

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от _____ 20 г. № _____



Кутырев В.В.

_____ 20 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДОТ-ИММУНОФЕРМЕНТНОЙ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ТУЛЯРЕМИЙНОГО МИКРОБА МОНОКЛОНАЛЬНОЙ (ДИАТул-М)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

«Тест-система дот-иммуноферментная для детекции туляремиального микроба моноклональная (ДИАТул-М)», далее – тест-система «ДИАТул-М», предназначена для выявления возбудителя туляремии в биологическом материале и объектах окружающей среды методом дот-иммуноферментного анализа (ДИА).

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1 Принцип действия. В основу метода положена схема сэндвич-варианта ДИА. При постановке ДИА туляремиальный антиген, содержащийся в исследуемом материале, специфически взаимодействует с туляремиальными моноклональными иммуноглобулинами, сорбированными на фильтре мембранном нитроцеллюлозном (ФМНЦ). Образовавшийся комплекс «антиген-антитело» выявляют с помощью конъюгата (туляремиальные моноклональные антитела, меченные пероксидазой хрена). Визуализация реакции происходит после добавления субстрат-индикаторного раствора, содержащего перекись водорода и 3,3'-диаминобензидин (ДАБ). При положительном результате на ФМНЦ появляются коричневые пятна специфической реакции различной интенсивности. Тест-система позволяет выявлять *F. tularensis* в количестве не менее 5×10^6 м.к./мл.

2.2 Состав набора:

Компонент	Описание	Количество
1	2	3
Фосфатно-солевой буфер (ФСБ)	таблетка белого цвета	1 шт.
Лактальбумин	Порошок кремового цвета	1 пробирка
конъюгат пероксидазный иммуноглобулиновый туляремиальный (МКАТул*)	аморфная масса коричневатого цвета, представляющая собой моноклональные иммуноглобулины к липополисахариду (ЛПС) <i>F. tularensis</i> , конъюгированные с пероксидазой хрена, лиофилизированные	1 пробирка
Tween-20	вязкая слегка желтоватая жидкость	1 пробирка
3,3'- диаминобензидин (ДАБ)	порошок коричневого цвета	1 пробирка

Гидроперит	таблетка белого цвета	1 шт.
Положительный контрольный образец (ПКО–ТМ)	аморфная масса желтоватого цвета, представляющая собой лиофилизированную инаktivированную взвесь <i>F. tularensis</i>	1 пробирка
Фильтр мембранный нитроцеллюлозный (ФМНЦ)	пластины белого цвета 20×25 мм с нанесенной разметкой 3×3 мм, сенсibilизированные мышиными иммуноглобулинами моноклональными к ЛПС <i>F. tularensis</i> , блокированный в растворе лактальбумина	1 шт.

Тест-система «ДИАТул-М» рассчитана на проведение 42 определений с учетом положительного и отрицательного контролей.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Специфичность и чувствительность. Тест-система должна выявлять *F. tularensis* в количестве 5×10^6 м.к./мл и не должна давать положительных результатов с микроорганизмами других видов в концентрации 1×10^9 м.к./мл.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1 Использование тест-системы «ДИАТул-М» с истекшим сроком годности недопустимо. Уничтожение компонентов тест-системы проводить в соответствии с СанПин 2.1.7.728-99.

4.2 Работу проводят в соответствии с требованиями СП 1.3.1285-03 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности» (Москва, 2003 г.)

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ*

Наименование	Обозначения документации, производитель
1	2
Термостат	Термостат суwовоздушный INCUCELL 111 (ВМТ, Чехия). Диапазон термостатирования от 22 °C до 70 °C.
Холодильник от плюс 2 до плюс 8 °C с морозильной камерой не выше минус 18°C	«Атлант», Россия
Ламинарный бокс биологической безопасности класс II**	Бокс абактериальной воздушной среды класс II БАВп-01-«Ламинар-С», «Ламинарные системы», Россия
Набор полуавтоматических дозаторов переменного объема	Набор полуавтоматических дозаторов переменного объема (0,5-10, 10-100 мкл, 100-1000 мкл), Biohit, Финляндия
Штатив-подставка для дозаторов	«Хеликон», Россия
Наконечники универсальные для дозаторов переменного объема с аэрозольным барьером до 10 мкл	«Axygen», США
Наконечники универсальные для дозаторов переменного объема с аэрозольным барьером до 100 мкл	«Axygen», США

ЗАМ. ДИРЕКТОРА

ПО ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ

И ПРОИЗВОДСТВЕННОЙ РАБОТЕ

А. К. НИКИФОРОВ

Наконечники универсальные для дозаторов переменного объема с аэрозольным барьером до 1000 мкл	«Ахуген», США
Штатив «рабочее место» для пробирок на 0,2 мл	«Хеликон», Россия
Штатив «рабочее место» для пробирок на 1,5 мл	«Хеликон», Россия
Емкость (для сброса отработанных расходных материалов)	«Гем», Россия
Посуда мерная стеклянная	ГОСТ 1770-74
Одноразовый халат**	«Здравмедтехника», Россия
Одноразовые перчатки**	Имп.
Вода очищенная	ФС 42-2619-97

Примечание: * допускается применение оборудования и материалов другого типа, по своим характеристикам не уступающих рекомендуемым;

** при работе с необеззараженным материалом.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Материалом для исследования служат: суспензии культур туляремиального микроба или подозрительных изолятов, плазма или сыворотка крови, почва, остатки пищи из гнезд хищных птиц, их погадки, пробы органов лабораторных и диких животных, экскременты грызунов и хищников, вода открытых водоемов.

Материал для исследования забирают в стерильные емкости с герметично закрывающимися крышками в соответствии с требованиями СП 1.3.1285-03 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности», МУ 4.2.2039-05 «Техника сбора и транспортирования биоматериалов в микробиологические лаборатории», МУ 3.1.2007-05 «Эпидемиологический надзор за тулярией».

Транспортирование материала в лабораторию для исследований проводят при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С в течение 1 суток в соответствии с СП 1.2.036-95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I-IV групп патогенности». После проведения предварительной обработки проб допускается их транспортировка при температуре от минус 16 до минус 20 °С в течение 7 суток.

6.1 Плазма крови. Венозную кровь в количестве 4,5 мл, стабилизированную цитратом натрия (3,8 %-ный раствор цитрата натрия в соотношении 1/9) или ЭДТА (1,2–2 мг/мл крови), аккуратно перемешивают покачиванием до полного смешивания с антикоагулянтом и центрифугируют при 500 об/мин ($g \approx 45$) в течение 3 мин. Для исследования используется надосадочная жидкость (плазма), смешанная с 0,9 %-ный раствором натрия хлористого в соотношении 1/20.

6.2 Сыворотка крови. Для получения сыворотки кровь выдерживают в термостате при температуре плюс 37 °С в течение 30 минут. Затем центрифугируют при 500 об/мин ($g \approx 45$) в течение 3 мин или помещают в холодильник при температуре плюс (5 ± 3) °С на 1–2 часа. Образовавшуюся сыворотку аккуратно отсасывают пипеткой, не допуская попадания эритроцитов. Гемолизированная сыворотка исследованию не подлежит.



К исследуемой сыворотке добавляют 0,9 %-ный раствор натрия хлористого в соотношении 1/20.

6.3 Чистые культуры микроорганизмов. Из культур туляремиального микроба, инкубированных в течение 72 ч при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ или подозрительных изолятов готовят взвеси в 2 мл 0,9 %-ного раствора натрия хлористого по отраслевому стандартному образцу мутности 10 единиц (ОСО 42-28-59-86П), что соответствует 5×10^9 м.к./мл *F. tularensis*. После приготовления взвеси с концентрацией 1×10^9 м.к./мл готовят 10-кратные разведения подготовленных взвесей в 0,9 %-ном растворе натрия хлористого до конечной концентрации 1×10^7 м.к./мл.

6.4 Пробы органов лабораторных и диких животных. Органы лабораторных и диких животных отбирают при вскрытии, соблюдая регламентированные меры безопасности. Кусочки органов массой до 10 г растирают в стерильной ступке со стеклянным порошком, после чего добавляют 0,9 % раствор натрия хлористого в соотношении 1/10 (вес/объем). Надосадочную жидкость отбирают с помощью пипетки через ватный тампон в отдельную пробирку и оставляют на 2 ч при температуре $(20 \pm 2)^\circ\text{C}$. Затем готовят разведения проб последовательным двукратным титрованием в ФСБ до разведения 1/160.

6.5 Почва, остатки пищи из гнезд хищных птиц, их погадки, экскременты грызунов и хищников. Пробы почвы с мест вероятного обсеменения берут в количестве 20-30 г на глубине до 15 см. Отобранные пробы почвы, остатки пищи из гнезд хищных птиц, их погадки, экскременты грызунов и хищников помещают в стерильные пробирки или в банки. К исследуемому материалу добавляют 0,9 %-ный раствор натрия хлористого в соотношении 1/10, тщательно перемешивают в течение 15 мин, отстаивают в течение 10 мин для оседания крупных частиц. Надосадочную жидкость переносят в пробирку и используют для анализа.

6.6 Вода открытых водоемов. Пробы берут в затененном месте, на глубине 10-20 см от поверхности стоячей или слабопроточной воды в объеме 100-200 мл в стерильные емкости объемом 200-250 мл с завинчивающейся крышкой. Из одной точки берут 2 пробы. Для концентрирования бактериальных клеток используют центрифугирование. Из пробы воды переносят по 45 мл в центрифужные пробирки с винтовой горловинной крышкой типа Falcon объемом 50 мл и центрифугируют при 6000 об/мин ($g \approx 4000$) в течение 15 мин. Осадок в каждой пробирке ресуспендируют в 500 мкл 0,9 % раствора натрия хлористого и используют для анализа.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Постановку анализа осуществляют в боксе биологической безопасности II класса (Бокс абактериальной воздушной среды для работы с ПБА – «Ламинар-С» («Ламинарные системы», Россия) с соблюдением требований СП 1.3.1285-03 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности» (Москва, 2003 г.).

7.1 Обеззараживание материала. К исследуемым образцам сыворотки крови или плазмы добавляют натрия мертиолят до концентрации 1/10000 (0,01%) с последующим прогреванием их при $(56 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 30 минут. Исследуемые образцы микробных

Зам. директора
по экспериментальной
и производственной работе
А. К. НИКИФОРОВ

взвесей, суспензии органов лабораторных и диких животных, образцы из окружающей среды прогревают при температуре 100 °С в течение 20 мин с последующим добавлением формалина до конечной концентрации 2 % и оставляют на 2 ч при температуре (20±2) °С. По окончании экспозиции материал считается обеззараженным.

Возможно проведение анализа с использованием необеззараженного материала.

7.2 Приготовление рабочих растворов. Компоненты тест-системы извлекают из холодильной и морозильной камер.

ФСБ – таблетку растворяют в 100 мл воды очищенной (например, дистиллированной) при постоянном перемешивании. Раствор хранят в холодильнике при температуре (5±3) °С в течение 7 суток.

Лактальбумин – сухую навеску смешивают с 0,5 мл приготовленного ФСБ и тщательно перемешивают стеклянной палочкой до получения однородной массы, затем доводят объем раствора ФСБ до 3,0 мл. Раствор стабилен при температуре (5±3) °С в течение 2 суток.

Tween-20 – растворяют 1,5 мл ФСБ и тщательно перемешивают, не допуская образования пузырей. Раствор стабилен при температуре (5±3) °С в течение 7 суток.

Конъюгат МКАТул* – сухое вещество растворяют добавлением 30 мкл воды очищенной, аккуратно перемешивают. Концентрированный раствор конъюгата стабилен при температуре (5±3) °С в течение 3 суток.

Ex tempore готовят разводящую жидкость для конъюгата: к 2,7 мл раствора лактальбумина добавляют 0,3 мл раствора Tween-20 (соотношение 9/1). Затем вносят концентрированный раствор конъюгата в объеме, необходимом для получения рабочего разведения и тщательно перемешивают; получают рабочий раствор конъюгата.

Гидроперит – таблетку растворяют в 4,5 мл воды очищенной при перемешивании, получая 33% раствор перекиси водорода. Хранят в плотно закупоренном флаконе в холодильнике при температуре (5±3) °С в течение 7 суток.

ПКО–ТМ – сухое вещество растворяют в 10 мкл воды очищенной. Раствор хранят в холодильнике при температуре (5±3) °С в течение 2 суток.

Для получения субстрат-индикаторного раствора к 3 мл ФСБ добавляют содержимое пробирки с надписью «ДАБ» и 1,5 мкл раствора перекиси водорода, тщательно перемешивают. Раствор готовят *ex tempore*.

7.3 Постановка анализа. Перед проведением анализа ФМНЦ произвольно маркируют шариковой ручкой (приложение 1). ФМНЦ следует аккуратно брать пинцетом. На ФМНЦ дозатором полуавтоматическим наносят по 2 мкл исследуемого материала (микробной взвеси, сыворотки или плазмы крови, суспензии органов, образцов из окружающей среды). Пробы плазмы крови и сыворотки крови наносят в разведении 1/20, суспензии органов лабораторных и диких животных – 1/160. Исследуемые взвеси бактерий наносят в концентрации 1×10^7 м.к./мл. Подлежащие исследованию образцы из окружающей среды готовят в соответствии с настоящей инструкцией и наносят в получаемом разведении. В качестве положительного контроля на ФМНЦ наносят 2 мкл раствора ПКО–ТМ, а в качестве отрицательного – 2 мкл ФСБ.

по экспериментальной
и производственной
А. К. НИКИФОРОВ

В чашку Петри помещают ФМНЦ, рядом с ФМНЦ кладут ватный шарик размером 0,5×0,5 см, смоченный водой очищенной, закрывают крышкой и инкубируют во влажной камере при температуре (37±1) °С в течение 30 мин. По окончании инкубации ФМНЦ трижды промывают по 1-2 мин в 3 мл ФСБ. Раствор сливают в емкость для сброса отработанных расходных материалов.

В чашку Петри с ФМНЦ вносят приготовленный рабочий раствор конъюгата в объеме 3 мл. Чашку с внесенным конъюгатом закрывают крышкой и инкубируют при температуре (37±1) °С в течение (60±10) мин. Далее ФМНЦ шестикратно промывают ФСБ, как описано выше.

В чашку Петри с ФМНЦ вносят субстрат-индикаторную смесь и выдерживают при температуре (20±2) °С в течение (7±2) мин, после чего раствор сливают в емкость для сброса отработанных расходных материалов. ФМНЦ промывают в 3 мл воды очищенной, после чего помещают на фильтровальную бумагу и оставляют при температуре (20±2) °С до полного высыхания, не допуская освещения прямыми солнечными лучами.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Регистрацию результатов проводят визуально по появлению на ФМНЦ окрашенных пятен специфической реакции.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

Для учета результатов реакции используют приведенную ниже таблицу и цветовую шкалу (приложение 2).

Пробы/ контроли	Окрашивание пробы	Результат анализа
Отрицательный контроль	Пятно отсутствует	Результаты анализа подлежат учету .
	Пятно любой степени окрашивания	Результаты анализа не подлежат учету . Ложноположительный результат.
Положительный контроль	Пятно темно-коричневого цвета	Результаты анализа подлежат учету .
	Пятно отсутствует	Результаты анализа не подлежат учету . Ложноотрицательный результат.
	Пятно слабо окрашено	Требуется повторное исследование .
Пробы	«-», «±» Пятно отсутствует или имеются следы окрашивания	В пробе не выявлен АГ <i>F. tularensis</i> .
	«+» Очень слабое окрашивание	Результат сомнителен. Требуется дополнительное исследование .
	«++», «+++», «++++» Четкое пятно различной степени окрашивания (от светло-коричневого до темно-коричневого)	В пробе выявлен АГ <i>F. tularensis</i> .

ЗАМ. ДИРЕКТОРА
ПО ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ
И ПРОИЗВОДСТВЕННОЙ РАБОТЕ
А. К. НИКИФОРОВ



10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

Условия хранения: Тест-система «ДИАТул-М» хранится при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С. **Внимание!** ДАБ хранится при температуре от минус 16 до минус 20 °С. Разукомплектовать при получении. Срок годности – 6 месяцев.

Рекламации на качество «Тест-системы дот-иммуноферментной для детекции туляремиального микроба моноклональной (ДИАТул-М)» в течение срока годности направлять в ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» (410005, г. Саратов, ул. Университетская, 46; тел. (845-2) 51-59-65).

Зам. директора по экспериментальной
и производственной работе



Никифоров А.К.

Ректор ГБОУ ВПО
Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского
Минздравсоцразвития России



Попков В.М.

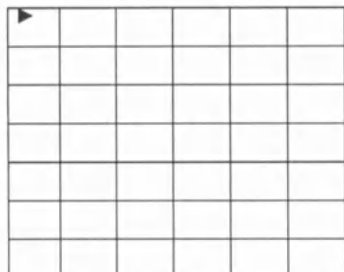
Директор ФБУН Саратовский НИИСГ
Роспотребнадзора



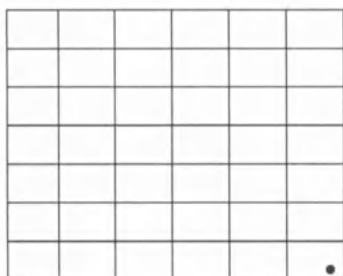
Спирин В.Ф.

Варианты маркировки ФМНЦ*

А. Маркировка начала нанесения образцов



Б. Маркировка конца нанесения образцов



В. Маркировка квадратов

1	2	3	4	5	6
7	8	9	10	11	12
13	14	15	16	17	18
19	20	21	22	23	24
25	26	27	28	29	30
31	32	33	34	35	36
37	38	39	40	К+	К-

* Допускаются другие варианты маркировки.



ЦВЕТОВАЯ ШКАЛА
для визуального учета результатов при использовании
«Тест-системы дот-иммуноферментной для детекции
туляремийного микроба моноклональной (ДИАТул-М)»

**Окрашивание
пятна
специфической
реакции**

Оценка реакции

Результат



«++++»

**Резко-
положительный**



«+++»

Положительный



«++»

**Слабо-
положительный**



«+»

Сомнительный



«±»
(следы)

Отрицательный*

* Полное отсутствие окрашивания пятна также расценивается как отрицательный результат.

ЗАМ. ДИРЕКТОРА
ПО ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ
И ПРОИЗВОДСТВЕННОЙ РАБОТЕ
А. К. НИКИФОРОВ



В данном документе
пронумеровано,
прошнуровано и скреплено
печатью 9 листов.

(девять)

Начальник отдела
делопроизводства

Р.Н.
Косолапова Р.Н.