

«СОГЛАСОВАНО»

**Директор
ФГБНУ НИИВС**

им. И.И. Мечникова


« 18 » 03

О.А. Свитич

2020 г.



«УТВЕРЖДАЮ»

Начальник Управления

регистрации

и медицинских исследований

АО «НПО «Микроген»


« 22 » 03

А.Е. Бршов

2019 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению медицинского изделия

Иммуноглобулин диагностический оспенный люминесцирующий сухой

по ТУ 21.20.21-063-20401675-2019

Регистрационное удостоверение № ФСР 2009/04192

НАЗНАЧЕНИЕ

Изделие для диагностики *in vitro* «Иммуноглобулин диагностический оспенный люминесцирующий сухой» предназначено для выявления и идентификации ортопоксвирусов в содержимом кожных высыпаний от лиц, подозрительных на заболевания оспенной этиологии.

Функциональное назначение - вспомогательное средство в диагностике оспы.

Показания к применению изделия в соответствии с его назначением.

Противопоказания при применении изделия согласно инструкции – отсутствуют.

ХАРАКТЕРИСТИКА ИЗДЕЛИЯ

Состав изделия.

Иммуноглобулин диагностический оспенный 5 ампул, лиофилизат из 0,5 мл
люминесцирующий сухой

Комплектация: компоненты изделия (Иммуноглобулин диагностический оспенный люминесцирующий сухой, 5 ампул, лиофилизат из 0,5 мл) в пачке картонной с инструкцией по применению, паспорт (в комплекте поставки).

Характеристика компонентов изделия.

Иммуноглобулин диагностический оспенный люминесцирующий сухой представляет собой глобулиновую фракцию сыворотки крови кроликов, иммунизированных вирусом осповакцины штамм Л-ИВП и конъюгированную с флюоресцеинизотиоцианатом (ФИТЦ), разлитую по 0,5 мл в ампулы и лиофилизированную. Консервант – мертиолят (тиомерсал) в конечной концентрации 100 мкг/мл (содержание расчетное). Имеет вид сухой пористой массы от желтого до оранжевого цвета.

Примечание:

В производстве используют здоровых животных, прошедших ветеринарное освидетельствование и карантин.

ПРИНЦИП АНАЛИТИЧЕСКОГО МЕТОДА И ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

Антитела, содержащиеся в изделии, образуют с ортопоксвирусами комплекс антиген-антитело, который обнаруживается по свечению, видимому в люминесцентном микроскопе. Свечение комплекса антиген – антитело происходит за счет ФИТЦ, конъюгированного с антителами.

ОСНОВНЫЕ ПОТРЕБИТЕЛЬСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Изделие предназначено лабораторной диагностики для однократного применения по назначению.

Вид анализа – качественный.

Одна ампула изделия предназначена на 40 определений с учетом контролей.

Ремонту и обслуживанию не подлежит. Монтаж, наладка, калибровка и прочие операции, необходимые для ввода изделия в эксплуатацию и его правильной эксплуатации не требуются. Изделие

является нестерильным.

Пользователями изделия могут быть медицинские специалисты бактериологических лабораторий лечебно-профилактических учреждений с высшим и средним специальным образованием, прошедшие специальную подготовку и допущенные к работе с патогенными микроорганизмами в соответствии с СП 1.3.2322-08 и/или СП 1.3.3118-13.

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ИЗДЕЛИЯ

Чувствительность. Иммуноглобулин диагностический оспенный люминесцирующий должен выявлять антиген вируса осповакцины в зараженной клеточной культуре (K^+) с интенсивностью свечения на (+4) в разведении 1:16 (рабочее разведение) и с интенсивностью свечения на не менее (+3) в разведении 1:32.

Чувствительность иммунофлюоресцентной реакции по выявлению и идентификации ортопоксвирусов - плюс 1 (+1). Таким образом, флюоресцентное специфическое свечение на (+1) считают положительной реакцией по выявлению ортопоксвирусов.

Специфичность. Иммуноглобулин диагностический оспенный люминесцирующий в рабочем разведении должен вызывать яркую специфическую изумрудно-зеленую флюоресценцию с антигеном ортопоксвирусов на фиксированных культурах клеток, зараженных вирусом осповакцины (K^+), и не вызывать специфическую флюоресценцию в незараженных культурах клеток (K^-).

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С ИЗДЕЛИЕМ

Класс потенциального риска применения изделия – 2б.

Изделие является безопасным, не приносит вреда окружающей природной среде и здоровью человека при транспортировании, хранении, применении. Компоненты изделия являются негорючими, невзрывоопасными, не способными самовозгораться, не радиоактивными, нетоксичными, не обладают канцерогенным, мутагенным действием или отрицательно влияющим на репродуктивную функцию человека, в том числе не образуют токсичных соединений с другими веществами, не обладают кумулятивными свойствами. Иммуноглобулин диагностический оспенный люминесцирующий сухой получен от животных (кроликов), прошедших ветеринарное освидетельствование и карантин.

Однако, при работе с изделием используется вакцина оспенная живая (для K^+), содержащая живой вирус осповакцины, ряд биологических материалов и реагентов (иммуноглобулин диагностический оспенный люминесцирующий, культура клеток, сыворотка крупного рогатого скота и др.), поэтому инструменты, оборудование и материалы, находящиеся с ними в контакте, следует рассматривать как потенциально инфицированные. При работе следует соблюдать правила техники безопасности в соответствии с:

- ГОСТ Р 52905-2007 «Лаборатории медицинские. Требования безопасности»;
- СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней» (для лабораторий учреждений, осуществляющих

государственный санитарно-эпидемиологический надзор и лечебно-профилактических учреждений);

– СП 1.3.2518-09 «Дополнения и изменения № 1 к СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней»;

– СП 1.3.2885-11 «Дополнения и изменения № 2 к СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

При определении ортопоксвирусов в материалах от людей и животных необходимо соблюдать СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)».

При работе с потенциально-инфицированными биологическими образцами, инструментом, оборудованием, материалами, изделиями, находящимися с ними в контакте, следует соблюдать осторожность:

– работать в боксах микробиологической безопасности или боксированных помещениях для проведения микробиологических исследований с применением индивидуальных средств защиты (защитной одежды, одноразовых резиновых перчаток, защитного экрана или очков);

– в случае пролива образцов и рабочих растворов на рабочие поверхности и по окончании работы, необходимо проводить дезинфекционную обработку с использованием дезинфицирующих средств, разрешенных к использованию на территории РФ;

– инструменты и оборудование (после работы) подвергать обработке с использованием химических и физических методов обеззараживания предусмотренных СП 1.3.2322-08 или СП 1.3.3118-13 в зависимости от объекта, подлежащего обеззараживанию;

– избегать образования аэрозолей, попадания исследуемых образцов, реагентов, используемых при работе с изделием в рот, их проглатывания, контакта с кожей и слизистыми оболочками;

– при проведении анализа не принимать пищу, напитки и не курить, после работы тщательно вымыть руки.

При использовании изделия потребителем для анализа биологических материалов и образцов, образовавшиеся жидкие и твердые отходы перед утилизацией следует обеззараживать, как потенциально инфицированный материал, физическими или химическими методами по режимам согласно СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)» в зависимости от объекта обеззараживания (предпочтительный и унифицированный режим обеззараживания - автоклавирование при температуре $(132 \pm 2)^\circ\text{C}$, 0,2 МПа в течение 45 мин.) с последующей утилизацией в соответствии СП 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

Все сточные растворы, как потенциально инфицированный материал, перед утилизацией следует обеззараживать кипячением в емкости в течение 30 мин, или 6% раствором перекиси водорода в течение 60 мин, или автоклавированием при температуре $(132 \pm 2)^\circ\text{C}$ в течение 45 мин.

Утилизация изделий, пришедших в негодность, с истекшим сроком годности и неиспользован-

ных изделий осуществляется в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10.

СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ

МЕРЫ ПО СНИЖЕНИЮ РИСКОВ ПРИ ПРИМЕНЕНИИ ИЗДЕЛИЯ.

Объективные результаты анализа гарантируются при выполнении следующих условий:

- соблюдение условий хранения и транспортирования изделия. Изделия, транспортированные и хранившиеся с нарушением температурного режима, применению не подлежат;
- не использовать изделие при отсутствии на его упаковке соответствующей маркировки, нарушении целостности внутренней (первичной) упаковки изделия;
- не использовать изделие с истёкшим сроком годности;
- для отбора исследуемых образцов и реагентов необходимо использовать дозаторы пипеточные автоматические с погрешностью измерения объёмов не более 5 %;
- отбор реагентов следует производить чистыми наконечниками для дозаторов пипеточных автоматических.

ОБОРУДОВАНИЕ, МАТЕРИАЛЫ И РЕАГЕНТЫ,

НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С ИЗДЕЛИЕМ

- пипетки стеклянные градуированные 2-го класса точности вместимостью 10; 5; 2; 1 мл или пипетки серологические стерильные аналогичной вместимости;
- дозаторы пипеточные автоматические одноканальные с изменяющимся объемом от 10 мкл до 10000 мкл или аналогичные;
- наконечники одноразовые, соответствующие дозаторам пипеточным;
- предметные стекла;
- пробирки стеклянные вместимостью 10 мл и 20 мл или матрасы культуральные;
- груша резиновая или автоматическая;
- штатив для пробирок;
- натрий фосфорнокислый двузамещенный 12-водный/динатрия гидрофосфата додекагидрат;
- калий фосфорнокислый однозамещенный/калия дигидрофосфат;
- натрия хлорид;
- вода очищенная или вода дистиллированная (далее по тексту – вода);
- глицерин;
- ацетон;
- культуры клеток (одна из культур: ФЭК, L-41, HELA, Hep-2, Vero, ВНК-21, СПЭВ);
- среда Игла MEM или среда 199, или другая согласно рекомендациям к конкретной культуре клеток;
- сыворотка крупного рогатого скота;
- глютамин;
- антибиотик (бензилпенициллин, стрептомицин/гентамицин или канамицин или др.);

- вакцина оспенная живая (Р N001141/01);
- покровные стекла;
- микроскоп световой лабораторный микробиологический;
- микроскоп прямой, люминесцентный с иммерсионным объективом.

Допускается использование других материалов, реагентов, оборудования аналогичных по качеству.

АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Тип анализируемого образца – содержимое кожных высыпаний от лиц, подозрительных на заболевания оспенной этиологии.

Сбор, хранение и транспортирование образцов, содержащих биологический материал, должны осуществляться с учетом требований действующих санитарных правил и норм.

Все исследуемые образцы должны иметь четкую маркировку (идентификацию).

Из поступивших для исследования образцов материалов готовят фиксированные мазки по предложенной ниже прописи.

Фиксированные мазки исследуемых образцов, до их окрашивания иммуноглобулином диагностическим оспенным люминесцирующим, могут храниться при температуре 2-8 °С в течение 10 сут.

Подготовка исследуемых образцов.

1. На чистых предметных стеклах готовят мазки. Содержимое кожных высыпаний от лиц, подозрительных на заболевания оспенной этиологии (в пустулезной стадии делают осторожный соскоб скальпелем, чтобы получить материал более глубоких слоев кожного эпителия) наносят тонким слоем на предметное стекло: нанесенную на стекло каплю материала распределяют при помощи другого стекла со шлифованными краями, поставленного к первому под углом 45 °; при исследовании густого материала его наносят на предметное стекло, затем покрывают другим предметным стеклом, слегка сдавливают и раздвигают стекла в разные стороны, в результате получают мазки на обоих стеклах.

Для получения мазка из органа неплотной консистенции стерильным скальпелем делают разрез органа, затем с разреза делают соскоб и наносят его тонким слоем на стекло. Для исследуемого органа с более плотной консистенцией получают мазок-отпечаток: с поверхности или разреза вырезают небольшой кусочек и, захватив его пинцетом, прижимают ровную поверхность кусочка органа к стеклу, таким образом, на стекле получают один или несколько отпечатков.

2. Мазки высушивают на воздухе при комнатной температуре. На каждом этапе высушивания мазков можно использовать термостат с температурой 20 - 25 °С.

3. Мазки фиксируют в ацетоне, охлажденном до 2 - 8 °С. Фиксацию проводят, погружая мазок в кювету с ацетоном. Мазки фиксируются на стекле в течение 10 мин.

4. Мазки высушивают на воздухе при комнатной температуре.

ПОДГОТОВКА КОМПОНЕНТОВ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ (АНАЛИЗА)

Иммуноглобулин диагностический оспенный люминесцирующий сухой. Содержимое ампулы растворяют (восстанавливают) в 0,5 мл воды или фосфатно-солевого буферного раствора 0,01 М (далее – ФСБ 0,01 М). Срок годности растворенного (восстановленного) изделия не более 1 сут при температуре от 2 до 8 °С.

Вакцина оспенная живая. Содержимое ампулы растворяют (восстанавливают) в 0,2 мл воды или ФСБ 0,01М. Срок годности растворенной (восстановленной) вакцины оспенной не более 1 сут при температуре хранения от 2 до 8 °С.

Раствор глицерина забуференный. Глицерин смешивают с ФСБ 0,01 М в соотношении 9:1.

ФСБ 0,01 М (рН-7,2-7,5). Готовят по следующей прописи:

Раствор А. Навески натрия хлорида 38,25 г и натрия фосфорнокислого двузамещенного 12-водного/динатрия гидрофосфата додекагидрата 7,15 г растворяют в 4,6 л воды.

Раствор Б. Навески натрия хлорида 4,25 г и калия фосфорнокислого однозамещенного/калия дигидрофосфата 1,36 г растворяют в 0,5 л воды.

Для получения ФСБ 0,01 М раствор Б добавляют к раствору А до получения рН 7,2-7,5.

Раствор во флаконах по 300-400 мл стерилизуют автоклавированием при температуре (120 ± 1) °С, давлении пара $(0,1 \pm 0,01)$ МПа в течение 12 мин. Срок годности раствора не более 7 дней при температуре хранения от 2 до 8 °С.

Ростовая среда. Ростовая среда представляет собой среду Игла МЕМ с добавлением глутамина (300 мг/л), сыворотки крупного рогатого скота (далее - КРС) в количестве 10 % и антибиотика (бензилпенициллин из расчета 100 ед/мл и стрептомицин/гентамицин из расчета 100 мкг/мл или используют один антибиотик канамицин из расчета 125 мкг/мл) или среду 199 с добавлением сыворотки КРС в количестве 10 % и антибиотика в тех же количествах.

Поддерживающая среда. Поддерживающая среда отличается от ростовой среды снижением содержания сыворотки КРС до 2 %.

Положительный (K^+) и отрицательный (K^-) тест-контроли.

В качестве (K^+) применяют одну из выращенных на покровных стеклах монослойную клеточную культуру (ФЭК, L 41, HELA, Нер-2, Vero, ВНК-21, СПЭВ), зараженную вирусом осповакцины. В качестве (K^-) используют те же клеточные культуры, незараженные вирусом.

В пробирки с ростовой средой помещают по одному, в матрасы - по 5-10 покровных стекол размером 8x24 или 9x18 мм.

Суспензию клеток концентрацией (250 ± 50) тыс./мл разливают в пробирки по 2 мл, в матрасы - по 20-25 мл, выдерживают при температуре (37 ± 1) °С в течение 24-48 ч до формирования на покровных стеклах клеточного монослоя. Отбирают лишь те стекла, на которых образовался сплошной монослой.

Ростовую среду осторожно сливают так, чтобы не повредить монослой клеток на покровных стеклах. Покровные стекла с монослоем клеток для K^- заливают поддерживающей средой, а для

получения тест-контроля K^+ в пробирки (матрасы) с монослоем клеток на покровных стеклах вносят 2 мл (20-25мл) поддерживающую среду, содержащую вирус осповакцины в концентрации 10^6 ООЕ/0,1 мл (содержимое 1 ампулы растворенной вакцины оспенной доводят до 2 мл поддерживающей средой), аккуратно покачивают для равномерного распределения материала. Контакт вируса с клетками 1 ч при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$. После этого вирусосодержащую жидкость удаляют и добавляют поддерживающую среду (в пробирки по 2,0 мл, в матрасы по 20-25 мл).

Зараженные (K^+) и незараженные клеточные культуры (K^-) инкубируют при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 24 - 48 ч. Через 24 ч монослой зараженных клеток (K^+) исследуют под световым микроскопом для обнаружения цитопатического действия вируса, выражающегося в появлении округлых клеток и незначительном разрежении монослоя. В качестве (K^+) берут покровные стекла клеточной культуры с выраженной цитопатической деструкцией клеток (не менее 10 в одном поле зрения). При недостаточности в K^+ клеток с признаками цитопатического действия инкубацию продлевают до 48 ч.

Полоски покровных стекол тест-контролей (K^-) и (K^+) извлекают из пробирок/матрасов, ополаскивают ФСБ 0,01 М, высушивают при комнатной температуре, фиксируют 10 мин в ацетоне с температурой от 2 до 8°C . Фиксированные покровные стекла с тест-контролями (K^+) и (K^-) хранят в герметично закрытых пробирках при температуре от 2 до 8°C не более 10 сут.

ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ (АНАЛИЗА)

Фиксированные на покровных стеклах тест-контроли (K^+) и (K^-) помещают на предметные стекла (клеточным монослоем вверх) и смачивают 1-2 каплями ФСБ в течение 1-2 мин, избыток буферного раствора удаляют фильтровальной бумагой и затем наносят 50 мкл иммуноглобулина люминесцирующего в рабочем разведении и пограничных с ним (например, при рабочем разведении 1:16 – окраску проводят разведениями 1:8, 1:16, 1:32, приготовленными на ФСБ 0,01 М. При этом каждым разведением иммуноглобулина окрашивают по два K^+ и K^- . Затем тест-контроли помещают во влажную камеру и выдерживают при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 30 мин. После чего промывают погружением: двукратно в ФСБ 0,01 М и однократно в воду. Продолжительность каждого промывания/погружения 5-10 мин. После промывания тест-контроли высушивают при комнатной температуре.

Окрашенные тест-контроли помещают на предметные стекла вниз клеточным слоем в капле смеси глицерина с ФСБ 0,01 М в соотношении 9:1 (забуференный глицерин).

Аналогичная методика окраски применяется и для исследуемого материала (фиксированные мазки).

Иммуноглобулин люминесцирующий наносят на 2 фиксированных мазка с исследуемым материалом в рабочем разведении (1:16).

Внимание! Необходимо строго соблюдать рекомендации по продолжительности операций окраски образцов, так как длительная обработка увеличивает вероятность появления неспецифиче-

ского свечения отдельных примесей, способных адсорбировать белки, в том числе и меченые анти-тела.

Учет результатов.

После окрашивания проводят микроскопирование при помощи люминесцентного микроскопа любой марки. Иммерсионный объектив, окуляр и светофильтры следует подбирать, руководствуясь описанием люминесцентного микроскопа. Для иммерсионного объектива используют специальное нефлюоресцирующее масло.

Результат оценивают по характерной иммунофлюоресценции в цитоплазме зараженных клеток по 4 крестовой системе:

плюс 4 (+4) - сверкающая флюоресценция изумрудно-зеленого цвета с чётко выраженной формой клетки;

плюс 3 (+3) - яркая флюоресценция изумрудно-зеленого цвета;

плюс 2 (+2) - не яркая слабо выраженная флюоресценция;

плюс 1 (+1) - заметная, но очень слабо выраженная флюоресценция.

Результаты считают положительными, если в исследуемом материале иммуноглобулин в рабочем разведении выявляет вирусный антиген с интенсивностью свечения от (+1) до (+4), а в K^+ в рабочем разведении - на (+4), и разведении, двукратно превышающем рабочее - не менее (+3). При этом в K^- - специфическое свечение должно отсутствовать.

Свечение в цитоплазме может быть в виде отдельных ярко-зеленых гранулярных или диффузных образований, иногда заполняя её сплошь.

Характерное специфическое ярко-зеленое свечение отчетливо различимо от диффузной белесой аутофлюоресценции цитоплазмы и неспецифического желтого свечения пигментов или эозинофильной зернистости лейкоцитов. Во избежание ошибок при оценке результатов необходимо учитывать не только интенсивность специфического свечения, но и обращать внимание на характерную морфологию клеток.

Надежность иммунофлюоресцентного метода может быть повышена при использовании меченого родамином бычьего или бараньего альбумина, окрашивающего в оранжево-красный цвет все органические примеси в образцах. Использование бычьего или бараньего альбумина, меченого родамином должно проводиться в соответствии с инструкцией по применению к данной продукции.

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ ИЗДЕЛИЯ

Транспортирование всеми видами крытого транспорта при температуре от 2 до 8 °С.

Хранение в упаковке изготовителя в течение всего срока годности при температуре от 2 до 8 °С в защищенном от света месте.

Срок годности растворенного (восстановленного) иммуноглобулина не более 1 сут, хранение при температуре от 2 до 8 °С.

Срок годности – 2 года со дня приемки. Изделие с истекшим сроком годности применению не подлежит.

ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение настоящей инструкции по применению.

Рекламации по вопросам, касающимся качества и обращения медицинского изделия в течение срока годности с обязательным указанием серии и срока годности, следует направлять в адрес Акционерного общества «Научно-производственное объединение по медицинским иммунобиологическим препаратам «Микроген» (АО «НПО «Микроген»): Россия, 115088, г. Москва, 1-я Дубровская ул., д. 15, строение 2, тел. (495) 710-37-87, e-mail: info@microgen.ru и в адрес производства:

Россия, 634040, Томская область, г. Томск, ул. Ивановского, д. 8, тел. (3822) 63-37-34, (3822) 90-58-08.

Взамен инструкции утвержденной 30.03.2018 г.

Прошито, пронумеровано и
скреплено печатью
листа(ов)

