

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от _____ 2007 г.

№ _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ФГУЗ

РосНИИТЧ «Микроб»

Роспотребнадзора

В.В. Кутырев

_____ 2007 г.

ИНСТРУЦИЯ

**по применению иммуноглобулинов диагностических флуоресцирующих
холерных адсорбированных лошадиных,
лиофилизата для диагностических целей**

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие холерные адсорбированные лошадиные, лиофилизат для диагностических целей, предназначены для выявления и идентификации возбудителя холеры О1 группы классического и эльтор биоваров в S-форме в мазках из различных материалов и чистых культур прямым иммунофлуоресцентным методом.

2. ОСНОВНЫЕ ТЕХНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие холерные адсорбированные лошадиные представляют собой меченую флуоресцеин-5-изотиоцианатом (ФИТЦ) иммуноглобулиновую фракцию холерной О1 сыворотки, полученной гипериммунизацией лошадей убитыми прогреванием при температуре 100 °С холерными вибрионами сероваров Инаба и Огава в S-форме. Иммуноглобулины адсорбированы убитыми формалином (конечная концентрация – 0,5 %) или прогреванием при температуре 100 °С в течение 20 мин клетками дизентерийных микробов и холерных вибрионов не О1 группы в S-форме.

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

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

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, 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 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 в 1% пептонной воде при температуре 37 °С в течение 3-6 часов или на щелочном агаре pH от 7,6 до 8,0 в течение 12-14 ч.

Иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие холерные растворяют в 1,0 мл дистиллированной воды в течение 3 мин и далее разводят 0,9 % раствором натрия хлорида pH 7,3±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.

Препарат в рабочем разведении используют в день приготовления.

Мазки из исследуемого материала, в том числе из испражнений, рвотных масс, материалов от трупов и т.д. готовят тонкими на обезжиренных стеклах по общепринятой методике. Наличие на предметных стеклах кусочков тканей и органов недопустимо. Из каждого объекта готовят не менее 10 мазков.

Фиксацию высушенных на воздухе мазков производят погружением в 96 ° этиловый спирт на 20 мин. В процессе фиксации исключается сдвигание 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.

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 °С не более 14 суток. Препарат разводят 0,9 % раствором натрия хлорида рН 7,2±0,1 до титра, соответствующего рабочему разведению препарата, указанному на этикетке ампулы. Препарат в рабочем разведении используют в день приготовления.

5. ПОРЯДОК РАБОТЫ

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 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.

На готовые мазки наносят каплю раствора глицерина (9 частей глицерина и 1 часть фосфатного буферного раствора рН 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).



ЛЮМИНИСЦЕНТНАЯ МИКРОСКОПИЯ

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.

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.

Специфическим считается свечение с яркостью 4 или 3 креста, свечение с яркостью 2 или 1 крест принято считать неспецифическим. Обнаружение светящегося ореола на 3-4 креста хотя бы у единичных клеток свидетельствует о наличии в исследуемом материале холерного вибриона. Отрицательный результат (1-2 креста) свидетельствует о полном отсутствии *V. cholerae* в исследуемом материале или о содержании его в низкой концентрации, не выявляемой иммунолюминесцентным методом при прямом исследовании пробы без обогащения или подрашивания. Препарат выявляет 5×10^8 м.к./мл исследуемого материала и более.

6. ПРАВИЛА ХРАНЕНИЯ И ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Хранение и транспортирование при температуре $+2 \pm 0,5^\circ\text{C}$, 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





710 2961-015 0111128

УТВЕРЖДАЮ
Главный государственный
санитарный врач
Российской Федерации
Г.Г. Онищенко
«19» 2007 г.
№ 01-11/75-01

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

Иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие холерные адсорбированные лошадиные, лиофилизат для диагностических целей, представляют собой меченную флуоресцеин-5-изотиоцианатом (ФИТЦ) иммуноглобулиновую фракцию холерной О1 сыворотки, полученной гипериммунизацией лошадей убитыми прогреванием при температуре 100 °С холерными вибрионами сероваров Инаба и Огава в S-форме.

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

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

Рабочее разведение препарата не менее 1:8.

ОПИСАНИЕ

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

НАЗНАЧЕНИЕ

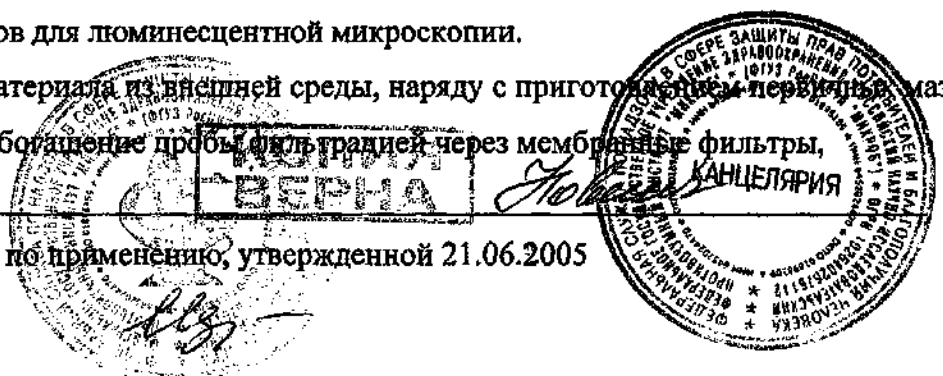
Выявление и идентификация возбудителя холеры О1 группы классического и эльтор биоваров в S-форме в мазках из различных материалов и чистых культур прямым иммунофлуоресцентным методом.

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,

*Взамен Инструкции по применению, утвержденной 21.06.2005



СОГЛАСОВАНО

Директор ФГУН

ГИСК им. Л.А. Тарасевича

Роспотребнадзора

Медуницын Н.В.

"28"



с диаметром пор до 0,45 μ ; центрифугированием при 3000 об/мин в течение 30 мин; подрачиванием и т.д., затем проводят повторные исследования соответствующих мазков.

Подрачивание исследуемого материала проводят в 1 % пептонной воде при температуре 37 °С в течение 3-6 ч или на щелочном агаре pH от 7,6 до 8,0 в течение 12-14 ч. Для приготовления мазков из чистых культур готовят взвеси в стерильном натрия хлорида растворе 0,9 % pH от 7,2 до 7,4 до концентрации 1×10^9 м.к./мл по стандартному образцу мутности (ОСО 42-28-86П, соответствующего года выпуска) 5 единиц. Затем полученные взвеси разводят в 2 раза 0,9 % раствором натрия хлорида до концентрации 5×10^8 м.к./мл.

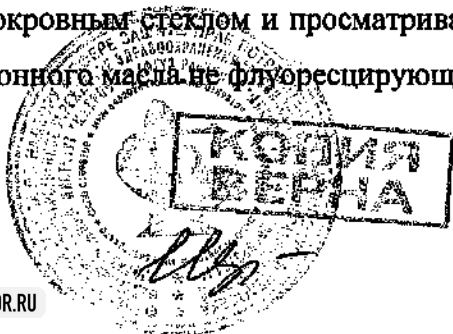
Мазки из исследуемого материала, в том числе из испражнений, рвотных масс, материалов от трупов и т.д. готовят на обезжиренных стеклах по общепринятой методике. Мазки следует делать как можно более тонкими, наличие на предметных стеклах кусочков тканей и органов недопустимо. Из каждого объекта готовят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

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 ФЛЮОРЕСЦИРУЮЩИМИ ИММУНОГЛОБУЛИНАМИ

Препарат растворяют в 1 мл дистиллированной воды в течение 3 мин. После растворения образуется опалесцирующая жидкость желто-зеленого цвета, без осадка, которую можно хранить в пробирке с резиновой пробкой при температуре от 2 до 10 °С не более 14 сут. Препарат разводят натрия хлорида раствором 0,9 % pH $7,2 \pm 0,1$ до объема, 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 холерных. Через 20 мин мазки ополаскивают дистиллированной водой и промывают натрия хлорида раствором 0,9 % 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 буферного раствора pH $7,0 \pm 0,1$), накрывают покровным стеклом и просматривают под люминесцентным микроскопом с применением иммерсионного масла не флуоресцирующего масла.



ЛЮМИНЕСЦЕНТНАЯ МИКРОСКОПИЯ

Люминесцентную микроскопию мазков проводят прямым иммунофлуоресцентным методом на микроскопе типа ЛЮАМ-И, ЛЮАМ-Р и др. под иммерсионным объективом при увеличении 7х90.

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

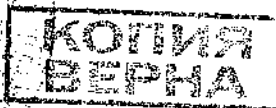
Работу с исследуемым материалом проводить в соответствии с СП 1.3.1285-03 "Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)".

ФОРМА ВЫПУСКА

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

СРОК ГОДНОСТИ, УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

Срок годности 2 года. Препарат с истекшим сроком годности применять не подлежит. Хранение и транспортирование 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, (119002, г. Москва, Сивцев Вражек, 41; тел. (495)241-39-22, факс 241-92-38) 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.
«12» 03 2007 г.

