

УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора

от 6 августа 2013 г. № 3821-р/13

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор
ФГУП ФБПО «Микробион»
Министерства России

В. Ф. Руденко

2013 г.



ИНСТРУКЦИЯ
по применению набора реагентов
Диагностикум риккетсиозный Провачека для РСК

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов Диагностикум риккетсиозный Провачека для РСК предназначен для серологической диагностики эпидемического сыпного тифа и болезни Брилля.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип действия.

Набор реагентов выявляет комплементсвязывающие антитела к риккетсиям группы сыпного тифа.

2.2. Состав набора.

В комплект Набора реагентов входят:

Диагностикум риккетсиозный Провачека для РСК – 10 ампул;

Сыворотка диагностическая к риккетсиям Провачека для РСК – 3 ампулы.

1. Диагностикум риккетсиозный Провачека для РСК. Представляет собой антигенный комплекс, выделенный методом эфирной обработки из риккетсий Провачека вирулентного штамма «Брейнль», выращенных в желточных мешках развивающихся куриных эмбрионов и инактивированных фенолом, лиофилизированный из объема 0,5 мл.

Консервант – фенол в конечной концентрации 0,5 %.

Представляет собой порошок или аморфную массу от желтовато-белого до коричневато-розового цвета.

2. Сыворотка диагностическая к риккетсиям Провачека для РСК. Получена из крови продуцентов (морских свинок или лошадей) после заражения вирулентной культурой риккетсий Провачека, инактивирована, лиофилизирована из объема 0,1 мл.

Стабилизатор – сахароза в конечной концентрации 2 %.

Представляет собой аморфную массу в виде таблетки от желтовато-белого до коричневато-розового цвета.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Рабочее разведение диагностикума содержит не менее 4 АЕ в 1 мл.

Диагностикум в рабочем разведении должен давать задержку гемолиза с сывороткой диагностической к риккетсиям Провачека для РСК, входящей в набор, до ее титра.

Специфический титр сыворотки диагностической к риккетсиям Провачека для РСК не менее 1:160.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Набор реагентов специфически безопасен. Входящие в состав набора компоненты инактивированы. Однако исследуемые материалы, сточные растворы, оборудование и материалы, находящиеся с ними в контакте, представляют собой потенциально инфекционный материал, и обращаться с ним следует осторожно. Класс потенциального риска применения по ГОСТ Р 51609-2000 – 2б.

Сточные растворы, пробы, оборудование, находившееся в контакте с биологическими образцами, лабораторную посуду следует обеззараживать в соответствии с СП 1.3.1285-03 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)» (раздел «Риккетсии»).

Оборудование обеззараживают двукратным протиранием раствором хлорамина 3 % или раствором пероксида водорода 6 % с интервалом 15 мин.

Лабораторную посуду, сточные растворы и пробы обеззараживают:

- погружением в раствор хлорамина 3 % или раствор пероксида водорода 6 % с 0,5 % моющего средства на 2 часа;
- или кипячением в течение 60 мин в растворе соды 2 %;
- или автоклавированием под давлением $(0,15\pm0,015)$ МПа при (126 ± 2) °C в течение 60 мин.

5.ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- груша резиновая (ГОСТ 790) или спринцовка №1 (ТУ 2537-006-26528997-2001);
- инактиватор (термобаня) $((56\pm1)$ °C);
- комплемент (ТУ 8990-016-14237183-2007);
- консервированная кровь барана или дефибринированная свежая кровь барана;
- маркер спиртовой;
- микропипетки стеклянные градуированные вместимостью 0,2; 0,1 мл (ГОСТ 1770-64) или пипетки автоматические одноканальные с изменяющимся объемом типа «Ленпипет», «Эппendorф» или аналогичные;
- натрия хлорида раствор 0,9 %;
- перчатки резиновые хирургические (ГОСТ 3-88);
- пипетки стеклянные градуированные вместимостью 10; 2; 1 мл (ГОСТ 29227-91);
- пробирки химические ПХ-16 (ГОСТ 25336-82);
- скарификатор ампульный (ТУ 26.81-001-95787178-2006, ТУ 9398-001-076110517-2004);
- сыворотка гемолитическая (ТУ 9389-029-14237183-2007);
- термостат $((37\pm1)$ °C);
- холодильник бытовой $(2 - 8)$ °C;
- штативы для пробирок полимерные (ТУ 9398-156-05519988-2003);
- центрифуга настольная 3 000 об/мин.

6.АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Реакцию проводят с сывороткой крови, полученной из крови человека при внутривенном заборе. Сыворотку перед исследованием инактивируют при температуре $(55-57)$ °C в течение (28-32) мин. Допускается хранение инактивированной сыворотки при температуре от 2 до 8 °C в течение 3 суток.

7.ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Перед постановкой реакции определяют рабочее разведение комплемента и рассчитывают его необходимое количество.

1. Определение рабочей дозы комплемента

1.1. Титрование комплемента для основного опыта осуществляют непосредственно перед его использованием.

1.2. Готовят рабочее разведение гемолитической сыворотки, соответствующее утреннему ее титру. Например, при титре 1:1200 к 0,1 мл гемолитической сыворотки добавляют 39,9 мл натрия хлорида раствора 0,9 % (разведение 1:400).

1.3. Готовят гемолитическую систему: смешивают равные объемы 3 % взвеси эритроцитов барана и рабочего разведения гемолитической сыворотки. Гемолитическую систему выдерживают при температуре $(36-38)$ °C в течение (28-32) мин.

1.4. Готовят разведение комплемента 1:10 в натрия хлорида растворе 0,9 %. Для этого содержимое ампулы растворяют в 10 мл натрия хлорида раствора 0,9%.

1.5. В ряд из 10 пробирок микропипеткой отмеряют от 0,01 до 0,1 мл комплемента, разведенного 1:10.

1.6. Доводят объём в каждой пробирке натрия хлорида раствором 0,9 % до 0,6 мл.

1.7. В каждую пробирку добавляют по 0,4 мл гемолитической системы.

1.8. Перемешивают содержимое пробирок встряхиванием до получения гомогенной звёсси эритроцитов. Пробирки выдерживают в термостате при температуре (36-38) °C в течение (28-32) мин.

1.9. Результаты реакции учитывают сразу после выдержки и обозначают крестами:

++++ - отсутствие гемолиза: жидкость над осадком эритроцитов не окрашена;

+++ - следы гемолиза: жидкость над осадком эритроцитов слегка окрашена в розовый цвет;

++ - ясный гемолиз: жидкость над осадком красноватого цвета, значительный осадок на дне пробирки;

+ - почти полный гемолиз: жидкость красного цвета, незначительный осадок эритроцитов;

- - полный гемолиз: жидкость красного «лакового» цвета, осадка на дне пробирки нет.

Пример титрования комплемента

Номер пробирки	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Комплемент в разведении 1:10	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,07	0,08	0,09	0,1
натрия хлорид раствор 0,9 %	0,59	0,58	0,57	0,56	0,55	0,54	0,53	0,52	0,51	0,5
Гемолитическая система	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Результат	4+	3+	2+	2+	1+	-	-	-	-	-

За одну единицу комплемента принимают его количество, содержащееся во второй пробирке с полным гемолизом (в данном случае 0,07 мл комплемента в разведении 1:10, что соответствует 0,007 мл неразведённого комплемента).

РСК проводят как при температуре 2 – 8 °C в течение 18 – 20 ч («холодное» связывание), так и при температуре 36 – 38 °C в течение 55 – 65 мин («горячее» связывание).

Рабочая доза комплемента при «холодном» связывании составляет две единицы, при «горячем» связывании – одну единицу комплемента.

2. Расчет необходимого количества комплемента.

Реакцию ставят в общем объёме 1 мл:

- 0,2 мл разведенной исследуемой сыворотки;
- 0,2 мл диагностикума в рабочем разведении;
- 0,2 мл комплемента в рабочем разведении;
- 0,4 мл гемолитической системы.

Пример расчёта необходимого количества комплемента для постановки реакции методом «холодного» связывания: в приведённом выше примере 2 единицы комплемента соответствуют $0,007 \text{ мл} \times 2 = 0,014 \text{ мл}$ неразведённого комплемента. Для постановки реакции на 100 пробирках необходимо взять $0,014 \text{ мл} \times 100 = 1,4 \text{ мл}$ неразведённого комплемента. При этом количество натрия хлорида 0,9 % раствора, которое должно быть добавлено к данному объему комплемента, составит $0,2 \text{ мл} \times 100 - 1,4 \text{ мл} = 18,6 \text{ мл}$. Таким образом, общий объем комплемента в рабочем разведении на 100 пробирок реакции составит 20 мл.

Для постановки реакции методом «горячего» связывания на 100 пробирках необходимо взять $0,007 \text{ мл} \times 100 = 0,7 \text{ мл}$ неразведённого комплемента и развести его в 19,3 мл натрия хлорида раствора 0,9 %.

3. Постановка РСК для серологической диагностики эпидемического сыпного тифа и болезни Брилля.

3.1. Содержимое ампулы с диагностиком растворяют в натрия хлориде растворе 0,9 % в объеме, указанном на этикетке ампулы.

3.2. В пробирках готовят последовательные двукратные разведения от 1:10 до 1:1280 исследуемых инактивированных сывороток на натрия хлориде растворе 0,9 % в объеме 0,2 мл.

3.3. В каждую пробирку с сывороткой добавляют по 0,2 мл диагностикума в рабочем разведении.

3.4. В каждую пробирку добавляют 0,2 мл комплемента в рабочем разведении.

3.5. Реакцию сопровождают следующими контролями:

3.5.1. Контроль соответствия заявленного титра диагностической сыворотки, выпускаемой в комплекте с диагностиком. Содержимое ампулы регистрируют в 1 мл натрия хлорида раствора 0,9 %, получая разведение сыворотки 1:10. В пробирках готовят последовательные двукратные разведения сыворотки от 1:10 до 1:320 (при титре 1:160) или от 1:10 до 1:640 (при титре 1:320) в объеме 0,2 мл. В каждую пробирку с разведениями диагностической сыворотки добавляют 0,2 мл диагностикума в рабочем разведении и 0,2 мл комплемента в рабочей дозе.

3.5.2. Контроль исследуемых и диагностической сывороток на антисыворотки на антикомплектарность: к 0,2 мл минимального разведения (1:10) каждой сыворотки добавляют по 0,2 мл натрия хлорида раствора 0,9 % и по 0,2 мл комплемента в рабочем разведении.

3.5.3 Контроль диагностикума на антикомплектарность: к 0,2 мл диагностикума в рабочем разведении добавляют 0,2 мл натрия хлорида раствора 0,9 % и 0,2 мл комплемента в рабочем разведении.

3.5.4. Контроль правильности рабочей дозы комплемента: в три пробирки вносят 0,2 мл, 0,1 мл и 0,05 мл комплемента в рабочем разведении и 0,4 мл, 0,5 мл и 0,55 мл натрия хлорида раствора 0,9% соответственно.

3.5.5. Контроль гемолитической системы: в пробирку наливают 0,6 мл натрия хлорида раствора 0,9 %.

3.6. Содержимое пробирок перемешивают встряхиванием и выдерживают при температуре 2–8 °C в течение 18–20 ч («холодное» связывание) или при температуре 36 – 38 °C в течение 55–65 мин («горячее» связывание), после чего в каждую пробирку добавляют 0,4 мл гемолитической системы, предварительно прогретой в течение 28–32 мин при температуре 36–38 °C. Содержимое пробирок снова перемешивают встряхиванием и выдерживают при температуре 36 – 38 °C в течение 20-30 мин, ориентируясь на завершение реакции в пробирках контроля рабочей дозы комплемента: в первых двух пробирках должен быть полный гемолиз (–), в третьей пробирке – задержка гемолиза не менее чем на +++.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты реакции учитывают визуально через 1ч после выдержки при комнатной температуре. Реакцию считают достоверной, если в контроле реакции получены следующие результаты:

- в контроле диагностикума, исследуемых и диагностической сывороток на антикомплектарность – полный гемолиз (-);

- в контроле диагностической сыворотки на соответствие заявленному титру задержка гемолиза до заявленного титра не менее чем ++;

- в контроле гемолитической системы задержка гемолиза на ++++.

За титр исследуемой сыворотки принимают ее максимальное разведение, дающее задержку гемолиза с диагностиком не менее чем на ++. Диагностическим титром исследуемой сыворотки является положительная реакция с разведения 1:160.

При заболевании эпидемическим сыпным тифом или болезнью Брилля РСК становится положительной со 2-ой недели болезни в разведении сыворотки 1:160 – 1:320, максимальных величин комплементсвязывающие антитела достигают на 3-ей неделе заболевания (1:640 – 1:1280).

9. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

Набор реагентов Диагностикум риккетсиозный Провачека для РСК транспортируют в соответствии с СП 3.3.2.1248-03 при температуре от 2 до 8 °C. Замораживание не допускается.

Хранят в соответствии с СП 3.3.2.1248-03 при температуре от 2 до 8 °C.

Срок годности – 5 лет.

Набор реагентов с истекшим сроком годности использованию не подлежит.

Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение настоящей инструкции по применению.

Рекламации на качество препарата с обязательным указанием номера серии и даты изготовления следует направлять в адрес предприятия-производителя ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России: 115088, г. Москва, ул. 1-ая Дубровская, д.15, тел. (495) 710-37-87.

Адрес производства: Россия, 614089, Пермский край, г. Пермь, ул. Братская, д. 177, тел. (342) 281-94-96.