

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от _____ 2007 г.

№ _____

« УТВЕРЖДАЮ »

Директор ФГУЗ

ГосНИИИИ «Мироб»

Роспотребнадзора

В.В.Кутырев

2007 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению иммуноглобулинов диагностических флуоресцирующих
псевдотуберкулезных адсорбированных лошадиных,
лиофилизата для диагностических целей

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие псевдотуберкулезные адсорбированные лошадиные, лиофилизат для диагностических целей, предназначены для выявления и идентификации *Y. pseudotuberculosis* I, II, III, IV, V и VI сероваров прямым иммунофлуоресцентным методом в мазках из чистых культур и различных объектов внешней среды.

2. ОСНОВНЫЕ ТЕХНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие псевдотуберкулезные адсорбированные лошадиные, лиофилизат для диагностических целей, представляют собой меченую флуоресцеин-5-изотиоцианатом (ФИТЦ) иммуноглобулиновую фракцию псевдотуберкулезной поливалентной сыворотки.

Консервант – мертиолят. Конечная концентрация в препарате – 0,01 %.

Стабилизатор – сахароза и натрия тиосульфат, конечная концентрация соответственно 2,5 % и 0,75 %.

Рабочее разведение препарата не менее 1:16.

Сухой препарат – аморфная масса оранжевого цвета, при растворении образует мутную жидкость желто-зеленого цвета, осадка не образует.

По форме выпуска в ампуле ШПВ-6, НС-3 ОСТ 17-94, по 10 ампул в пачке из картона, по ГОСТ 12301-81

КОПИЯ
ВЕРНА

3. ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Противопоказаний не зарегистрировано.

4. ПОДГОТОВКА К РАБОТЕ ИЗДЕЛИЯ

Приготовление мазков и их флуоресцентная окраска.

При исследовании любого материала, наряду с приготовлением первичных мазков, одновременно проводят обогащение пробы (фильтрацией через мембранные фильтры, центрифугированием, подрачиванием), а затем проводят повторные исследования соответствующих мазков.

Подрачивание исследуемого материала проводят на бульоне Хоттингера pH $7,2 \pm 0,1$ при температуре $(28 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 18-20 ч.

Иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие псевдотуберкулезные растворяют в 1,0 мл дистиллированной воды в течение 3 мин и далее разводят 0,9 % раствором натрия хлорида pH $7,3 \pm 0,1$ до объема, соответствующего рабочему разведению препарата, указанному на этикетке ампулы. Например: указано, что рабочее разведение 1:16, следовательно, для его получения необходимо 1 мл препарата после его растворения развести в 15 мл 0,9 % раствора натрия хлорида.

Цельный препарат после растворения можно хранить в пробирке с резиновой пробкой при температуре от 2 до 8°C не более 14 суток. Препарат в рабочем разведении хранить не следует.

Мазки-отпечатки из органов животных и человека, а также из различных объектов внешней среды готовят тонкими на обезжиренных стеклах по общепринятой методике. Наличие на предметных стеклах кусочков тканей и органов недопустимо.

Фиксацию высушенных на воздухе мазков производят погружением в 96° этиловый спирт на 20 мин. В процессе фиксации не допускается слипание между собой отдельных предметных стекол. Применение восковых карандашей недопустимо, так как воск, растворяясь в фиксаторе, образует на стеклах пленку,

препятствующую флуоресцентной "окраске" бактерий. После окончания срока фиксации препараты вынимают из спирта и высушивают на воздухе.

После фиксации фиксированный и высушенный мазок помещают во влажную камеру (чашку Петри) кусочками влажной фильтровальной бумаги



КОПИЯ
ВЕРНА



или ваты), с помощью пастеровской пипетки наносят каплю рабочего разведения флуоресцирующих иммуноглобулинов. "Окраску" проводят в течение 20 мин, затем мазки ополаскивают дистиллированной водой и погружают на 10-15 мин в 0,9 % раствор натрия хлорида.

После этого препараты вновь ополаскивают дистиллированной водой и высушивают на воздухе.

5. ПОРЯДОК РАБОТЫ ИЗДЕЛИЯ

Люминесцентную микроскопию мазков проводят на микроскопе типа ЛЮМАМ-И, ЛЮМАМ-Р и др. под иммерсионным объективом. Длина волны возбуждающего света 340-360 нм. Длина волны люминесценции 400-440 нм. Цвет люминесценции – зелено-желтый.

На готовые мазки наносят каплю раствора глицерина (9 частей глицерина и 1 часть фосфатного буферного раствора pH 7,0±0,1), накрывают покровным стеклом и просматривают под люминесцентным микроскопом с применением иммерсионного масла (на 1 мл иммерсионного масла добавляют 0,3 мл нитробензола).

Для получения наиболее яркой люминесценции бактерий следует тщательно центрировать осветительную систему микроскопа.

Рекомендуется применять светофильтры возбуждающего света СЗС-7, СЗС-24, БС-3, ФС-2 или СС-15 и запирающие светофильтры ЖС-18.

УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Степень яркости люминесценции бактерий, "окрашенных" флуоресцирующими иммуноглобулинами, принято обозначать по следующей шкале:

4 креста – сверкающая флуоресценция периферии микробной клетки, четко контрастирующая с темным телом клетки;

3 креста – яркая флуоресценция периферии микробной клетки;

2 креста или 1 крест – слабое свечение всей клетки.

Отрицательным считается свечение с 4 крестами или 3 крестами, свечение с 2 или 1 крестом принято считать положительным. Обнаружение аутофлуоресценции ореола на 3-4 крестах при исследовании мазков свидетельствует о наличии в исследуемом материале бактерий псевдотуберкулеза. Отрицательный



КОПИЯ
ВЕРНА



результат (1-2 креста) свидетельствует о полном отсутствии возбудителя псевдотуберкулеза в исследуемом материале или о содержании его в низкой концентрации, не выявляемой иммунолюминесцентным методом при прямом исследовании пробы без обогащения или подрачивания. Препарат выявляет 5×10^8 м.к./мл исследуемого материала и более.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ

Все работы с исследуемым материалом проводить в соответствии с СП 1.2.731-99 "Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности и гельминтами".

6. ПРАВИЛА ХРАНЕНИЯ И ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Хранение и транспортирование при температуре от 0 до 8 °С в соответствии с СП 3.3.2.1248-03.

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

Для лечебно-профилактических и санитарно-профилактических учреждений.

Рекламации на качество препарата следует направлять в ФГУН ГИСК им. Л.А. Тарасевича (119002, г. Москва, Сивцев Вражек, 41, тел. / факс (495) 241-39-22) и в институт-изготовитель (410005, г. Саратов, ул. Университетская, 46, ФГУЗ РосНИПЧИ «Микроб» тел. (845-2) 26-21-31, факс (845-2) 51-52-12.

Зам. директора
по научной и производственной работе
ФГУЗ РосНИПЧИ «Микроб»
Роспотребнадзора



Никифоров А.К.

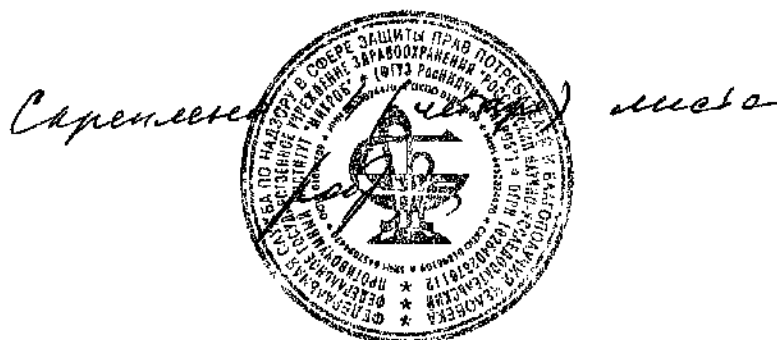
Директор ФГУН
ГИСК им. Л.А.Тарасевича
Роспотребнадзора

Медуницын Н.В.



КОПИЯ
ВЕРНА





7.9.8961 103-01-9.109-1007



ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ*

**иммуноглобулинов диагностических флуоресцирующих псевдотуберкулезных
адсорбированных лошадиных,
лиофилизата для диагностических целей**

Иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие псевдотуберкулезные адсорбированные лошадиные, лиофилизат для диагностических целей, представляют собой меченую флуоресцеин-5-изотиоцианатом (ФИТЦ) иммуноглобулиновую фракцию псевдотуберкулезной поливалентной сыворотки.

Стабилизатор – сахароза и натрия тиосульфат, конечная концентрация соответственно 0,9 % и 0,1 %.

Консервант – натрия мертиолят. Конечная концентрация в препарате – 0,01 %.

Рабочее разведение препарата не менее 1:16.

ОПИСАНИЕ

Сухой препарат – аморфная масса оранжевого цвета.

НАЗНАЧЕНИЕ

Выявление и идентификация возбудителя псевдотуберкулеза (*Y. pseudotuberculosis* I, II, III, IV, V и VI сероваров).

СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ

Приготовление мазков для люминесцентной микроскопии.

При исследовании материала из внешней среды, наряду с приготовлением первичных мазков, одновременно проводят обогащение пробы (фильтрацией через мембранные фильтры, диаметром пор 0,45 мкм, центрифугированием при 3000 об/мин, подрачиванием и т.п.), а затем проводят повторные исследования соответствующих мазков.



Введен Инструкция по применению, утвержденной 20.04.2007

**КОПИЯ
ВЕРНА**



СОГЛАСОВАНО

Директор ФГУН

ГИСК им. Л.А. Тарасевича

Роспотребнадзора

Медуницын Н.В.

"28"

2017 г.



Подрачивание исследуемого материала проводят на бульоне Хоттингера pH $7,2 \pm 0,1$ при температуре $(28 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 18-20 ч.

Мазки-отпечатки из органов животных и человека, а также из различных объектов внешней среды готовят на обезжиренных стеклах по общепринятой методике, наличие на предметных стеклах кусочков тканей и органов недопустимо.

Для приготовления мазков из чистых культур готовят взвеси в стерильном 0,9 % растворе натрия хлорида pH $7,2 \pm 0,1$ до концентрации 1×10^9 м.к./мл по стандартному образцу мутности (ОСО 42-28-85П) 10 единиц. Затем полученные взвеси разводят в 2 раза 0,9 % раствором натрия хлорида до концентрации 5×10^8 м.к./мл.

Фиксацию высушенных на воздухе мазков производят погружением в 96° этиловый спирт на 20 мин. В процессе фиксации не допускается слипание между собой отдельных предметных стекол. Применение восковых карандашей недопустимо. После окончания срока фиксации препараты вынимают из спирта и высушивают на воздухе.

Окраска мазков флуоресцирующими иммуноглобулинами.

Сухой препарат растворяют в 1 мл дистиллированной воды в течение 3 минут при встряхивании. После растворения образуется опалесцирующая жидкость желто-зеленого цвета, без осадка, которую можно хранить в пробирке с резиновой пробкой при температуре от 2 до 8°C не более 14 суток. Препарат разводят 0,9 % раствором натрия хлорида pH $7,2 \pm 0,1$ до титра, соответствующего рабочему разведению препарата, указанному на этикетке ампулы. Препарат в рабочем разведении используют в день приготовления.

На поверхность фиксированного и высушенного мазка, помещенного во влажную камеру (чашку Петри с кусочками увлажненной фильтровальной бумаги или ваты), с помощью пастеровской пипетки наносят каплю рабочего разведения иммуноглобулинов флуоресцирующих псевдотуберкулезных. Через 20 мин мазки ополаскивают дистиллированной водой и промывают 0,9 % раствором натрия хлорида 2 раза по 5 мин. После этого препараты вновь ополаскивают дистиллированной водой и высушивают на воздухе.

На готовые мазки наносят каплю раствора глицерина (9 объемных частей глицерина и 1 часть фосфатного буферного раствора pH $7,2 \pm 0,1$), накрывают покровным стеклом и просматривают под люминесцентным микроскопом с применением иммерсионного флуоресцирующего масла.

Люминесцентная микроскопия

Люминесцентную микроскопию мазков проводят прямым иммунофлуоресцентным методом в микроскопе типа ЛЮАМ-И, ЛЮАМ-Р и др. с использованием иммерсионных



объективов при увеличении 7х90 и специального иммерсионного не флуоресцирующего масла с $nD^{20}=1,515\pm0,002$.

Рекомендуется применять светофильтры возбуждающего света СЗС-7, СЗС-24, БС-3, ФС-2 или СС-15 и запирающие светофильтры ЖС-18.

Для получения наиболее яркой люминесценции бактерий следует тщательно центрировать осветительную систему микроскопа.

УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для оценки специфического свечения бактериальной клетки используют четырехкрестовую систему:

4 креста – сверкающая флуоресценция по периферии, четко контрастирующая с темным телом микробной клетки;

3 креста – яркая флуоресценция по периферии микробной клетки;

2 креста – слабое свечение всей клетки;

1 крест – едва заметные контуры клеток.

Специфическим считается свечение не менее 5-10 клеток с яркостью 3 или 4 креста, при просмотре не менее 30 полей зрения. Свечение с яркостью 1 или 2 креста является неспецифическим и учитывается как отрицательный результат. При отрицательном или сомнительном результате при определении специфичности препарата исследование повторить на удвоенном количестве образцов контрольных штаммов.

БЕЗОПАСНОСТЬ

Все работы с исследуемым материалом проводить в соответствии с СП 1.3.1285-03 "Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)".

ФОРМА ВЫПУСКА

По 1 мл в ампуле. Упаковка содержит 10 ампул, Инструкцию по применению и нож ампульный.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

Срок хранения - 2 года. Препарат с истекшим сроком годности применению не подлежит.

Хранить и транспортировать в соответствии с СП 3.3.2.1248-07 при температуре от +2 до +8 °С.

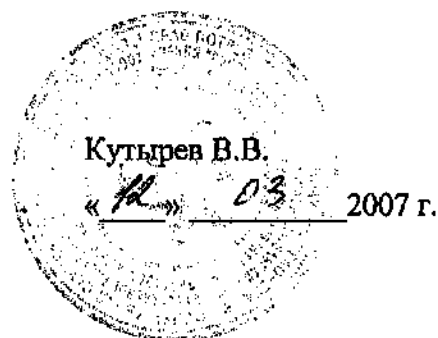


УСЛОВИЯ ОТПУСКА

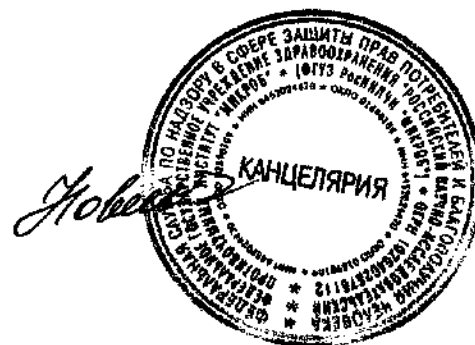
Для лечебно-профилактических и санитарно-профилактических учреждений.

Рекламации на качество препарата следует направлять в ФГУН ГИСК им.Л.А. Тарасевича, Роспотребнадзора (119002, г. Москва, Сивцев Вражек, 41; тел. (495)241-39-22, факс 241-92-58) и в адрес предприятия-производителя – ФГУЗ РосНИПЧИ «Микроб» (410005, г.Саратов, ул. Университетская, 46. Тел. (8452) 26-21-31, факс (8452) 51-52-12).

Директор
ФГУЗ РосНИПЧИ «Микроб»
Роспотребнадзора



КОПИЯ
ВЕРНА



Спринтено



мгг