

ВЕРЖДЕНА

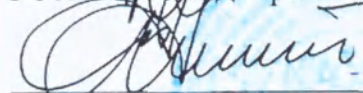
«УТВЕРЖДАЮ»

иказом Росздравнадзора
03.08. 2011 г. № 4777-Пр11

Директор ~~ФГУЗ Волгоградский научно-исследовательский~~

~~ФГУЗ ВолгоградНИИПЧИ~~

~~Роспотребнадзора~~



В.А. Антонов

В.В. Алексеев

07.02. 2011 г.

М.п.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Набор реагентов

Диагностикум эритроцитарный сапной и мелиоидозный
иммуноглобулиновый сухой

Диагностикум эритроцитарный сапной и мелиоидозный
иммуноглобулиновый сухой представляет собой лиофилизат
формалинизированных танизированных эритроцитов барана,
сенсibilизированных иммуноглобулинами сапной агглютинирующей сыворотки.

Диагностикум эритроцитарный сапной и мелиоидозный
иммуноглобулиновый выявляет в РНГА *Burkholderia mallei* и *Burkholderia*
pseudomallei в концентрации $1,56 \times 10^6$ м.к./мл макрометодом и $3,12 \times 10^6$
м.к./мл микрометодом.

ОПИСАНИЕ

Аморфная масса коричневого цвета. После растворения – гомогенная взвесь
коричневого цвета. При стоянии 2-3 ч образуются 2 слоя: прозрачная бесцветная
надосадочная жидкость и осадок коричневого цвета, разбивающийся при
встряхивании.

НАЗНАЧЕНИЕ

Индикация и идентификация возбудителей сапа и мелиоидоза в
биологическом материале, объектах внешней среды и чистых культурах в реакции
непрямой гемагглютинации.

Взамен утвержденной 09.08.2006 г. № 01-11/162-06.

СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ

1. Подготовка материала для исследования:

Подлежащие идентификации микроорганизмы засевают петлей на обогащенный в пробирках агар Хоттингера с 5 % глицерина pH $6,8 \pm 0,1$ и инкубируют при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 1 сут. Из выращенных культур готовят взвесь, соответствующую 10 МЕ по стандартному образцу чистоты ГИСК им. Л.А.Тарасевича ОСО 42-28-85П, эквивалентной концентрации $1 \cdot 10^9$ м.к./мл. Бактерии инактивируют добавлением формалина до 4 % с экспозицией 12 ч или 4 % с экспозицией 1 ч или автоклавированием при температуре 120°C в течение 30 мин. Затем приготовленную микробную взвесь разводят до концентрации $1 \cdot 10^8$ м.к./мл и исследуют в РНГА.

Суспензии органов и тканей животных тщательно растирают в ступке. Образцы измельченных органов и тканей переводят в жидкую фазу, добавляя 10-кратный по отношению к массе исследуемого материала объем 0,9 % раствора натрия хлорида с 4 % формалина. Исследуемый материал выдерживают не менее 12 ч при температуре $(22 \pm 4)^\circ\text{C}$. Смывы с поверхностей объектов внешней среды проводят марлевым тампоном в пробирку с 3 мл 0,9 % натрия хлорида pH $(7,1 \pm 0,1)$. К смывам с поверхностей объектов внешней среды, а так- же к мерному количеству воды (из открытых водоемов, луж, бочек и т.п.) добавляют формалин до конечной концентрации 4 %, пробу выдерживают 12 ч при температуре $(22 \pm 4)^\circ\text{C}$.

Все исследуемые образцы проб биологического материала и объектов внешней среды адсорбируют добавлением 50 % взвеси формализированных эритроцитов из расчета 0,1 мл на 1 мл пробы, инкубируя смесь 30 мин при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ или 1-2 ч при температуре $(22 \pm 2)^\circ\text{C}$. После центрифугирования проб при 1000 об/мин в течение 3-5 мин надосадочную жидкость исследуют в РНГА.

2. Приготовление ингредиентов для РНГА и РТНГА.

2.1. Для проведения серологических реакций макрометодом используют диагностикум 2,5 % концентрации. Для этого содержимое ампулы с препаратом растворяют в 4,0 мл 0,9 % раствора натрия хлорида pH $(7,2 \pm 0,2)$ с 1 % формалина. Для микрометода используют диагностикум 1 % концентрации. Для этого содержимое ампулы растворяют в 10 мл этого же раствора.

Перед проведением реакции диагностикум тщательно встряхивают до образования равномерной взвеси. При наличии неразбивающихся частиц диагностикум непригоден для работы. Для полной регидратации и стабилизации эритроцитов рекомендуется сухой препарат растворять за 3-6 ч до постановки реакции. Жидкий диагностикум сохраняет активность до 5 дней хранения при температуре $(6 \pm 2)^\circ\text{C}$.

2.2. Прилагаемую взвесь инактивированной культуры сапного микроба $1 \cdot 10^9$ м.к./мл разводят 0,9 % раствором натрия хлорида в 10 раз, получают концентрацию $1 \cdot 10^8$ м.к./мл и используют для положительного контроля.

2.3. Сыворотку сапную агглютинирующую 1:10 дополнительно разводят в 10 раз, получают разведение 1:250-1:500 и используют для реакции агглютинации.

2.4. Приготовление разводящей жидкости.

Нормальную кроличью сыворотку (НКС) разводят 0,15 М раствором хлорида с 1% формалина в 100 раз, получают 1 % раствор.

2.5. Ингредиенты в рабочих разведениях пригодны к применению в течение 10 дней при хранении их при температуре $(6 \pm 2) ^\circ\text{C}$.

3. Проведение иммунологических реакций.

РНГА (макрометод). В 12 лунок полистироловой пластины с помощью пипетки вместимостью 1,0 или 2,0 мл вносят по 0,5 мл 1 % раствора НКС. В первую лунку добавляют 0,5 мл исследуемого инактивированного материала, размешивают содержимое лунки и делают последовательные двукратные разведения переносом по 0,5 мл из одной лунки в другую по 10 лунку включительно, из которой 0,5 мл удаляют. 11 лунка – контроль диагностикума, 12 лунка – положительный контроль (добавляют 0,5 мл взвеси убитой культуры сапного микроба в концентрации $1 \cdot 10^8$ м.к./мл). Затем в каждую лунку пипеткой вносят по одной капле (0,05 мл) 2,5 % взвеси диагностикума эритроцитарного сапного и мелиоидозного иммуноглобулинового. Пластины аккуратно встряхивают и оставляют до учета результатов на 18-24 ч при температуре $(2 \pm 2) ^\circ\text{C}$.

РНГА (микрометод). В 9 лунок микротитровальных пластин пипеткой-капельницей вносят по 2 капли или дозатором по 0,05 мл 1 % раствора инактивированной НКС. В первую лунку добавляют 0,05 мл исследуемого инактивированного материала и делают последовательные двукратные разведения переносом по 0,05 мл (иглой микротитратора или микропипеткой) из одной лунки в другую по 7 лунку включительно, из которой 0,05 мл удаляют. Иглу микротитратора после исследования обжигают и остужают. 8 лунка – контроль диагностикума, 9 лунка – положительный контроль (добавляют 0,05 мл взвеси убитой культуры сапного микроба в концентрации $1 \cdot 10^8$ м.к./мл). Затем во все лунки добавляют по 0,025 мл диагностикума эритроцитарного сапного и мелиоидозного иммуноглобулинового 1 % концентрации и пластины оставляют на 2-3 ч при температуре $(22 \pm 4) ^\circ\text{C}$, после чего учитывают результат.

РТНГА (макрометод). Для подтверждения специфичности РНГА ставят реакцию торможения – РТНГА. В 12 лунок пластины вносят по 0,5 мл 1 % раствора инактивированной НКС. В первую лунку добавляют 0,5 мл исследуемого материала и делают последовательные двукратные разведения, как при постановке РНГА. Затем во все лунки добавляют по 1 капле сыворотки сапной агглютинирующей, разведенной 1:250-1:500. Смесь оставляют на 30 мин при температуре $(37 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$ или на 1 ч при температуре $(22 \pm 4) ^\circ\text{C}$, после чего во все лунки добавляют по 0,05 мл диагностикума. Учет результатов проводят через 2-3 ч. Если РТНГА подтверждает положительный результат РНГА, то склеивание эритроцитов будет отмечено в меньшем числе лунок (на 4-5 лунок), чем это имело место в РНГА. РНГА и РТНГА целесообразно ставить одновременно.

РТНГА (микрометод). В 9 лунок микротитровальных пластин вносят по 25 мл 1 % раствора инаktivированной НКС. Затем в 1 лунку добавляют 0,025 исследуемого материала и иглой микротитратора, имеющей головку на 0,025, делают последовательные двукратные разведения, как при постановке РНГА. Шпатель микротитратора после исследования обжигают и остужают. После этого во все лунки пипеткой-капельницей добавляют по 0,025 мл сыворотки сапной агглютинирующей в разведении 1:250-1:500. Пластинки оставляют на 30 мин при температуре $(37 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$ или на 1 ч при температуре $(22 \pm 4) ^\circ\text{C}$, затем во все лунки пипеткой-капельницей добавляют по 0,025 мл диагностикума 1 % концентрации, пластину встряхивают и оставляют при температуре $(22 \pm 4) ^\circ\text{C}$. Учет результатов проводят через 2-3 ч. Если РТНГА подтверждает положительный результат РНГА, то склеивание эритроцитов будет отмечено в меньшем числе лунок (на 4-5 лунок), чем это имело место в РНГА. РНГА и РТНГА целесообразно ставить одновременно.

УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Учет результатов проводят: предварительный - через 2-3 ч, окончательный - через 18-24 ч.

Результат РНГА считают положительным, когда эритроциты выпадают на дно лунки равномерным слоем, в виде зонтика, занимая не менее $\frac{2}{3}$ диаметра сферической поверхности в лунке (в ряде случаев отмечается фестончатое оплывание краев агглютината).

Результат считают отрицательным, когда эритроциты выпадают на дно лунки в виде "пуговки" или колечка с ровным краем разной величины.

В лунке контроль диагностикума - результат должен быть отрицательным.

Результаты РНГА учитывают при наличии четких контролей. Титром реакции считают лунку с максимальным разведением исследуемого материала, в которой зарегистрирован положительный результат.

РНГА считают специфичной в тех случаях, когда в РТНГА число лунок с положительной гемагглютинацией сократилось не менее, чем на 4 - 5 лунок.

БЕЗОПАСНОСТЬ

Работу проводят в соответствии с СП 1.3.1285-03 "Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)".

ФОРМА ВЫПУСКА

Диагностикум эритроцитарный сапной и мелиоидозный иммуноглобулиновый сухой 1 мл (10 %) - 5 ампул.

Эритроциты барана формализированные 50 % жидкие 1 мл - 2 ампулы.

Взвесь инаktivированной культуры сапного микроба, концентрация $1 \cdot 10^9$ м.к./мл 1 мл - 1 ампула.

Сыворотка сапная агглютинирующая сухая 1:10 1 мл – 1 ампула.

Сыворотка нормальная кроличья сухая 1 мл – 1 ампула.

В каждую пачку вкладывают инструкцию по применению и ампульный нож.

СРОК ГОДНОСТИ, УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

Срок годности – 2 года. Препарат с истекшим сроком годности применению подлежит.

Хранить препарат следует в соответствии с СП 3.3.2.1248-03 при температуре 2 до 8 °С.

Транспортирование в соответствии с СП 3.3.2.1248-03 при температуре от 2 до 10 °С. Допускается транспортирование при температуре не выше 25 °С не более суток.

Рекламации на качество препарата следует направлять в ~~ФГБУ «ГИСК им. А.Тарасевича» Минздравсоцразвития России (119002, г. Москва, Сивцев Вражек, 41, тел. (495) 241-39-22 и институт-изготовитель – ФГУЗ~~ *Владимирский научно-исследовательский вирусологический институт* ~~ФГУЗ~~ *ФЖУЗ* ~~ВолгоградНИПЧИ Роспотребнадзора (400131, г. Волгоград, ул. Голубинская, 7, тел. (8442)37-37-74).~~

