

"УТВЕРЖДАЮ"



Директор филиала «Медгамал»
ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи»
Минздрава России

Н.Е. Филиппова

2020 г.

ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России

(Филиал «Медгамал» ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России)

123098, г. Москва, ул. Гамалеи, д. 18, тел. (499) 190-44-78, факс (499) 190-66-71

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Набора реагентов

**«Иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие
туляремийные сухие»**

по ТУ 21.20.21-023-01894956-2018

Медицинское изделие Набор реагентов «Иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие туляремийные сухие» по ТУ 21.20.21-023-01894956-2018 представляет собой меченную флуоресцеин-5-изотиоцианатом (ФИТЦ) глобулиновую фракцию, полученную из лошадиной гипериммунной туляремийной сыворотки, 5 ампул по 0,5 мл, упакованные в картонную коробку вместе с инструкцией по применению, паспортом на серию и скарификатором ампульным.

Рабочее разведение не менее 1:16. Сухой препарат - аморфная масса жёлто-оранжевого цвета: после растворения - опалесцирующая жидкость жёлто-зелёного цвета, не имеет осадка.

1. Назначение

Медицинское изделие Набор реагентов «Иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие туляремийные сухие» по ТУ 21.20.21-023-01894956-2018 (далее по тексту – набор) предназначен для качественной экспресс-индикации бактерий, возбудителей туляремии прямым иммунофлуоресцентным методом в фиксированных обезвреженных мазках (далее по тексту - мазки) из бактериальных культур (чистых и смешанных, живых или погибших бактерий), в патологическом материале от больных людей или патологоанатомическом - от трупа человека.

Возбудитель туляремии относится к γ -подклассу протобактерий, семейству *Francisellaceae*, роду *Francisella*. Туляремийный микроб представляет собой мелкие кокковидные (до эллипсовидных) плеоморфные грамотрицательные палочки, окруженные

слизистым (капсульным) веществом, неподвижные, не образующие спор. Факультативный анаэроб, но оптимальный рост наблюдается только в аэробных условиях. Температурный оптимум 36—37 °С, оптимум pH 6,8—7,4. Факультативный внутриклеточный паразит.

Набор может быть использован для качественной экспресс-индикации бактерий, возбудителей туляремии, у пациентов всех возрастных групп населения вне зависимости от популяционных и демографических аспектов.

Область применения - санитарная и клиническая микробиология, эпидемиологический мониторинг и научные исследования.

Набор предназначен для диагностики *in vitro*.

2. Показания к применению

Экспресс-диагностика инфекционных заболеваний с подозрением на туляремию у людей.

При бактериологических исследованиях набор «Иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие туляремийные сухие» используется для качественной экспресс-индикации туляремийных бактерий в фиксированных обезвреженных мазках.

3. Противопоказания

Противопоказания и ограничения к применению медицинского изделия Набор реагентов «Иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие туляремийные сухие» для экспресс-индикации бактерий, возбудителей туляремии прямым иммунофлуоресцентным методом в фиксированных обезвреженных мазках из бактериальных культур (чистых и смешанных) и в патологическом материале от людей отсутствуют.

4. Характеристика набора

4.1. Принцип метода

На фиксированный тонкий мазок исследуемого материала наносят каплю флуоресцирующих иммуноглобулинов в рабочем разведении, затем предметное стекло отмывают и микроскопируют в падающем свете люминесцентного микроскопа.

В случае нахождения в исследуемом материале бактериальных клеток возбудителя, они специфически связываются с иммуноглобулинами, меченными флуоресцирующим красителем и в падающем свете люминесцентного микроскопа после отмывки мазка наблюдается флуоресценция бактерий. В случае отсутствия в исследуемом материале бактериальных клеток возбудителя комплекс не связывается, флуоресценция отсутствует.

4.2. Состав набора

В состав набора входят следующие компоненты, упакованные в коробку:

Компонент	Описание	Количество
Иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие туляремийные сухие	Аморфная масса жёлто-оранжевого цвета	5 ампул по 0,5 мл

Один набор рассчитан на проведение не менее 200 анализов, (при рабочем разведении препарата не менее 1:16).

4.3 Комплектность.

В комплект поставки набора входят: набор реагентов, принадлежность - скарификатор ампульный, инструкция по применению, паспорт на поставляемую серию набора.

5. Аналитические и диагностические характеристики набора

5.1. Минимальная аналитическая чувствительность набора, определенная по мазкам с взвесями разной концентрации туляремийного микроба, составляет от 1×10^3 до 1×10^4 м.к./мл.

Аналитическая специфичность набора, определенная по мазкам с взвесями *B. abortus* 19ВА, *Y. enterocolitica* ОЗ №134, *E. coli* №О-111, *S. typhimurium* №5710, *V. cholerae* О1 №569В, составляет 100 %. Перекрестные реакции при исследовании указанных мазков отсутствуют.

Диагностическая чувствительность набора, определенная по мазкам с взвесями разной концентрации туляремийного микроба, составляет от 1×10^5 до 1×10^6 м.к./мл.

Данные по использованию набора у лиц с нарушением иммунного статуса (СПИД и другие иммунодефициты, сывороточная болезнь, парапротеинемические лейкозы) отсутствуют.

Данные по каким-либо факторам риска обнаружения возбудителя в исследуемом материале при соблюдении требований инструкции по применению отсутствуют.

5.2 Лабораторный контроль качества набора заключается в проверке соответствия его технических характеристик данным, указанным в паспорте на серию. Контроль проводится визуально в соответствии с инструкцией по применению.

6. Меры предосторожности при работе с набором

Набор может быть использован к применению персоналом клинико-диагностических лабораторий, имеющих разрешение для работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности). Класс образующихся отходов в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 при утилизации набора – класс В.

К работе с набором допускаются только специалисты соответствующие требованиям СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней», с высшим и

средним медицинским, биологическим, ветеринарным образованием, окончившие соответствующие курсы профессиональной подготовки с освоением методов безопасной работы с ПБА III-IV групп, не имеющие противопоказаний к применению средств профилактики и лечения и к работе в средствах индивидуальной защиты.

Компоненты набора реагентов не содержат инфекционного материала, но при обследовании фиксированных обезвреженных мазков клинических материалов необходимо соблюдать меры предосторожности и обращаться с исследуемыми образцами, растворами, а также с оборудованием и материалами, находящимися с ними в контакте, как с потенциально инфекционными в соответствии с Санитарными правилами СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

- Работать в лаборатории в соответствии с требованиями ГОСТ Р 52905-2007 «Лаборатории медицинские. Требования безопасности»;

- Работу с биологическим материалом от животных и людей при подозрении на выявление микроорганизмов II группы патогенности, связанную с приготовлением фиксированных обезвреженных мазков проводят в лабораториях учреждений, имеющих разрешение на работу в соответствии с Санитарными правилами СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I - II групп патогенности (опасности)»;

- Не пипетировать растворы ртом, использовать дозирующие устройства;

- Предметные стекла с обезвреженными мазками, обработанные фиксатором и реагентами из набора, в дальнейшем подлежат обеззараживанию согласно Приложению 2 СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

- Все отработанные растворы и отходы после завершения анализа обрабатывать в соответствии с установленными нормами безопасности;

- Все твердые отходы сбрасывать в специальный контейнер с пломбируемой крышкой и затем подвергать автоклавированию в течение 60 мин при +132 °С или сжигать;

- Инструменты и оборудование до и после работы протирать 70 %-м раствором этилового спирта или соответствующим дезинфицирующим раствором;

- Утилизировать отходы, соблюдая законодательство по охране окружающей среды.

7. Оборудование и материалы, необходимые для проведения анализа

- дистиллированная вода;
- раствор натрия хлорида 0,9 %, pH 7,2-7,4;
- пипетки одноканальные автоматические со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкостей от 0,01 мл до 5,0 мл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 3 %);
- стаканы стеклянные объемом 100-150 мл - 2 шт для отмывания мазков;
- пробирка с резиновой пробкой для хранения предварительного раствора иммуноглобулинов;
- емкость для приготовления рабочего раствора иммуноглобулинов (10 – 200 мл);
- спирт этиловый 96%;
- вата стерильная;
- салфетки марлевые стерильные;
- люминесцентный микроскоп;
- масло иммерсионное нефлуоресцирующее;
- влажная камера;
- корундовый карандаш;
- дезинфицирующие растворы, соответствующие санитарным требованиям;
- резиновые перчатки;
- контейнер для сброса твердых отходов;
- контейнер для слива использованных жидкостей;
- автоклав для инактивации отходов;
- фильтровальная бумага.

8. Анализируемые образцы

Фиксированные обезвреженные мазки, подготовленные согласно СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I - II групп патогенности (опасности)».

ВНИМАНИЕ!

Нельзя использовать компоненты из наборов разных серий или смешивать их в процессе приготовления растворов!

После вскрытия первичной упаковки набор хранению не подлежит. Хранение возможно только в виде предварительного раствора (см. Таблицу 1).

Набор реагентов «Имуноглобулины диагностические флуоресцирующие тулярийные сухие» по ТУ 21.20.21-023-01894956-2018 является нестерильным и не требует стерилизации перед использованием.

9. Приготовление компонентов

9.1 Приготовление предварительного раствора иммуноглобулинов.

Содержимое одной ампулы (0,5 мл иммуноглобулинов диагностических флуоресцирующих туляремийных сухих) растворяют в 0,5 мл дистиллированной воды. После растворения препарат можно хранить в пробирке с резиновой пробкой при температуре +2 °С до +8 °С не более 14 суток.

9.2 Приготовление рабочего раствора иммуноглобулинов

Рабочий раствор иммуноглобулинов диагностических флуоресцирующих туляремийных сухих готовят непосредственно перед нанесением на мазок.

Для этого предварительный раствор иммуноглобулинов необходимо развести 0,9 % раствором натрия хлорида в соответствии с указанным на этикетке рабочим разведением с учетом предварительного растворения препарата.

Например, для подготовки рабочего раствора 0,1 мл предварительного раствора иммуноглобулинов диагностических флуоресцирующих туляремийных сухих с рабочим разведением 1:16 необходимо развести в 16 раз, т.е. добавить 1,5 мл 0,9 % раствора натрия хлорида.

Внимание! Рабочий раствор хранению не подлежит!

Условия и сроки хранения приготовленных компонентов набора после даты вскрытия индивидуальной упаковки приведены в Таблице № 1:

Таблица № 1

Подготовленный компонент набора	Условия хранения	Срок хранения
Иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие туляремийные сухие – <u>предварительный раствор 1:1</u> (дистиллированная вода)	От +2 °С до +8 °С в плотно закрытой пробирке с резиновой пробкой	Не более 14 суток
Иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие туляремийные сухие – <u>рабочий раствор не менее 1:16</u> (0,9% раствор натрия хлорида)	-	Хранению не подлежит!

9.3 Приготовление препаратов для люминесцентной микроскопии.

Фиксированные обезвреженные мазки готовят в организациях, имеющих разрешение на работу с микроорганизмами II группы патогенности согласно СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I - II групп патогенности (опасности)».

Мазки наносят тонким слоем на обезжиренные стёкла по 3 из каждого объекта исследования.

Мазки-отпечатки из органов делают, прикладывая предметное стекло к поверхности свежего среза исследуемого органа. Наличие на предметных стёклах кусочков тканей и органов недопустимо.

Затем мазки подсушивают на воздухе, фиксируют 96 ° этиловым спиртом в течение 20 мин и вновь подсушивают на воздухе. В процессе фиксации не допускается слипания между собой предметных стёкол.

Внимание! Не допускается использовать восковые карандаши.

Подготовленные мазки до обработки их люминесцирующей сывороткой хранить при температуре + 4 °С.

10. Проведение анализа

10.1 Методика окраски мазков флуоресцирующими иммуноглобулинами.

На фиксированные мазки наносят каплю флуоресцирующих иммуноглобулинов в рабочем разведении и помещают во влажную камеру (например, чашки Петри с увлажненной фильтровальной бумагой или ватой). Через 20-25 мин предметные стёкла ополаскивают дистиллированной водой, промывают в течение 5 мин, опустив стёкла вертикально в емкость с 0,9 % раствором натрия хлорида, вновь ополаскивают водой дистиллированной и сушат на воздухе до полного высыхания.

11. Регистрация и интерпретация результатов

11.1 Фиксированные обезвреженные мазки микроскопируют в падающем свете люминесцентного микроскопа под иммерсионным объективом, применяя иммерсионное нефлуоресцирующее масло ($nD^{20}=1,515\pm0,002$) или под водной иммерсией. Для получения наиболее яркого свечения бактерий осветительную систему микроскопа тщательно центрируют. Наблюдения проводят при окулярах 5х, 7х, 10х. Длина волны возбуждающего света 340-360 нм. Длина волны люминесценции 400-440 нм. Цвет люминесценции жёлто-зелёный.

11.2 Степень яркости флуоресценции бактерий, «окрашенных» флуоресцирующими иммуноглобулинами, принято обозначать по четырёхкрестовой системе:

Учитываемый результат	Описание
4 креста + + + +	сверкающая флуоресценция жёлто-зелёного цвета оболочки микробной клетки, чётко контрастирующая с тёмным телом клетки
3 креста + + +	яркая флуоресценция жёлто-зелёного цвета оболочки микробной клетки
2 креста и 1 крест + + и +	слабое свечение всей клетки

11.3. **Специфическим** считается свечение не менее 5-10 клеток с яркостью на 3 или 4 креста. Обнаружение при просмотре 30 и более полей зрения хотя бы единичных, специфически светящихся бактериальных клеток, даёт основание для положительного ответа.

Неспецифическим считается свечение с яркостью на 1 или 2 креста и учитывается как отрицательный результат. Отрицательный результат свидетельствует о полном отсутствии возбудителя туляремии, или о содержании его в исследуемом материале в низкой концентрации, не выявляемой иммунофлуоресцентным методом при прямом исследовании пробы без обогащения или подращивания.

11.4. Выявление в фиксированных обезвреженных мазках исследуемого материала возбудителя в сочетании с анализом эпиданамнеза и клинических проявлений является окончательным результатом при диагностике этой инфекции.

12. Условия хранения и эксплуатации набора

Набор транспортируют и хранят в соответствии с СП 3.3.2.3332-16 при температуре от +2 °С до +8 °С, в условиях нормальной влажности и отсутствия освещения. Допускается транспортирование при температуре от + 10 °С до + 25 °С в течение не более 7 суток. В случае нарушения условий транспортирования и хранения набор применению не подлежит.

При получении набора следует внимательно осмотреть упаковку. При наличии любых следов неправильного обращения или повреждения упаковки, набор применению не подлежит.

Медицинское изделие не требует технического обслуживания, монтажа, наладки, настройки, калибровки и прочих операций, необходимых для ввода МИ в эксплуатацию, не содержит рисков, связанных с установкой и калибровкой.

После вскрытия первичной упаковки набор хранению не подлежит. Хранение возможно только в виде предварительного раствора (см. Таблицу 1).

Условия отпуска: для диагностики *in vitro* в специализированных лабораториях, осуществляющих диагностические, мониторинговые и научные исследования с возбудителями опасных инфекционных болезней.

Рекламации на качество набора необходимо направлять в ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России (Филиал «Медгамал» ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России), Россия, 123098, г. Москва, ул. Гамалеи, д. 18, тел. (499)193-30-50, (499)190-44-59, факс (499)190-66-71.

13. Срок годности

Срок годности набора 5 лет. Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит.

Прошито и пронумеровано и скреплено

печатью 8 (восемь) листа(ов).

Должность Директор филиала «Медгамал»

ФИО Филиппова Наталья Евгеньевна

Подпись Наталья

« 16 » апреля 20 20 года

