ); консервант - мертиолат натрия в конечной концентрации 0,01 %.

Внешний вид реагентов:

Иммуноглобулины моноклональные флуоресцирующие О1 и О139, сухие - представляют собой компактную массу светло-желтого цвета в виде таблетки.

Смесь солей для приготовления промывающего раствора, сухая - представляет собой кристаллический порошок белого цвета.

Регидратированные иммуноглобулины О1 и О139 - прозрачный или слегка опалесцирующий раствор желтого цвета.

Регидратированная смесь солей – прозрачный или слегка опалесцирующий раствор, бесцветный.

3.3. Функциональные характеристики Набора:

- Набор рассчитан на определение серологической идентификации холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп в 30 исследуемых образцах.
- расход рабочих растворов иммуноглобулинов O1 и O139 на одно исследование составляет 30 мкл каждого иммуноглобулина.
- общее время проведения реакции с исследуемым образцом – не более 30 мин.

3.4. Аналитические и диагностические характеристики:

На базе Музея живых культур ФКУЗ РостНИПЧИ было проведено испытание экспериментальных серий «Иг - *V. cholerae* O1/O139 – РИФ». В работе было использовано 53 штамма *V. cholerae* eltor, 19 штаммов *V. cholerae cholerae*, 35 штаммов *V. cholerae* O139, 46 штаммов *V. cholerae* не O1/не O139, 9 штаммов *V. cholerae* RO, 11 штаммов *V. parahaemolyticus*, 4 штамма *E. coli*, 11 штаммов *Aeromonas*, 4 штамма *Brucella* sp., 4 штамма *Salmonella* sp. Проверка препаратов показала отсутствие перекрестных реакций с представителями близкородственных и гетерологичных микроорганизмов и строгую специфичность в отношении *V. cholerae* O1 и O139. Высокая специфичность Набора позволяет выявлять холерные вибрионы O1 и O139 серогрупп из нативного материала. В соответствии с МУК 4.2.2218-07 "Лабораторная диагностика холеры" набор может применяться на всех этапах идентификации холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- 4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 3 (ГОСТ Р 51609-2000).
- 4.2. Реагенты Набора в используемых концентрациях безопасны и не обладают токсическим воздействием.
- 4.3. При работе с Набором следует соблюдать меры предосторожности, принятые при работе с потенциально инфицированным материалом.
- 4.4. При работе с Набором следует соблюдать Санитарные Правила СП 1.3.1285-03 «Безопасность работы с микроорганизмами I - II групп патогенности (опасности)».
- 4.5. При работе с Набором следует соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г) и ГОСТ Р

53079.2-2008. Национальный стандарт Российской Федерации. Технологии лабораторные клинические. Обеспечение качества клинических лабораторных исследований.

4.6. Набор предназначен только для использования в диагностики *in vitro*.

5. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

5.1. Контроль правильности работы Набора проводят согласно ГОСТ Р 53133.3-2008 и Методическим указаниям: МУК 4.2.2218-07 "Лабораторная диагностика холеры" и МУК 4.2.2315-08."Серологические методы в диагностике холеры". Дополнения к МУК 4.2.2218-07 "Лабораторная диагностика холеры".

5.2. Достоверность результатов исследования зависит от соблюдения стандартности выполнения всех лабораторных процедур.

5.3. Процедура внутреннего контроля качества исследования может включать контроль специфической активности иммуноглобулинов моноклональных холерных O1 и O139 при постановке реакции прямой иммунофлуоресценции (РИФ) с контрольными штаммами. Контрольные штаммы: *V. cholerae* eltor 13020 (Инаба) и 12214 (Огава); *V. cholerae cholerae* 569В (Инаба) и 1395 (Огава); *V. cholerae* O139 16077 (выделенный от человека) и 17915 (выделенный из воды), *V. cholerae* O22, *V. cholerae* RO CA 385, *V. parahaemolyticus* ATCC 17802; *E.coli* 18 находятся в коллекции Музея живых культур ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт». Постановку проводят в соответствии с инструкцией по применению иммуноглобулинов моноклональных холерных O1 и O139. При учете результатов должно быть выявлено, что:

Иммуноглобулины O1 должны выявлять штаммы *V. cholerae* eltor 13020 (Инаба) и 12214 (Огава); *V. cholerae cholerae* 569В (Инаба) и 1395 (Огава), выделенные от человека и из объектов окружающей среды.

Иммуноглобулины O1 не должны выявлять *V. cholerae* O139 16077 (выделенный от человека) и 17915 (выделенный из воды), близкородственные *V. cholerae* O22, *V. cholerae* RO CA 385 и гетерологичные *V. parahaemolyticus* ATCC 17802 и *E.coli* 18.

Иммуноглобулины O139 должны выявлять *V. cholerae* O139 16077(выделенный от человека) и 17915 (выделенный из воды).

Иммуноглобулины O139 не должны выявлять *V. cholerae* eltor 13020 (Инаба) и 12214 (Огава); *V. cholerae cholerae* 569В (Инаба) и 1395 (Огава), близкородственные *V. cholerae* O22, *V. cholerae* RO CA 385 и гетерологичные *V. parahaemolyticus* ATCC 17802 и *E.coli* 18.

5.4. Процедура внутреннего контроля качества исследования включает обязательный контроль иммунологической специфичности: отсутствие реакции иммуноглобулинов моноклональных холерных O1 и O139 с представителями других видов микроорганизмов. Для этой цели можно использовать штаммы, находящиеся в каждой конкретной лаборатории.

6. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

Дистиллированная вода для разведения лиофилизированных иммуноглобулинов моноклональных холерных O1 и O 139 и смеси солей для приготовления промывающего раствора;

Спирт этиловый 96°;

Предметные стекла;

Одноканальный дозатор переменного объема Колор (20 - 200 мкл);

Наконечники к дозатору;

Чашки Петри;

Вата гигроскопичная;

Микробиологические петли;

Спиртовка;

0,9 % раствор натрия хлорида, pH 7,2±0,1;

Стандартный образец мутности ОСО 42-28-85П;

Мясопептонный бульон (pH 7,2±0,2) для культивирования холерного вибриона;

Щелочной агар для выделения холерных вибрионов (pH 8,2±0,1);

Масло иммерсионное (нефлуоресцирующее);

Люминесцентный микроскоп или оптический микроскоп с люминесцентной насадкой. Люминесцентную микроскопию мазков проводят на микроскопе типа ЛЮМАМ-И и ЛЮМАМ-Р и др. под иммерсионным объективом при увеличении 7×90. Рекомендуется применять светофильтры возбуждающего света СЗС-7, СЗС-24, БС-3, СС-15 и запирающие светофильтры ЖС-18. Для получения наиболее яркой флуоресценции бактерий следует тщательно центрировать осветительную систему микроскопа;

Перчатки резиновые хирургические.

7. ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

7.1. Приготовление мазков бактериальных взвесей.

При исследовании поступившего материала наряду с приготовлением первичных мазков одновременно проводят посев на питательные среды в соответствии с МУК

4.2.2218-07 «Лабораторная диагностика холеры». Из выросшей культуры холерных вибрионов готовят мазки и проводят их повторное исследование. Для приготовления мазков из чистых культур готовят 1 млрд. взвеси 18-часовой агаровой культуры холерных вибрионов в стерильном 0,9 % растворе натрия хлорида pH $7,2 \pm 0,1$. Мазки из различных образцов и из чистых культур готовят тонкими на тщательно обезжиренных стеклах по общепринятой методике. Наличие на предметных стеклах кусочков ткани и органов недопустимо. Из каждого объекта готовят не менее 3 мазков. После подсушивания мазков на воздухе проводят их фиксацию путем погружения в 96° этиловый спирт на 20 минут. В процессе фиксации не допускается слипание между собой отдельных предметных стекол и применение восковых карандашей.

7.2. При исследовании воды поверхностных водоемов и водопроводной образцы фильтруют через мембранные фильтры №2 и №3, а смывы с фильтра исследуют в реакции иммунофлуоресценции.

8. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

8.1. Перед проведением анализа компоненты Набора следует выдержать при комнатной температуре ($18 - 25^{\circ}\text{C}$) в течение 5-10мин.

8.2. Приготовление раствора флуоресцирующих антител. Сухие флуоресцирующие иммуноглобулины растворяют в 1 мл дистиллированной воды в течение 1 – 2 минут при температуре $18 - 25^{\circ}\text{C}$, слегка встряхивая флакон. После растворения препарат можно хранить при температуре от 2 до 8°C не более 7 суток. При необходимости более длительного хранения (до 1 мес.) раствор антител разлить на мелкие аликвоты и хранить при температуре минус 20°C . Перед использованием выдержать аликвоты 5 - 10 минут при $18 - 25^{\circ}\text{C}$.

8.3. Приготовление промывающего раствора. Приготовить раствор для промывания (концентрат x 10), для чего содержимое флакона со смесью солей растворить в 100 мл дистиллированной воды. Хранить концентрат в течение 1 месяца при температуре от 2 до 8°C . Непосредственно перед проведением реакции развести концентрат в 10 раз дистиллированной водой, готовый промывающий раствор хранить при температуре от 2 до 8°C не более 7 суток.

9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

9.1. На фиксированные мазки микропипеткой наносят по 30 мкл раствора флуоресцирующих антител.

9.2. Препараты помещают во влажную камеру (чашку Петри с увлажненной ватой) при температуре 37°C не допуская высыхания нанесенного раствора антител.

9.3. Через 30 минут мазки промывают 2 раза по 5 минут в промывающем растворе и 1 раз ополаскивают дистиллированной водой.

9.4. Препараты высушивают на воздухе и просматривают под люминесцентным микроскопом с применением иммерсионного нефлуоресцирующего масла.

10. УЧЕТ И ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА

Результаты реакции в зависимости от степени яркости флуоресценции бактерий, «окрашенных» люминесцирующими иммуноглобулинами, оценивают по четырехкрестовой системе:

«4+» - сверкающая флуоресценция желтовато-зеленого цвета по периферии микробной клетки, четко контрастирующая с темным телом клетки;

«3+» - яркая флуоресценция по периферии микробной клетки;

«2+» - слабое свечение всей клетки;

«1+» - едва заметные контуры клетки.

Специфическим считается свечение с яркостью на «4+» и «3+», свечение с яркостью на «2+» или «1+» принято считать неспецифическим. Обнаружение светящегося ареола на 3+/4+ хотя бы у единичных клеток свидетельствует о наличии в исследуемом материале холерного вибриона. При сомнительном результате рекомендуется повторить исследование.

Необходимо проводить контроль иммунологической специфичности: отсутствие реакции данных препаратов с представителями других видов микроорганизмов.

ИЛЛЮСТРАЦИИ



Реакция положительная,
выявлены холерные
вибрионы O1 серогруппы



Реакция положительная,
выявлены холерные вибрионы
O139 серогруппы



Реакция отрицательная, не
выявлены холерные
вибрионы O1, O139
серогрупп

11. ОБЕЗВРЕЖИВАНИЕ

После применения Набора реагентов объекты исследования и материалы обеззараживают и утилизируют в соответствии с требованиями СП 1.3.1285-0303 «Безопасность работы с микроорганизмами I - II групп патогенности».

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

Рекламации на качество препарата в течение гарантийного срока следует направлять в адрес: 344002, г. Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, 117/40, ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора, тел./факс (863) 240-27-03; E-mail: plague@aanet.ru.

Директор ФКУЗ
«Ростовский-на-Дону
противочумный институт»
Роспотребнадзора

А.Б. Мазрухо

М.П.

Руководитель группы гибридом

Л.П. Алексеева

СОГЛАСОВАНО

Главный врач

ФГБУЗ ГИТИО ФМБА России

С.А. Богдан

2012 г.

Проконтрольовано, процифровано
и архивовано внаслідок (8) листів.

