

УТВЕРЖДЕНА

«УТВЕРЖДАЮ»

Приказом Росздравнадзора

Генеральный директор
ФГУП «НПО «Микроген»
Минздрава России

от 25.02 2013 г. № 387-пр/13

В.Ф. Руденко

«25» 02 2013 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов **Сыворотки диагностические ботулинические типов А, В, С, Е, F нативные лошадиные сухие для реакции биологической нейтрализации**

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов **Сыворотки диагностические ботулинические типов А, В, С, Е, F нативные лошадиные сухие для реакции биологической нейтрализации** предназначен для диагностики и идентификации типа возбудителя ботулизма в реакции нейтрализации токсина.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип действия.

Набор реагентов выявляет специфические антитоксины, нейтрализующие ботулинические токсины одноименного типа возбудителя ботулизма в реакции нейтрализации токсина.

Набор реагентов представляет собой сыворотки, полученные из крови лошадей, гипериммунизированных ботулиническими моноанатоксинами и токсинами соответствующих типов. В 1 мл ботулинической сыворотки типа А содержится не менее 200 МЕ (международные единицы активности), сыворотки типа В – не менее 100 МЕ, типа С – не менее 150 МЕ, типа Е – не менее 200 МЕ, типа F – не менее 50 МЕ.

2.2. Состав набора.

По 5 ампул сыворотки одного типа в объеме, зависящем от специфической активности набора реагентов (не менее 200 МЕ для типов А и Е, 100 для типа В, 150 для типа С, 50 для типа F) в пачке с инструкцией по применению.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Набор реагентов должен содержать специфические антитоксины, нейтрализующие ботулинические токсины одноименного типа в реакции нейтрализации токсина.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Набор реагентов безопасен. Все сточные растворы, пробы, реагенты биологического происхождения и оборудование, находившееся в контакте с сывротками, следует обрабатывать в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- пипетки стеклянные градуированные (1, 2, 5 мл);
- пробирки стеклянные вместимостью 5 мл;
- стаканы стеклянные химические, объем 100 мл;
- шприц медицинский, объем 5 мл;
- центрифуга лабораторная (2500-3000 об/мин.);
- термостат, температура (37±0,2) °С;
- 0,9% раствор натрия хлорида изотонический;
- 1 % раствора трипсина или панкреатина

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Промывные воды желудка, остатки пищи из желудка, моча и испражнения больного, различные органы трупов (2-3 кусочка по 5-10 г из сердца, печени, селезенки, почек, головного мозга, стенки желудка, толстого и тонкого кишечника), кровь, пищевые продукты, фураж, силос и другие объекты.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7. 1. Приготовление экстрактов для реакции.

Исследованию на присутствие ботулинического токсина могут быть подвергнуты промывные воды желудка, остатки пищи из желудка, моча и испражнения больного, различные органы трупов (2-3 кусочка по 5-10 г из сердца, печени, селезенки, почек, головного мозга, стенки желудка, толстого и тонкого кишечника), кровь, пищевые продукты, фураж, силос и другие объекты.

Из органов трупов (наиболее часто токсин обнаруживается в печени), из ступков крови, содержимого желудка, кишечника и испражнений делают экстракты. Экстрагирование токсинов из продуктов, содержащих поваренную соль, проводят дистиллированной водой. Настаивание исследуемого материала проводят 1-2 часа, после чего фильтруют через вату. Полученная после фильтрации жидкость, а также сывротка крови и моча могут быть использованы для постановки реакции биологической нейтрализации.

Для обнаружения токсина в пищевых продуктах, учитывая возможность гнездового расположения токсина, пробы материалов берут в количестве 20-25 г из мест, наиболее подозрительных по органолептическим свойствам, растирают в ступке и заливают двойным объемом физиологического раствора. После двухчасового выдерживания экстракт центрифугируют, а затем с ним ставят реакцию нейтрализации.

Примечание. Учитывая, что значительная часть токсина типа Е продуцируется в виде протоксина, активирующегося под действием пищеварительных ферментов, для выявления токсина типа Е экстракт из продуктов перед постановкой реакции нейтрализации рекомендуется подвергнуть активации панкреатином или трипсином (1 мл 1 % раствора фермента на 10 мл экстракта). Смесь экстракта с ферментом выдерживают при температуре 37 °С в течение 2 ч.

Для постановки реакции нейтрализации может быть использована жидкость из овощных, рыбных, мясных консервов после центрифугирования.

Присутствие ботулинических токсинов в полученных экстрактах или в жидких исследуемых материалах определяют путем постановки реакции биологической нейтрализации с типоспецифическими диагностическими ботулиническими сыворотками.

7. 2. Методика постановки реакции нейтрализации.

В связи с тем, что в исследуемом материале могут быть два и даже три токсина, предварительно реакцию необходимо ставить со смесью моновалентных ботулинических сывороток типов А, В, С, Е, F. Сухую сыворотку каждого типа растворяют в 1 мл дистиллированной воды при легком встряхивании. После растворения составляют смесь из равного количества сывороток каждого типа. К 1 мл смеси сывороток типов А, В, С, Е, F добавляют 4 мл испытуемого материала, выдерживают при комнатной температуре не менее 45 мин, после чего по 1 мл смеси из испытуемого материала и сывороток вводят четырем мышам внутрибрюшинно. Четырем контрольным мышам вводят по 0,8 мл испытуемого материала без сыворотки.

Реакцию можно проводить также на двух морских свинках. Одной из них подкожно или внутрибрюшинно вводят 3,5 мл смеси сывороток и испытуемого материала (готовят смесь так же, как для мышей), другой – 3 мл испытуемого материала без сыворотки.

Наблюдение за животными ведут в течение четырех дней. Если животные, получившие испытуемый материал без сыворотки, за это время погибают, а получившие этот же материал с сывороткой остаются живыми, то это указывает на присутствие ботулинического токсина в исследуемом материале. Ориентировочный ответ может быть получен на вторые сутки.

Для определения типа токсина в 6 пробирок разливают по 2,4 мл исследуемой жидкости, затем в каждую пробирку приливают 0,6 мл сыворотки: в первую пробирку приливают сыворотку типа А, во вторую - типа В, в третью - типа С, в четвертую - типа Е, в пятую - типа F, в шестую приливают 0,6 мл 0,9 % раствора натрия хлорида. Смесь после выдерживания 45 мин при комнатной температуре вводят внутрибрюшинно или подкожно по 1 мл двум мышам из каждой пробирки.

Для каждой сыворотки берут отдельный шприц.

Для более быстрой идентификации типа токсина реакцию с исследуемым материалом ставят одновременно со смесью диагностических сывороток и с отдельными типоспецифическими сыворотками.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Учет проводят предварительно через 4-6 ч, через 24 ч и окончательно через 4 дня.

Мыши, получившие смесь гомологичного токсина и сыворотки, выживают при гибели всех остальных мышей. Если испытуемый субстрат нейтрализуется одновременно сыворотками типов Е и F, что связано с наличием общих антигенов, дополнительно ставят реакцию нейтрализации с сыворотками, разведенными в 40 раз. Последние нейтрализуют только одноименный токсин.

9. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

Набор реагентов Сыворотки диагностические ботулинические типов А, В, С, Е, F нативные лошадиные сухие для реакции биологической нейтрализации хранят и транспортируют в соответствии с СП 3.3.2.1248-03 при температуре от 2 до 8 °С.

Срок годности 5 лет. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит.

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

Адрес производства: Россия, 355019, Ставропольский край, г. Ставрополь, ул. Биологическая, 20, тел. (8652) 24-40-84.