

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора
от _____ 2007 г.
№ _____



Директор ФЦНИИ
РосНИПЧИ «Микроб»
Роспотребнадзора

В.В.Кутырев

2007 г.

ИНСТРУКЦИЯ

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

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие чумные адсорбированные лошадиные, лиофилизат для диагностических целей, предназначены для выявления и идентификации возбудителя чумы (капсульной и бескапсульной форм) в мазках из различных материалов и чистых культурах прямым иммунофлуоресцентным методом.

2. ОСНОВНЫЕ ТЕХНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие чумные адсорбированные лошадиные, лиофилизат для диагностических целей, представляют собой меченую флуоресцеин-5-изотиоцианатом (ФИТЦ) глобулиновую фракцию чумной агглютинирующей лошадиной сыворотки, полученной гипериммунизацией лошадей живой культурой вакцинного штамма чумного микроба EV, адсорбированную убитыми формалином клетками псевдотуберкулезных микробов. Стабилизатор – сахараза 0,9% и натрия тиосульфат 0,1 %. Консервант – натрия мертиолат 0,01 %.

Рабочее разведение препарата не менее 1:8.

Сухой препарат – аморфная масса оранжевого цвета, при растворении опалесцирующая жидкость желто-зеленого цвета, без осадка.

По 1 мл в ампуле ШПВ-6, НС-3 ОСТ 64-2-485-85, по 10 ампул в пачке из картона коробочного по ГОСТ 12301-81 с инструкцией по применению и ножом ампульным.

3. ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Противопоказаний не зарегистрировано.

4. ПОДГОТОВКА К РАБОТЕ ИЗДЕЛИЯ

Приготовление мазки и флуоресцентная окраска.



КОПИЯ
ВЕРНА



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

Подращивание 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 из исследуемого материала, в том числе из бубонов, мокроты, материалов от трупов и т.д. готовят на обезжиренных стеклах по общепринятой методике. Мазки следует делать как можно более тонкими, наличие на предметных стеклах кусочков тканей и органов недопустимо. Из каждого объекта готовят не менее 3 мазков.

Для приготовления мазков из чистых культур готовят взвеси в стерильном 0,9% растворе натрия хлорида pH 7,2-7,4 до концентрации 1×10^8 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 мин 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 10°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.

5. ПОРЯДОК РАБОТЫ ИЗДЕЛИЯ

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 чумных. 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 частей глицерина и 1 часть фосфатного буфера pH $7,2 \pm 0,1$), накрывают покровным стеклом и просматривают в микроскоп с применением иммерсионного не флуоресцирующего масла.



КОПИЯ
ВЕРНА



ЛЮМИНЕСЦЕНТНАЯ МИКРОСКОПИЯ

Люминесцентную микроскопию мазков проводят прямым иммунофлуоресцентным методом на микроскопе типа ЛЮМАМ-И, ЛЮМАМ-Р, МЛД с использованием иммерсионных объективов при увеличении 7х90 и специального иммерсионного нефлуоресцирующего 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 или 1 крест – слабое свечение всей микробной клетки.

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.

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 иммуноглобулинов в течение срока годности следует направлять в ФГУН ГИСК им. Л.А.Тарасевича Роспотребнадзора: 119002, Россия, г. Москва, пер. Сивцев-Вражек, 41, тел (495)241-39-22 факс (495)241-92-38 и на предприятие-изготовитель: 410005, Россия, г. Саратов, ул. Университетская, 46, ФГУЗ РосНИПЧИ "Микроб" Роспотребнадзора, тел (845-2)26-21-31, факс (845-2)51-52-12.

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

Директор
ГИСК им. Л.А.Тарасевича
Роспотребнадзора

КОПИЯ
ПЕРНА

Медунин Н.В.



Сквозь... (и) места

74 8961-016-51892109-2007

УТВЕРЖДАЮ
Главный Государственный
санитарный врач
Российской Федерации

«19» 05 2007 г.
№ 011/7601

ИНСТРУКЦИЯ* ПО ПРИМЕНЕНИЮ
иммуноглобулинов диагностических флуоресцирующих
чумных адсорбированных лошадиных,
лиофилизата для диагностических целей

Иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие чумные адсорбированные лошадиные, лиофилизат для диагностических целей, представляют собой меченную флуоресцеин-5-изотиоцианатом (ФИТЦ) иммуноглобулиновую фракцию чумной агглютинирующей лошадиной сыворотки, полученной гипериммунизацией лошадей живой культурой вакцинного штамма чумного микроба EV, адсорбированную убитыми формалином клетками псевдотуберкулезных микробов. Стабилизатор – сахароза 0,9 % и натрия тиосульфат 0,1 %. Консервант – натрия мертиолат 0,01 %.

Рабочее разведение препарата не менее 1:8.

ОПИСАНИЕ

Сухой препарат – аморфная масса оранжевого цвета.

НАЗНАЧЕНИЕ

Выявление и идентификация возбудителя чумы (капсульной и бескапсульной форм) в мазках из различных материалов и чистых культурах прямым иммунофлуоресцентным методом.

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 45 м; центрифугированием при 3000 об/мин; подмораживанием и т.п.), а затем проводят исследование соответствующих мазков.

*Взамен Инструкции, утвержденной 20.05.2005

КОПИЯ
ВЕРНА

СОГЛАСОВАНО

Директор ФГУН

ГИСК им. Л.А. Тарасевича

Роспотребнадзора

Медуницын Н.В.

" 28 "



Подрачивание исследуемого материала проводят на бульоне Хоттингера pH $7,2 \pm 0,2$ при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 24–48 часов.

Мазки из исследуемого материала, в том числе из бубонов, мокроты, материалов от трупов и т.д. готовят на обезжиренных стеклах по общепринятой методике. Мазки следует делать как можно более тонкими, наличие на предметных стеклах кусочков тканей и органов недопустимо. Из каждого объекта готовят не менее 3 мазков.

Для приготовления мазков из чистых культур готовят взвеси в стерильном 0,9 % растворе натрия хлорида pH 7,2–7,4 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 10°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 чумных. 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 частей глицерина и 1 часть фосфатного буфера pH $7,0 \pm 0,1$), накрывают покровным стеклом и просматривают под флуоресцентным микроскопом с применением диффузионного не флуоресцирующего мазка.



Люминесцентная микроскопия

Люминесцентную микроскопию мазков проводят прямым иммунофлуоресцентным методом на микроскопе типа ЛЮАМ-И, ЛЮАМ-Р или др. с использованием иммерсионных объективов при увеличении 7х90 и специального иммерсионного нефлуоресцирующего 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

Работу проводят 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. Ампульный.



СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

Срок годности - 2 года. Препарат с истекшим сроком годности применению не подлежит. Хранить и транспортировать в соответствии с СП 3.3.2.1248-03 при температуре от 0 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).

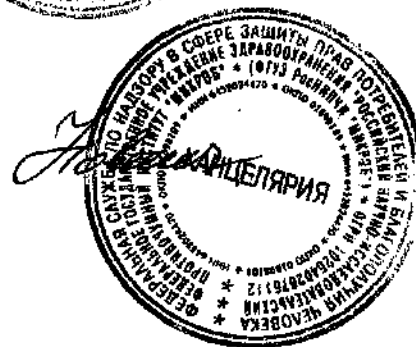
Директор

ФГУЗ РосНИПЧИ «Микроб»

Роспотребнадзора

Кутырев В.В.
2007 г.

КОПИЯ
ВЕРНА





4 (четыре) листа