

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

УТВЕРЖДАЮ

Руководитель организации-заявителя
Директор ФКУЗ «Ростовский-на-Дону
противочумный институт»
Роспотребнадзора



А.Б. Мазрухо
2012

ИНСТРУКЦИЯ

по применению на изделие медицинское для диагностики *in vitro*

Набор реагентов

«Иммуноглобулины моноклональные диагностические сухие
для серологической идентификации *V. cholerae* O1 и O139 (*in vitro*) методом РА
«ИГ- *V.cholerae* O1/ O139 - РА»

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 агглютинации на стекле (РА).

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.

2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

Определение серогруппы холерных вибрионов основывается на реакции агглютинации (РА) при смешивании моноклональных антител O1 и O139 с исследуемым образцом. После смешивания на предметном стекле исследуемой бактериальной культуры с иммуноглобулинами моноклональными идет 2х-фазовая серологическая реакция агглютинации. В первой фазе идет соединение антигена с моноспецифическими

иммуноглобулинами, во второй - выпадение образовавшегося комплекса антиген + иммуноглобулины (агглютината) в растворе солей (электролита). Учет реакции ведут в течение 3 мин. За положительный результат реакции принимают образование крупного или мелкозернистого агглютината с полным просветлением жидкости. Положительная реакция указывает на принадлежность исследуемой культуры холерных вибрионов к O1 или O139 серогруппе. Отрицательный результат - слабая агглютинация на фоне мутной жидкости - показатель того, что указанный штамм не относится к определяемой серогруппе (O1 или O139).

3. СОСТАВ НАБОРА И ЕГО ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. В состав набора входят:

- иммуноглобулины моноклональные диагностические холерные O1 агглютинирующие - для выявления холерных вибрионов O1 серогруппы; сухие - 1 флакон (6 мг);
- иммуноглобулины моноклональные диагностические холерные O139 агглютинирующие - для выявления холерных вибрионов O139 серогруппы; сухие - 1 флакон (6 мг).

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

3.2. Описание реагентов:

Иммуноглобулины моноклональные холерные O1 и O139 представляют собой иммуноглобулиновые фракции классов G и M, выделенные из асцитической жидкости мышей линии Balb/c; консервант - мертиолат натрия в конечной концентрации 0,01%.

Внешний вид реагентов:

Иммуноглобулины моноклональные агглютинирующие O1 и O139, сухие - представляют собой компактную массу светло-серого цвета в виде таблеток.

Регидратированные иммуноглобулины O1 и O139 - прозрачный или слегка опалесцирующий раствор светло-серого цвета.

3.3. Функциональные характеристики набора:

- один флакон набора в рабочем разведении рассчитан на серологическую идентификацию 600 штаммов холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп;
- расход рабочих растворов иммуноглобулинов O1 и O139 на одно исследование составляет 50 мкл;
- общее время проведения реакции с исследуемым образцом - не более 3 мин.

3.4. Аналитические и диагностические характеристики:

На базе музея живых культур (МЖК) ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» в 2010 г. было проведено испытание экспериментальной серии «ИГ- *V.cholerae* O1/O139 – РА». В работе было использовано 57 штаммов *V.cholerae* eltor, 29 штаммов *V.cholerae* cholerae, 29 штаммов *V.cholerae* O139, 100 штаммов *V.cholerae* неO1/неO139, выделенные в период 2002-2008гг, 7 штаммов *V.cholerae* RO, 12 штаммов *V.parahaemolyticus*, 4 штамма *E.coli*, 7 штаммов *Plesiomonas*, 108 штаммов *Aeromonas* и 30 штаммов *Comamonas*. Проверка Набора показала отсутствие перекрестных реакций с представителями близкородственных и гетерологичных микроорганизмов. Строгая специфичность «ИГ- *V.cholerae* O1/O139 – РА» в отношении соответствующих им *V.cholerae* O1 и O139 серогрупп позволяет исключить предусмотренную МУК 4.2.2218-07 "Лабораторная диагностика холеры" постановку развернутой реакции агглютинации, что экономически выгодно и существенно сокращает временные затраты. В соответствии с МУК 4.2.2218-07 «ИГ- *V.cholerae* O1/O139 – РА» аналогично коммерческой агглютинирующей сыворотке-O1 лошадиного происхождения могут быть использованы 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 «Правил 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 диагностике *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 O 139 при постановке реакции агглютинации с контрольными штаммами.

Контрольные штаммы: *V. cholerae* O1 серогруппы: *V.cholerae cholerae* 1395 (Огава), *V.cholerae cholerae* 569В (Инаба), *V.cholerae eltor* 13020 (Инаба), *V.cholerae eltor* 12214 (Огава), *V.cholerae* O139 серогруппы: *V.cholerae* P-16077, ctx⁺, *V.cholerae* P-17915, ctx⁻, а также *V. cholerae* O22, *V. cholerae* RO CA385, *V. parahaemolyticus* ATCC 17802 и *E.coli* 18 находятся в коллекции МЖК ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт». Постановку проводят в соответствии с инструкцией по применению иммуноглобулинов моноклональных холерных O1 и O 139.

При учете результатов должно быть установлено следующее:

- иммуноглобулины O1 должны агглютинировать 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 агглютинировать *V. cholerae* O139 P-16077, ctx⁺, и P-17915 ctx⁻, близкородственные *V. cholerae* O22, *V. cholerae* RO CA 385 и гетерологичные *V. parahaemolyticus* ATCC 17802 и *E.coli* 18;

- иммуноглобулины O139 должны агглютинировать *V. cholerae* O139 P-16077, ctx⁺, и P-17915, ctx⁻;

- иммуноглобулины O139 не должны агглютинировать *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 O 139 с представителями других видов микроорганизмов. Для этой цели можно использовать штаммы *V.cholerae* O1, *V.cholerae* O139 и гетерологичных микроорганизмов, находящиеся в коллекции каждой конкретной лаборатории.

5.5. Перед определением серогруппы исследуемого штамма в обязательном порядке проводят процедуру контроля на спонтанную агглютинацию - бактериальной петлей равномерно смешивают исследуемую культуру с каплей 0,9% раствора натрия

хлорида. При наличии агглютината процедуру определения серогруппы данного штамма не проводят.

6. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

Дистиллированная вода для разведения лиофилизированных иммуноглобулинов моноклональных холерных O1 и O 139;

Спирт этиловый 95°;

Предметные стекла;

Микропипетки одноканальные полуавтоматические для взятия жидкости в объеме от 20 до 200 мкл;

Наконечники к микропипеткам;

Чашки Петри;

Вата гигроскопичная;

Микробиологические петли;

Перчатки хирургические резиновые;

0,9 % раствор натрия хлорида, pH $7,2 \pm 0,1$;

0,4% агар Хоттингера или Мартена pH $7,7 \pm 0,1$;

7. ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

При исследовании поступившего материала проводят посев на питательные среды в соответствии с МУК 4.2.2218-07 «Лабораторная диагностика холеры». Культуру холерных вибрионов выращивают в течение 18-24 часов на агаре Мартена или Хоттингера, pH $7,7 \pm 0,1$ при температуре 37°C .

8. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

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

8.2. Приготовление раствора агглютинирующих антител. Сухие агглютинирующие 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 $18 - 25^{\circ}\text{C}$.

9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

9.1. На предметное стекло, помещенное в чашку Петри, наносят 1 каплю препарата иммуноглобулинов моноклональных холерных агглютинирующих до титра, указанного на флаконе, и 1 каплю 0,9% раствора натрия хлорида для контроля спонтанной агглютинации исследуемой культуры.

9.2. С агара Мартена или Хоттингера pH $7,7 \pm 0,1$ отбирают типичные колонии в S-форме. Бактериальной петлей равномерно смешивают исследуемую культуру сначала с каплей 0,9% раствора натрия хлорида (контроль культуры на спонтанную агглютинацию), затем - с иммуноглобулинами моноклональными агглютинирующими. Для ускорения выпадения агглютината рекомендуется лёгкое покачивание стекла.

10. УЧЕТ И ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА

Результаты реакции в зависимости от степени зернистости агглютинации, оценивают по четырехкрестовой системе:

- «4+» - крупно- или мелкозернистая агглютинация при полном просветлении жидкости;
- «3+» - крупно- или мелкозернистая агглютинация при легкой опалесценции жидкости;
- «2+» - слабая агглютинация; жидкость непрозрачная;
- «1+» - следы агглютинации; жидкость непрозрачная.

Реакция считается положительной при проявлении в течение 3 мин крупно- или мелкозернистого агглютината на «3+/4+», заметного на тёмном фоне.

Реакцию на «1+/2+» считают отрицательной.

Реакция считается неспецифической, если агглютинат появляется позднее, чем через 3 мин после внесения тест-культуры в каплю с агглютинирующими иммуноглобулинами или при наличии агглютината в контрольной реакции с 0,9% раствором натрия хлорида.

В контроле с 0,9% раствором натрия хлорида микробная взвесь должна быть гомогенной.

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

ПОБЕЗВРЕЖИВАНИЕ

После применения «Ш - V. cholerae O1 (O139 - РА) 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 УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ

12.1. Транспортирование Набора должно производиться всеми видами крытого транспорта в специальных транспортных термоизоляционных контейнерах или рефрижераторах при температуре от 2 до 8 °С с соблюдением санитарно-гигиенических требований и условий обеспечения сохранности продукта при транспортировке. Допускается транспортировка Набора при температуре от -9 до 25 °С в срок не более 7 суток.

12.2. Хранение Набора должно осуществляться в упаковке предприятия - производителя в сухом месте при температуре от 2 до 80С в течение всего срока годности. Замораживание компонентов набора не допускается.

12.3. Срок годности - 5 лет.

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 инсти
Роспотребнадзора

А.Б. Матрухо

M.П.

Руководитель группы гибридов

Л.И. Алексеева

СОГЛАСОВАНО

Главный врач
ФГБУЗ ГИГЭО ФМБА России
С. А. Богдан

« 1.5 » 10 2012 г.

Принципировано, принципировано
и скреплено печатью 7 (силь)
листов

Сторона Двух А.В. Мадуро

