

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от _____ 20 ____ г. № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ФГУП «НПО «Микроген»

Минздрава России

В.Ф. Руденко

«22» 03 2013 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

**«Диагностикумы эритроцитарные шигеллезные Флекснера 1-5 и
Зонне антигенные, жидкие»****1. НАЗНАЧЕНИЕ**

Набор реагентов предназначен для выявления специфических антител к различным видам шигелл в сыворотке крови человека в реакции пассивной гемагглютинации (РПГА).

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА**2.1. Принцип метода.**

Действующим началом диагностикумов являются специфические антигены шигелл, фиксированные на поверхности эритроцитов. При взаимодействии с сыворотками, содержащими антитела к шигеллам, наблюдается феномен агглютинации эритроцитов.

2.2. Состав набора.

Реагенты	Количество
1	2
Диагностикум эритроцитарный шигеллезный Флекснера 1-5 получен путем сенсibilизации эритроцитов смесью антигенов шигелл Флекснера-подтипов 1а, 1в, 2а, 3а, 4в и 5 или Диагностикум эритроцитарный шигеллезный Зонне получен путем сенсibilизации эритроцитов моноантигенами из шигелл Зоне. Представляют собой 1 % взвесь формализированных эритроцитов барана сенсibilизированных липополисахаридными антигенами из шигелл в фосфатном буферном растворе (рН- 7,2 ± 0,2; концентрация – 0,06 моль/л). Консервант – формалин. Гомогенная суспензия коричневого цвета без хлопьев; при отстаивании образуется 2 слоя: плотный коричневый осадок эритроцитов и прозрачная желтоватая надосадочная жидкость.	1 флакон– 3 мл
Сыворотки диагностические шигеллезные (Флекснера 1-5 или Зонне) неадсорбированные сухие - гомогенная масса от белого с коричневатым оттенком до бежевого цвета.	1 флакон- из 0,1 мл

1 % взвесь формализированных, несенсибилизированных эритроцитов барана - гомогенная суспензия коричневого цвета без хлопьев; при отстаивании образуется 2 слоя: плотный коричневый осадок эритроцитов и прозрачная желтоватая надосадочная жидкость.	1 флакон – 1 мл
Поддерживающий раствор - 0,9 % раствор натрия хлорида – прозрачная бесцветная жидкость, рН от 6,5 до 7,5.	2 флакона – по 8 мл
Планшет круглодонный для иммунологических реакций однократного применения - состоит из 8 рядов, каждый из которых включает в себя 12 лунок с прозрачным, бесцветным, круглым дном.	1 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.

Диагностикумы должны агглютинироваться сыворотками диагностическими шигеллезными (Флекснера 1-5 или Зонне) неадсорбированными сухими в РПГА в разведении не ниже, чем $\frac{1}{2}$ их специфического титра, но не ниже, чем 1:6400; не должны агглютинироваться в РПГА гетерологичными шигеллезными сыворотками в разведении, превышающем $\frac{1}{8}$ титра специфической активности.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Входящая в состав набора сыворотка диагностическая шигеллезная (Флекснера 1-5 или Зонне) неадсорбированная сухая инактивирована.

Анализируемые сыворотки должны быть инактивированы при температуре 56 °С в течение 30 минут.

Анализируемые сыворотки, а также находящиеся с ними в контакте реагенты, оборудование и инструменты, могут представлять собой потенциально инфекционный материал, и обращаться с ним следует осторожно:

- работать в резиновых перчатках;
- при пипетировании необходимо пользоваться резиновыми грушами или автоматическими устройствами;
- при завершении работы анализируемые сыворотки и находящиеся с ними в контакте реагенты, инструменты подвергать обработке дезинфицирующим раствором;
- оборудование до и после работы протирать 96 % этиловым спиртом.

Объективные результаты анализа гарантируются при выполнении следующих условий:

- хранение всех реагентов набора осуществлять при температуре от 2 до 8 °С;
- не использовать реагенты с истекшим сроком годности;
- не использовать реагенты набора при отсутствии на их упаковке соответствующей маркировки;
- для проведения РПГА использовать реагенты, входящие только в данный набор.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- растворы для обеззараживания;
- резиновые перчатки;
- спирт этиловый;
- микропипетки с одноразовыми наконечниками и пипетки для внесения жидкостей;
- термостат на 37 °С;
- контейнер для слива обеззараженных анализируемых сывороток и реагентов;
- контейнер для твердых отходов.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

В качестве анализируемых образцов используют образцы сыворотки крови человека.

Анализируемый образец хранят в условиях, предотвращающих бактериальный пророст при температуре от 2 до 8 °С не более 72 часов. Допускается замораживание, замороженные анализируемые образцы перед исследованием разморозить при комнатной температуре.

Анализ образцов с выраженным гемолизом, бактериальным проростом, а также длительно хранившихся без замораживания или повторно замораживаемых не допускается.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА.

7.1. Приготовление растворов для РПГА.

7.1.1. Флакон с сывороткой диагностической шигеллезной (Флекснера 1-5 или Зонне) неадсорбированной сухой вскрыть и добавить 1 мл прилагаемого 0,9 % раствора натрия хлорида, получив, таким образом, разведение 1:10. Разведение 1:100 готовить в первой лунке прилагаемого планшета: к 0,09 мл 0,9 % раствора натрия хлорида добавить 0,01 мл сыворотки диагностической шигеллезной, разведенной 1:10.

Вскрытый флакон с сывороткой диагностической шигеллезной (Флекснера 1-5 или Зонне) неадсорбированной сухой при разведении 1:10 в закрытом виде можно хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение одного месяца.

7.1.2. Диагностикум готов к применению. Перед вскрытием флакон с диагностикумом необходимо осторожно встряхнуть до получения гомогенной суспензии. В ходе работы встряхивание рекомендуется повторять.

Вскрытый флакон с диагностикумом в закрытом виде можно хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение одного месяца.

7.1.3. 0,9 % раствор натрия хлорида. Готов к применению.

7.2. Проведение РПГА.

При контроле любого количества анализируемых сывороток обязательна постановка

1 ряда агглютинации с сывороткой диагностической шигеллезной (Флекснера 1-5 или Зонне) неадсорбированной сухой.

Для постановки РПГА используют планшет для иммунологических реакций однократного применения. Готовят двукратные серийные разведения анализируемых сывороток в 0,05 мл прилагаемого 0,9 % раствора натрия хлорида начиная с 1:10 до 1:2560 и 1 ряд двукратного серийного разведения сыворотки диагностической шигеллезной (Флекснера 1-5 или Зонне) неадсорбированной сухой, начиная с разведения 1:100, до удвоенного титра, указанного на этикетке флакона.

В каждую из лунок с разведениями сывороток прибавляют по 0,025 мл диагностикума.

Обязательными контролями являются:

1. Контроль сыворотки диагностической шигеллезной (Флекснера 1-5 или Зонне) неадсорбированной сухой в разведении 1:100; контроль анализируемой сыворотки в разведении 1:10, для чего в 2 лунки вносят по 0,05 мл каждой из сывороток.

2. Проверка отсутствия спонтанной агглютинации диагностикума, для чего в 2 лунки, содержащие 0,05 мл 0,9 % раствора натрия хлорида, добавляют по 0,025 мл диагностикума;

3. Контроль на отсутствие в анализируемых сыворотках агглютининов к эритроцитам барана, для чего в 2 лунки вносят по 0,05 мл анализируемой сыворотки в разведении 1:10 добавляют по 0,025 мл 1 % взвеси несенсибилизированных формализированных эритроцитов барана (контрольные эритроциты).

Планшет встряхивают и помещают на 2-2,5 ч в термостат при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$, после чего проводят учет результатов.

8. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. Учет реакции производится по четырехкрестной системе:

++++ - все эритроциты агглютинированы и равномерно покрывают дно лунки;

+++ - агглютинированы почти все эритроциты. На их фоне имеется малозаметное кольцо из осевших неагглютинированных эритроцитов;

++ - наряду с равномерным агглютинатом на дне лунки имеется осадок из неагглютинированных эритроцитов в виде маленького «колечка» или «пуговки»;

+ - большинство эритроцитов неагглютинировано и осело в виде маленького «колечка» с ровными краями или «пуговки» в центре дна лунки.

Положительной считается реакция не менее чем на 3+.

Результаты, полученные в РПГА можно считать достоверными в том случае, если сывороткой диагностической шигеллезной (Флекснера 1-5 или Зонне) неадсорбированной

сухой 1:100 получен положительный результат в разведении не ниже чем $\frac{1}{2}$ ее титра, а в 2 лунках с анализируемой сывороткой в разведении 1:10, а с сывороткой диагностической шигеллезной (Флекснера 1-5 или Зонне) неадсорбированной сухой в разведении 1:100 не должно быть хлопьев и осадка; в лунках с 0,9% раствором натрия хлорида и диагностикумом, а также с несенсибилизированными формализированными эритроцитами барана и анализируемой сывороткой – реакция отрицательная.

Титром антител исследуемой сыворотки считается последнее разведение сыворотки, которая еще дает положительную агглютинацию эритроцитов.

8.2. Интерпретация результатов.

Диагностически достоверным является увеличение (или падение) титров специфических антител на три разведения при исследовании парных сывороток в динамике заболевания.

9. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА.

Хранение набора реагентов в упаковке производителя должно осуществляться при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности. Транспортирование должно производиться всеми видами крытого транспорта при температуре от 2 до 8 °С. Допускается кратковременное (в течение 7 сут) транспортирование при температуре от 9 до 25 °С.

Срок годности 18 месяцев.

Рекламации на качество набора реагентов в течение срока годности с обязательным указанием номера серии и даты изготовления следует направлять в адрес предприятия – производителя: ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России, Россия, 115088, г. Москва, ул. 1-ая Дубровская, д. 15, тел. (495) 710-37-87.

Адрес производства: Россия, 614089, Пермский край, г. Пермь, ул. Братская, д. 177, тел. (342) 281-94-96.

Прошито, пронумеровано и
скреплено печатью
5 листа(ов)

ГЕНЕРАЛЬНЫЙ ДИРЕКТОР
ФГУП «НПО «МИКРОГЕН»
МИНЗДРАВА РОССИИ
В. Ф. РУДЕНКО