

«УТВЕРЖДАЮ»

Первый заместитель
генерального директора
ФГБНУ «ФНЦИРИП
им. М.П. Чумакова РАН»

А.Ю. Афонин

«22» июня 2017 г.



**ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ МЕДИЦИНСКОГО ИЗДЕЛИЯ
ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ИН ВИТРО**

Набор реагентов

**«Диагностикум геморрагической лихорадки с почечным синдромом
культуральный, поливалентный для непрямого метода иммунофлюоресценции»
«Диагностикум ГЛПС» по ТУ 9388-017-01895045-2010**

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «Диагностикум геморрагической лихорадки с почечным синдромом культуральный, поливалентный для непрямого метода иммунофлюоресценции» «Диагностикум ГЛПС» по ТУ 9388-017-01895045-2010 (далее «Диагностикум ГЛПС» или набор) предназначен для выявления антител к хантавирусам в сыворотке крови и моче людей (далее по тексту образцы), с целью диагностики геморрагической лихорадки с почечным синдромом непрямым методом иммунофлюоресценции (далее по тексту МФА - метод флюоресцирующих антител).

1.2. Диагностическая значимость

Набор реагентов предназначен для проведения иммунологических исследований с целью выявления специфических антител (суммарно IgM и IgG) к вирусам – возбудителям ГЛПС на Евроазиатском континенте.

1.3. Область применения - клиническая лабораторная диагностика, эпидемиологические исследования.

Метод диагностики - полуколичественный.

Только для профессионального применения. Для специалистов санитарно-профилактических и лечебно-профилактических учреждений.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Состав набора

В состав набора реагентов входят следующие компоненты:

АГ⁺ - антигенный инактивированный препарат – 2 упаковки по 5 предметных стекол;

K1⁺ - анти-Хантаан положительный контрольный образец инактивированный –1 ампула (0,1 мл);

K2⁺ - анти-Пуумала положительный контрольный образец инактивированный –1 ампула (0,1 мл);

K⁻ - отрицательный контрольный образец инактивированный – 1 ампула (0,1мл);

ФИТЦ - конъюгат – 1 флакон (0,25 мл);

Вода для инъекций – 1 ампула (1,0 мл).

- АГ⁺ - антигенный препарат – предметное стекло, на поверхность которого нанесен хантавирусный антиген, представляющий собой смесь суспензии клеток Vero-E6, инфицированных вирусами Пуумала, Хантаан, Добrava/Белград, Сеул и незараженных клеток Vero-E6, инактивированный; имеет вид серых пятен высушенной суспензии антиген содержащих клеток диаметром 3-4 мм, размещенных на предметных стеклах по 7 пятен в 3 рядах или по 6 пятен в 2 рядах по длине предметного стекла; переложенных и обернутых фольгой алюминиевой;

- K1⁺ - анти-Хантаан положительный контрольный образец инактивированный, сыворотка крови реконвалесцента ГЛПС, содержащая антитела к антигенам вирусов Хантаан, Добrava/Белград и Сеул, - пористая масса желтовато-белого цвета, рабочее разведение 1:64;

- $K2^+$ - анти-Пуумала положительный контрольный образец инактивированный, сыворотка крови реконвалесцента ГЛПС, содержащая антитела к антигенам вируса Пуумала, - пористая масса желтовато-белого цвета; рабочее разведение 1: 64 ;

- K^- - отрицательный контрольный образец инактивированный, сыворотка крови донора, пористая масса желтовато-белого цвета; рабочее разведение 1: 64;

** сыворотки - $K1^+$ $K2^+$ K^- не содержат HbsAg, антител к ВГС, ВИЧ - 1.2, антигенов ВИЧ.*

- ФИТЦ - конъюгат, антитела антивидовые против иммуноглобулинов человека, конъюгированные с флюоресцеинизотиоцианатом (ФИТЦ), содержит в качестве контрастера Эванс голубой (1:50 0000) - пористая масса серого цвета с оттенками от серо-голубого до светло фиолетового цвета;

- Вода для инъекций – по ФС 42-2620-97 для разведения реагентов - прозрачная бесцветная жидкость.

«Диагностикум ГЛПС» рассчитан на исследование 210 образцов, включая контрольные.

2.2. Принцип действия

Принцип действия набора «Диагностикум ГЛПС» основан на иммунохимическом взаимодействии антител в исследуемых образцах с хантавирусными антигенами. После нанесения исследуемой сыворотки на антигенный препарат (AG^+) связавшиеся антитела выявляют с помощью меченых ФИТЦ антивидовых антител. Результат регистрируют с использованием люминесцентного микроскопа. «Диагностикум ГЛПС» - культуральный поливалентный, содержит антигены ко всем хантавирусам, вызывающим ГЛПС.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Аналитическая специфичность

Специфичность определяется контрольными видоспецифическими иммунными сыворотками, содержащими антитела к вирусам Хантаан, Сеул, Добrava ($K1^+$) и Пуумала ($K2^+$).

Аналитическая специфичность набора реагентов доказана производителем при исследовании сывороток крови, содержащих антитела к реовирусам, вирусам клещевого энцефалита, Западного Нила, а также сывороток крови детей из эндемичных по ГЛПС территорий.

Ложноположительные и ложноотрицательные результаты выявлены не были.

3.2. Аналитическая чувствительность

Количество специфически светящихся клеток, содержащих хантавирусный антиген, на AG^+ должно составлять не менее 20% в поле зрения люминесцентного микроскопа при использовании $K1^+$, и $K2^+$ в рабочем разведении. При использовании в МФА на AG^+ компонентов $K1^+$, $K2^+$ в рабочем разведении должна выявляться положительная реакция иммунофлюоресценции, выражающаяся в гранулярном свечении внутриклеточного антигена с типичной локализацией (изумрудно-зеленое зернистое свечение цитоплазмы клеток).

K^- специфическое свечение должно отсутствовать.

Антитела к вирусам ГЛПС можно обнаружить в осадке мочи, а при достаточной концентрации антител и в нативной моче.

4. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

Для определения диагностической чувствительности и специфичности набора был проведен анализ историй болезни и результатов определения антител 6192 больных с первичным диагнозом ГЛПС и 2429 больных, имеющих некоторые сходные с ГЛПС симптомы, 400 проб мочи больных с серологически подтвержденным клиническим диагнозом ГЛПС и 356 проб мочи от соматических больных, не имевших симптомы, сходные с ГЛПС.

4.1. Диагностическая чувствительность

Высокая чувствительность МФА обусловлена возможностью выявлять антитела ко всем антигенным детерминантам, которые представлены в цитоплазме клеток в составе зрелых вирионов, а также компонентов сборки вирусных частиц: белка нуклеокапсида, гликозилированного белка наружной оболочки и его предшественников, вирусной РНК. При сопоставлении серологического и окончательного клинического диагноза ГЛПС частота совпадения составляла 98-99 %. Среди обследованных больных с явными клиническими проявлениями ГЛПС антитела к возбудителям этой инфекции не были обнаружены у 1-2% больных, что может свидетельствовать о наличии серонегативных форм при этом заболевании (как и при ряде других инфекционных болезнях), которые являются следствием тех или иных поломок гуморального звена иммунитета у отдельных индивидуумов.

Таблица 1

Возбудитель	Клинический материал	Число образцов с истинно положительными результатами	Результат набора «Диагностикум ГЛПС»		Диагностическая чувствительность
			Положительные	Отрицательные	
Пуумала	сыворотка крови	4690	4690	0	99,8-100 %
	осадок мочи	320	320	0	99,2-100 %
Добрава	сыворотка крови	640	640	0	99,7-100 %
	осадок мочи	80	80	0	98,9-100 %
Хантаан	сыворотка крови	157	157	0	99,2 -100 %
Сеул	сыворотка крови	56	56	0	98,8-100 %

4.2. Диагностическая специфичность

Специфичность «Диагностикума ГЛПС» – обеспечивается наличием в составе антигенного препарата клеток, инфицированных вирусами Пуумала, Хантаан, Сеул и Добрава – возбудителями ГЛПС на Евразийском континенте.

Возбудитель	Клинический материал	Число образцов с истинно отрицательными результатами	Результат набора «Диагностикум ГЛПС»		Диагностическая специфичность
			Положительные	Отрицательные	
Пуумала	сыворотка крови	3800	3800	0	99,8-100 %
	осадок мочи	186	186	0	98,7-100 %
Добрава	сыворотка крови	370	370	0	99,5-100 %
	осадок мочи	170	170	0	98,5-100%
Хантаан	сыворотка крови	87	87	0	98,4-100 %
Сеул	сыворотка крови	60	60	0	98,3-100 %

**Дзагурова Т.К., Ткаченко Е.А., Петров В.А. Эффективность применения культуральных антигенов для серодиагностики ГЛПС с помощью метода иммунофлюоресценции. Вопр. вирусол., 1988, 1, 71-75.*

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

«Диагностикум ГЛПС» предназначен только для применения ин витро.

Класс потенциального риска применения «Диагностикум ГЛПС» – 2б.

При работе с исследуемым материалом следует соблюдать правила техники безопасности в соответствии с СП 1.3.3118-13 Санитарно-эпидемические правила «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)».

6. ОБОРУДОВАНИЕ, РЕАГЕНТЫ И МАТЕРИАЛЫ

- Люминесцентный микроскоп ЛЮАМ-2 или аналогичный по характеристикам с водно-иммерсионным объективом (х40 или х60), набор светофильтров: БС 8-3; ФС 1-2; СЗС 24-3;
- Холодильник–морозильник бытовой ((4±2) °С; минус 20 °С);
- Термостат (37±1) °С;

- Пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным или фиксированным объемом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкости от 5 до 5000 мкл;
- Пипетка полуавтоматическая многоканальная, со сменными наконечниками, позволяющая отбирать объёмы жидкости до 350 мкл;
- 0,9 % раствор натрия хлорида;
- Вода дистиллированная;
- 96 луночные планшеты.

7. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ И ПРОБОПОДГОТОВКА

Вид анализируемого материала: сыворотка крови, моча людей;

7.1. *Приготовление образца сыворотки:* венозную кровь отбирают в стеклянную или пластиковую пробирку, ставят в термостат 37 °С на 10 минут, затем пастеровской пипеткой обводят сгусток от стенок пробирки и помещают в холодильник от 2 до 8 °С, через 30 минут сыворотку отделяют с помощью пипетки от сгустка. На получение 1 мл сыворотки необходимо взять 2 мл венозной крови.

Приготовление образца мочи: 2 мл любой пробы мочи отбирают в пластиковую пробирку («эппендорф»), в клинической лаборатории образец центрифугируют при 8 тысяче оборотов 15 минут, затем удаляется 1,8 мл "надосадка" а оставшиеся 0,2 мл ресуспендируют и исследуют в неразведенном виде.

7.2. Сроки* обследования сывороток крови для определения 4-х кратного и более нарастания титра специфических антител в крови:

1 образец – забор крови при поступлении больного в стационар или при обращении в поликлинику;

2 образец – забор крови через 2-3 дня после взятия 1 образца.

Сроки* обследования мочи – забор образцов мочи ведется параллельно с образцами крови.

* При наличии клинических проявлений ГЛПС и отсутствии антител в моче и нарастания титра антител в парных образцах сывороток крови, следует через 2-3 дня после взятия вторых образцов произвести забор крови и мочи для получения 3-х образцов.

Ограничений по подготовке пациента к взятию образцов на диагностику нет.

Хранить анализируемый материал допускается при температуре от 2 до 8 °С не более 2-х недель, при минус 20 °С хранение анализируемого материала не ограничено.

7.3. Возможные причины получения некорректных результатов.

Нарушение условий хранения и транспортирования набора реагентов.

8. ПОДГОТОВКА КОМПОНЕНТОВ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ (АНАЛИЗА)

Перед работой извлечь набор из холодильника, вскрыть упаковку и приступить к приготовлению рабочих растворов.

8.1. Контрольные образцы $K1^+$ и $K2^+$ и K^- растворяют в 0,1 мл воды для инъекций и разводят необходимое для исследования количество растворенного (восстановленного) контрольного образца с использованием 0,9 % раствора натрия хлорида до рабочего разведения, указанного на флаконе.

Например: для получения рабочего разведения 1:64 необходимо к 0,01 мл восстановленного контрольного образца добавить 0,63 мл 0,9% раствора натрия хлорида.

8.2. ФИТЦ-конъюгат восстанавливают в 0,25 мл воды и доводят 0,9 % раствором натрия хлорида до рабочего разведения, указанного на флаконе. К 0,25 мл восстановленного ФИТЦ- конъюгата добавляют 5 мл 0,9% раствора натрия хлорида и перемешивают.

Хранение: восстановленные контрольные образцы и ФИТЦ-конъюгат допускается хранить при температуре от 2 до 8 °C в течение 1 недели.

9. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ (АНАЛИЗА)

Реакция непрямой иммунофлюоресценции (МФА).

9.1. Перед использованием стёкла с AG^+ , хранившиеся при температуре не выше минус 20 °C, освобождают от фольги, подсушивают при комнатной температуре (18-25 °C), затем промывают дистиллированной водой и подсушивают при комнатной температуре (18-25) °C.

9.2. В лунках пластиковых планшетов готовят двукратные разведения исследуемых образцов с использованием 0,9 % раствора натрия хлорида в разведениях с 1:16 до 1024. На отдельное “пятно” AG^+ наносят по 5 мкл исследуемой сыворотки, начиная с разведения 1:1024. На каждое стекло наносят также 3 контрольных образца $K1^+$, $K2^+$, K^- в рабочем разведении.

9.3. Стекла с нанесенными исследуемыми и контрольными образцами помещают во влажную камеру и инкубируют при температуре (37±1) °C в течение 30 мин или от 2 до 8 °C в течение 18 ч.

9.4. После окончания инкубации стекла трёхкратно по 3 мин выдерживают в 0,9 % растворе натрия хлорида, промывают в течение 1 мин водой дистиллированной и высушивают при комнатной температуре.

9.5. На каждое “пятно” AG^+ наносят ФИТЦ-конъюгат в рабочем разведении по 5 мкл. Стекла AG^+ с нанесенными образцами инкубируют во влажной камере при температуре (37±1) °C в течение 30 мин, после чего трёхкратно по 5 мин выдерживают в 0,9 % растворе натрия хлорида, и затем промывают в течение 1 мин дистиллированной водой, высушивают при комнатной температуре.

10. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Стекла AG^+ с нанесенными образцами исследуют с помощью люминесцентного микроскопа ЛЮАМ-2 или аналогичного по техническим характеристикам под водно-иммерсионным

объективом с увеличением х60 или х65. Хантавирусные антитела, присутствующие в образце, связываются иммунохимически с соответствующими антигенами, находящимися в цитоплазме инфицированных клеток в составе АГ⁺. Комплекс антиген/антитело выявляется мечеными ФИТЦ антивидовыми антителами. Яркое изумрудно-зеленое зернистое свечение (флюоресценция) комплекса антиген/антитело/ФИТЦ в цитоплазме клеток с четкой гранулярной структурой, просматривается на фоне от серо-бурого до темно-коричневого или кирпично-красного окрашивания неинфицированных клеток.

Интенсивность свечения антигенсодержащих клеток оценивают по условной 4 крестовой шкале:

++++ (4 креста) - интенсивная яркая изумрудно-зеленая флюоресценция;

+++ (3 креста) - яркая зеленая флюоресценция;

++ (2 креста) - отчетливое зеленое свечение;

+ (1 крест) - тусклое серо-зеленое свечение;

0 (отрицательно) - свечение отсутствует.

Реакцию учитывают при отсутствии свечения с К⁻.

Положительной считают пробу (разведение) с интенсивностью свечения 2 (++) креста.

Одновременное обнаружение антител в крови и моче, а также выявление четырехкратного и более нарастания титра специфических антител в парных сыворотках крови больного серологически подтверждает диагноз ГЛПС.

11. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

11.1. Хранение

Для хранения набор разукomплектовывают. К1⁺, К2⁺, К⁻ и ФИТЦ-конъюгат – хранят при температуре от 2 до 8 °С в холодильных камерах. Предметные стекла АГ⁺ – хранят при температуре минус 20 °С и ниже в морозильных камерах.

Восстановленные, а также разведенные до рабочего разведения образцы контрольных сывороток и ФИТЦ-конъюгата допускается хранить при температуре от 2 до 8 °С в холодильных камерах в течение 1 недели.

11.2. Транспортирование

При температуре от 2 до 8 °С в термоконтейнерах любым видом крытого транспорта или в картонных коробах рефрижераторами в течение не более 7 сут. При транспортировке замораживание компонентов не допустимо!

11.3. Срок годности

В упаковке изготовителя - 2 года.

12. УТИЛИЗАЦИЯ

Уничтожение отходов, использованных и не использованных компонентов набора, наборов реагентов с истекшим сроком годности проводить в соответствии с СанПиНом 2.1.7.2790-10.

12.1. Отходы неиспользованных компонентов набора или наборов с истекшим сроком годности, а также биоматериала (инфицированные и потенциально инфицированные) из клинико-диагностических лабораторий, работающих с ПБА 1-2 и 3-4 групп патогенности, относятся к классу Б (эпидемически опасные отходы).

12.2. Отходы класса Б подлежат обязательному обеззараживанию (дезинфекции) обезвреживанию. Выбор метода обеззараживания /обезвреживания определяется возможностями организации, осуществляющей медицинскую деятельность, и выполняется при разработке схемы обращения с медицинскими отходами.

12.3. Упаковку наборов (класс А) утилизируют как бытовые отходы.

13. ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

При соблюдении рекомендованного способа транспортирования и хранения «Диагностикума ГЛПС» обеспечиваются требуемые показатели качества и эксплуатационные характеристики в течение установленного срока годности.

По вопросам, касающимся качества «Диагностикума ГЛПС», следует обращаться в ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН», Россия.

По адресу: 108819, г. Москва, поселение Московский, посёлок Института полиомиелита, домовлад. 8, корп. 1, тел.: (495) 841-90-02, факс (495) 841-93-21.

«СОГЛАСОВАНО»
Генеральный директор
ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»



П.К. Варнавичус

ПРОШИТО
В КОЛИЧЕСТВЕ 9 ЛИСТОВ

«24» июль 2017 год

Ген. Директор
ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»
Варнавичус П.К.

Прошито и пронумеровано и
скреплено печатью
9 листа (ов)

И.о. генерального директора
ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М.П.
Чумакова РАН»

А.Ю. Афонин
«24» июль 2017 года