

«УТВЕРЖДАЮ»

Главный государственный санитарный врач
Российской Федерации

" 31 "

№

2008 г.

Г. Г. Онищенко

21-11/28-08



ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

бактериофага диагностического чумного Покровской (П),
лиофилизат для приготовления раствора для диагностических целей

Бактериофаг диагностический чумной Покровской (П), лиофилизат для приготовления раствора для диагностических целей, представляет собой лиофилизированный стерильный фильтрат фаголизата бульонной культуры чумного микроба, содержащий взвесь частиц бактериофага чумного Покровской (П), обладающих лизирующим действием в отношении штаммов *Yersinia pestis*.

Стабилизаторы: пептон, желатин.

Аморфная масса светло-коричневого цвета.

Диагностический рабочий титр (ДРТ) бактериофага чумного Покровской (П) должен быть не менее 10^3 . Бактериофаг растворяют в 1 мл дистиллированной воды при встряхивании в течение 3 мин. После растворения – прозрачная жидкость светло-желтого цвета. Разведенный бактериофаг можно хранить в течение 24 ч при температуре $(6 \pm 2)^\circ \text{C}$.

Взамен инструкции по применению, утвержденной 22.05.87 г.

копия верна



«СОГЛАСОВАНО»
Директор ФГУН
ГИСК им. Л.А. Тарасевича
Роспотребнадзора
Медуницын Н.В.
« 18 » 03 2008 г



Метод Грациа. В чашку Петри разливают 2% агар Хоттингера pH 7,2±0,1 и подсушивают 20-40 мин при температуре (37±1) °С.

В пробирку с 4,5 мл 0,7 % агара Хоттингера, предварительно расплавленного и остуженного до температуры (47±1) °С добавляют 0,3 мл бульонной культуры испытуемого штамма, выращенного при температуре (28±1) °С в течение 18-20 ч, тщательно смешивают и выливают на агаровую пластину в чашку Петри. После застывания верхнего слоя агара с культурой, на его поверхность бактериологической петлей диаметром 2 мм наносят цельный бактериофаг Л-413С. После подсыхания капли бактериофага чашки переворачивают агаром вверх и выдерживают при температуре (28±1) °С в течение 20-24 ч.

Учет результатов.

Результаты учитывают предварительно через 12 ч, окончательно – через 20 ч по четырехкрестовой шкале:

- 4 креста - сливной полный лизис культуры с прозрачным дном литического пятна;

-3 креста - прозрачное пятно или много изолированных пятен лизиса;

-2 креста - полупрозрачное пятно или единичные изолированные пятна лизиса;

-1 крест - слабо заметное пятно лизиса культуры.

За положительный результат принимают любую степень лизиса.

Метод стерильного пятна. На подсушенную поверхность 2 % агара Хоттингера pH 7,2±0,1 в чашке Петри бактериологической петлей засевают исследуемую культуру. Возможен посев нескольких испытуемых культур секторами на одну чашку. Затем в центр газона наносят бактериологической петлей d = 2 мм цельный бактериофаг чумной Л-413 С. После подсыхания капель бактериофага посевы инкубируют в термостате при температуре (28±1) °С в течение 20-24 ч.

Копия

Версия



Если исследуемая культура не лизируется бактериофагом чумным Л-413С, ставят пробу с бактериофагами чумным Покровской (П) и псевдотуберкулезным (см. инструкции по применению).

Бактериофаг чумной Л-413С является основным диагностическим препаратом, предназначенным для идентификации возбудителя чумы и дифференциации его от псевдотуберкулезного микроба.

Безопасность работы

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 и нож ампульный.

Срок годности. Условия хранения и транспортирования

Срок годности 3 года. Препарат с истекшим сроком годности применению не подлежит.

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

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

Директор
ФГУЗ Рос НИПЧИ «Микроб»
Роспотребнадзора

" " _____

Копия верна



В.В. Кутырев

СТАНДАРТ КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА

ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ ПРЕДПРИЯТИЯ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ «РОССИЙСКИЙ НАУЧНО-
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ПРОТИВОЧУМНЫЙ ИНСТИТУТ «МИКРОБ»
ФЕДЕРАЛЬНОЙ СЛУЖБЫ ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ
ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА
(ФГУЗ РосНИПЧИ «Микроб»)

**Бактериофаг диагностический
чумной Покровской (П),
лиофилизат для приготовления раствора
для диагностических целей**

ФСП 42-

Диагностикум чумной &

Настоящая фармакопейная статья предприятия распространяется на Бактериофаг диагностический чумной Покровской (П), лиофилизат для приготовления раствора для диагностических целей, применяемый в качестве диагностического средства.

ПРОИЗВОДИТЕЛЬ

ФГУЗ РосНИПЧИ «Микроб», 410005, г.Саратов, ул. Университетская, 46

ФАСОВЩИК (ПЕРВИЧНАЯ УПАКОВКА)

ФГУЗ РосНИПЧИ «Микроб», 410005, г.Саратов, ул. Университетская, 46

УПАКОВЩИК (ВТОРИЧНАЯ/ТРЕТИЧНАЯ УПАКОВКА)

ФГУЗ РосНИПЧИ «Микроб», 410005, г.Саратов, ул. Университетская, 46

ВЫПУСКАЮЩИЙ КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

ФГУЗ РосНИПЧИ «Микроб», 410005, г.Саратов, ул. Университетская, 46

ЗАЯВИТЕЛЬ (в ФГУ «НЦЭСМП»)

ФГУЗ РосНИПЧИ «Микроб», 410005, г.Саратов, ул. Университетская, 46

Копия верна



8768 - 07

СПЕЦИФИКАЦИЯ

Бактериофаг диагностический чумной Покровской (П), лиофилизат
 для приготовления раствора для диагностических целей
 Федеральное государственное учреждение здравоохранения "Российский
 научно-исследовательский противочумный институт "Микроб"
 Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и
 благополучия человека (ФГУЗ РосНИПЧИ "Микроб")

Показатели	Методы (контроля)	Нормы
Описание		Аморфная масса светло-коричневого цвета
Подлинность	по Грация (по разделу "Специфическая активность")	Бактериофаг в ДРТ должен лизировать <i>Yersinia pestis</i> и не должен лизировать <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> I-VI сероваров
Растворимость	Визуальный	В течение 3 мин. После растворения – прозрачная жидкость светло-желтого цвета
pH	Потенциометри- ческий ГФ XI	От 7.1 до 7.3
Герметизация	МУК 4.1/4.2.588-96	Ампулы с препаратом должны быть герметичны
Потеря в массе при высушивании	МУК 4.1/4.2.588-96	Не более 3 %
Микробиологическая чистота	Бактериологичес- кий	Допускается рост не более 20 колоний микробов- сапрофитов на одной чашке Петри
Специфическая стерильность	Бактериологичес- кий	Должен отсутствовать рост чумного микроба
Специфическая активность: <i>определение количества фаговых частиц, определение литического спектра</i>	По Грация По Грация	Бактериофаг должен содержать не менее 1×10^7 фаговых частиц в 1 мл. Бактериофаг в ДРТ должен лизировать <i>Yersinia pestis</i> и не должен лизировать <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> I-VI сероваров. ДРТ должен быть не менее 10^{-3}
Производственные штаммы и штаммы для контроля		<i>Y. pestis</i> EV (Инв. № 52), 413 (Инв. № 108), 24 (Инв. № 340), 153 (Инв. № 269), 72/1458 (Инв. № 257), A-1775/1 (Инв. № 496) <i>Y. pseudo- tuberculosis</i> I (Инв. № 467), II (Инв. № 468), III (Инв. № 469), IV (Инв. № 470), V (Инв. № 471), VI (Инв. № 472)
Безопасность работы		В соответствии СП 1.3.1285-03
Упаковка		По 1 мл в ампуле ИП-5, НС-1А. 10 ампул в пачке с Инструкцией по применению и ампульным ножом
Маркировка		В соответствии с ФСП
Транспортирование		В соответствии с СП 3.3.2.1248-03 при темпера- туре от 0 до 8 °С
Хранение		В соответствии с СП 3.3.2.1248-03 при температуре от 0 до 8 °С
Срок годности		60 дн

Копия верна

Препарат представляет собой лиофилизированный стерильный фильтрат фаголизата бульонной культуры чумного микроба, содержащий взвесь частиц бактериофага чумного Покровской (П), обладающих лизирующим действием в отношении штаммов *Y. pestis*.

Стабилизатор: пептон (ГОСТ 13805-76) - 10 % и желатин (ГОСТ 11293-89) - 1,5 % (концентрации расчетные).

Описание. Аморфная масса светло-коричневого цвета.

Подлинность. Бактериофаг в ДРТ должен лизировать *Y. pestis* и не должен лизировать *Y. pseudotuberculosis* I-VI сероваров (см. раздел "Специфическая активность").

Растворимость. В течение 3 мин. Содержимое ампулы должно полностью растворяться в 1 мл дистиллированной воды при встряхивании. После растворения - прозрачная жидкость светло-желтого цвета. Определение проводят визуально.

pH. От 7,1 до 7,3. Определение проводят потенциометрически (ГФ XI, вып. 1, с. 113). Для контроля используют смесь содержимого 5 ампул.

Герметизация. Ампулы с препаратом должны быть герметичны (МУК 4.1/4.2.588-96, с. 63).

Потеря в массе при высушивании. Не более 3 %. (МУК 4.1/4.2.588-96, с. 116). Для контроля используют содержимое 10 ампул. Масса препарата в одной навеске 0,15 - 0,20 г.

Микробиологическая чистота. Допускается рост не более 20 колоний микробов-сапрофитов на одной чашке Петри. Перед постановкой контроля чашки Петри с агаром Хоттингера (МУК 4.1/4.2.588-96, с. 46) выдерживают в термостате при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 15-20 мин (дном вверх) для подсчитывания. Число контролируемых образцов

Копия верна



87 68 - 07

препарата в серии определяют по МУК 4.1/4.2.588-96, с. 38.

По 0,1 мл растворённого препарата высевают на чашки Петри с агаром Хоттингера рН $7,2 \pm 0,1$, с помощью градуированных пипеток (ГОСТ 29169-91) второго класса точности вместимостью 1 мл. Затем стерильным шпателем распределяют по поверхности агара. Чашки Петри с посевами инкубируют при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$. Через 20-22 ч подсчитывают число выросших колоний. В случае роста более 20 колоний микробов-сапрофитов на одной чашке, производят повторный контроль на удвоенном числе образцов. Если при повторном контроле выявляют рост более 20 колоний, серию препарата бракуют.

Специфическая стерильность. Должен отсутствовать рост чумного микроба. Для контроля специфической стерильности берут три образца от одной серии бактериофага. За один образец принимают содержимое двух ампул. Сухой бактериофаг растворяют в 1 мл стерильной дистиллированной воды.

Каждый образец по 1 мл засевают во флакон (ГОСТ 10782-85) со 100 мл бульона Хоттингера (МУК 4.1/4.2.588-96, с. 45), по 0,1 мл в 2 пробирки (ГОСТ 25336-82Е) со скошенным агаром Хоттингера и по 0,1 мл на 2 чашки Петри с агаром Хоттингера. Посевы во флаконах инкубируют при температуре $(28 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 20 сут, в пробирках со скошенным агаром – 10 сут, чашки Петри с агаром – 5 сут. Посевы образцов ежедневно просматривают и в случае появления роста микроорганизмов, оценивают визуально по характерному для чумного микроба росту (в бульоне - прозрачная или опалесцирующая хлопьевидная взвесь на дне, рыхлый осадок, на плотных

Копия верна



8768-07

питательных средах шероховато-бугристые колонии, мутноватые, хромогенные с нежной "кружевной" зоной по периферии). Выявленный рост микроорганизмов подтверждают микроскопией мазков, окрашенных по Граму, просматривая не менее 10 полей зрения в каждой мазке. В случае обнаружения в мазках грамотрицательных палочек, подозрительных в отношении чумного микроба, проводят идентификацию с помощью иммуноглобулинов диагностических флуоресцирующих чумных адсорбированных лошадиных сухих (ФСП 42-0020-5926-01). При выделении чумного микроба, препарат бракуют.

Специфическая активность. *Определение количества фаговых частиц.* Бактериофаг должен содержать не менее 1×10^7 фаговых частиц в 1 мл. Определение проводят методом агаровых слоев по Грация с индикаторным штаммом *Y. pestis* EV, используемым для размножения чумного бактериофага Покровской (П).

Подготовка штаммов.

Ампулу с лиофилизированной культурой штамма *Y. pestis* EV стерильно вскрывают, добавляют 1 мл натрия хлорида 0,9 % раствора и по 0,1 - 0,2 мл высевает на скошенный агар Хоттингера и инкубируют при температуре $(28 \pm 1)^\circ \text{C}$ в течение 20-24 ч (I пассаж).

Затем штамм пересевают в бульон Хоттингера и инкубируют при температуре $(28 \pm 1)^\circ \text{C}$ в течение 18-20 ч (II пассаж).

Для определения количества фаговых частиц берут смесь содержимого трех ампул одной серии бактериофага, предварительно растворяя каждую из них в 1 мл дистиллированной воды.

Затем готовят последовательные десятикратные разведения бактериофага в пробирках в бульоне Хоттингера, от разведения 10^{-1} до 10^{-7}

Копия верна



градуированными пипетками, вместимостью 1 мл. Каждое разведение делают отдельной пипеткой. В пробирки с 0,5 мл суточной бульонной культуры *Y. pestis* EV вносят по 0,5 мл из каждого разведения бактериофага 10^{-6} и 10^{-7} и смешивают с 4–5 мл 0,7 % агара Хоттингера, предварительно расплавленного и остуженного до температуры $(47 \pm 1)^\circ\text{C}$. Из каждого разведения смесь выливают на предварительно разлитые и подсушенные 2 чашки Петри с агаром Хоттингера, покачиванием равномерно распределяют содержимое и оставляют на 10 мин при температуре $18\text{--}20^\circ\text{C}$ для застывания агара. Чашки с застывшим агаром переворачивают дном вверх и инкубируют при температуре $(28 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 18–20 ч.

Учет результатов. Количество фаговых частиц определяют подсчетом числа пятен лизиса на газоне индикаторного штамма, вычисляют среднюю величину, с пересчетом на 1 мл препарата.

Пример. В разведении 10^{-6} на 2 чашках подсчитано 40 и 38 частиц фага, в разведении 10^{-7} – 3 и 4 частицы, в разведении 10^{-8} – 0 и 0 частиц. Вычисляем среднюю арифметическую величину по 6 чашкам, приравнивая число фаговых частиц к разведению 10^{-6} . Получаем: $(40+38+30+40+0+0) : 6 = 24,6$, т.е. в среднем 25 фаговых частиц в 0,5 мл, а в 1 мл – соответственно 50. Это число умножаем на степень разведения, т.е. $50 \times 10^6 = 5,0 \times 10^7$ фаговых частиц в 1 мл.

Определение литического спектра. Бактериофаг в ДРТ должен лизировать штаммы *Y. pestis* и не должен лизировать *Y. pseudotuberculosis*. Диагностический рабочий титр (ДРТ) бактериофага должен быть не менее 10^{-3} . Определение ДРТ проводят с 5 вируселлированными штаммами чумного микроба, выделенными из природных очагов чумы и с 6 штаммами псевдотубер-

Копия верна



Подготовка штаммов.

Затем каждый штамм пересевают в бульон Хоттингера и инкубируют при температуре $(28 \pm 1)^\circ \text{C}$ и $(37 \pm 1)^\circ \text{C}$ соответственно в течение 18-20 ч (II пассаж).

Определение проводят методом агаровых слоев по Грациа. Ампулы с бактериофагом предварительно растворяют в 1 мл дистиллированной воды. В пробирки с 4,5 мл 0,7 % агара Хоттингера, предварительно расплавленного и остуженного до температуры 46-48 °С добавляют по 0,3 мл 20-24 ч бульонной культуры 5 штаммов чумного и 6 штаммов псевдотуберкулезного микробов (каждый штамм в отдельную пробирку). После равномерного перемешивания, содержимое пробирок выливают в чашки Петри на предварительно подсушенный агар Хоттингера. После застывания нанесенного слоя агара с культурой, с помощью платиновой бактериологической петли диаметром 2 мм на него наносят по одной капле цельного бактериофага и в разведениях от 10^{-1} до 10^{-7} . После подсыхания капель фага чашки переворачивают дном вверх и выдерживают в течение 18-20 ч при температуре $(28 \pm 1)^\circ \text{C}$.

- Учет результатов проводят визуально через 18-20 ч. Положительным

конус вернее



8768-07

результатом является любая степень лизиса на месте нанесения фага, по условной четырехкрестовой шкале:

- 4 креста - сливной полный лизис культуры с прозрачным дном литического пятна;
- 3 креста - прозрачное пятно с колониями вторичного роста или много изолированных литических пятен;
- 2 креста - полупрозрачное пятно или единичные изолированные пятна лизиса;
- 1 крест - слабо заметное пятно лизиса культуры.

За ДРТ бактериофага принимают наибольшее разведение, одна капля которого образует стерильное пятно интенсивностью от 4 до 1 креста со всеми штаммами чумного микроба и не образует его ни с одним из штаммов псевдотуберкулезного микроба.

Производственный штамм и штаммы для контроля.

Производственный штамм *Yersinia pestis* EV (Инв. № 52) получают из ФГУН ГИСК им. Л.А. Тарасевича, штаммы для контроля *Y. pestis*: 413 (Инв. № 108), 24 (Инв. № 340), 153 (Инв. № 269), 72/1458 (Инв. № 257), А-1775/1 (Инв. № 496), *Yersinia pseudotuberculosis* : I (Инв. № 467), II (Инв. № 468), III (Инв. № 469), IV (Инв. № 470), V (Инв. № 471), VI (Инв. № 472) получают из Государственной Коллекции патогенных бактерий ФГУЗ РосНИПЧИ "Микроб".

Штаммы должны быть в R-форме и обладать типичными культуральными, морфологическими, биохимическими, серологическими свойствами.

Штаммы *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis* хранят в лиофилизированном состоянии в течение 10 лет при температуре $(6 \pm 2)^\circ\text{C}$ или на 0,4 % агаре Хоттингера при температуре $(6 \pm 2)^\circ\text{C}$ в течение 6 месяцев. Пересев культур проводят через каждые 6 месяцев не более 2 раз.

Безопасность работы. Работу проводят по СП 1.3.1285-03 "Безопас-

концы верны



ность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)".

Упаковка. По 1 мл в ампуле ШП-5, НС-1А (ОСТ 64-2-485-85). 10 ампул в пачке (крой – тип П-2, позиция –11) из картона коробочного (ГОСТ 12301-81). В пачку вкладывают Инструкцию по применению и ампульный нож (ТУ 400-6-169-85). На ампулы и пачки наклеиваются этикетки, выполненные печатным способом на бумаге (ТУ 5438-09400279404-00).

Маркировка. Графическое оформление маркировки ампул и пачек по РД 42-1100/1440-99-113.

На этикетке ампулы указывают: сокращенное название предприятия изготовителя (РосНИПЧИ "Микроб"), краткое название препарата (Фаг чумн. Покровск.), номер серии, объем в мл, титр, дату изготовления, срок годности.

На этикетке пачки указывают: название предприятия-изготовителя, его юридический адрес, телефон (факс), торговый знак, название препарата, лекарственную форму, номер серии, дату изготовления, количество ампул, объем в мл, "Для лечебно-профилактических и санитарно-профилактических учреждений", условия хранения, регистрационный номер и дату регистрации, предупредительную надпись "Только для *in vitro* диагностики". «Хранить в недоступном для детей месте».

Графическое оформление транспортной тары по ГОСТ 14192-96. Содержание упаковочного листа должно быть в соответствии с РД 42-1100/1440-99-113. На транспортную тару наносят предупредительную надпись «Биопрепараты» и манипуляционные знаки «Осторожно хрупкое».

Транспортирование. В соответствии с СП 3.3.2.1248-03 при температуре от 0 до 8 °С.

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

копия верна



Срок годности 3 года.

Назначение. Идентификация чумного микроба и дифференциация его от псевдотуберкулезного.

Примечание: реактивы и титрованные растворы, приведенные в настоящей Фармакопейной статье предприятия, описаны в соответствующих разделах в Государственной Фармакопее XI издания, вып. 2

Директор

ФГУЗ Российского научно-исследовательского
противочумного института "Микроб"

СОГЛАСОВАНО

Директор ФГУН ГИСК им. Л.А.Тарасевича
Роспотребнадзора,
Руководитель НОК МИБН

Главный ученый секретарь
Фармакопейного
государственного комитета,
Директор ИСКЛС

Копия верна



[Signature]
"15" 05 2007г. В.В.Кутырев

[Signature]
"24" 06 2007г. Н.В.Медуницын



[Signature]
"23" 08 2007г. В.Л.Багирова