**Инструкция**

**по применению диагностикума геморрагической**

**лихорадки с почечным синдромом культурального, поливалентного**

**для непрямого метода иммунофлуоресценции**

Диагностикум геморрагической лихорадки с почечным синдромом (ГЛПС) для непрямого метода иммунофлуоресценции (НИФ), предназначен для выявления специфических антител в сыворотках крови людей, а также в сыворотках крови диких и лабораторных животных.

Выпускается в виде набора, который включает следующие компоненты:

* **антигенный препарат (АГ+)** – предметное стекло, на поверхность которого нанесен хантавирусный антиген, инактивированный. АГ+ имеет вид серых пятен высушенной суспензии антигенсодержащих клеток диаметром 2-3 мм, по 7 пятен в ряду по длине предметного стекла и по 3 пятна в ряду по ширине предметного стекла; стекла обернуты в фольгу алюминиевую;
* **положительный контрольный образец анти-Хантаан (К1+),** сухой – сыворотка крови реконвалесцента после ГЛПС, содержащая антитела к хантавирусам серотипов Хантаан, Добрава/Белград, Сеул, инактивированная, лиофилизированная; пористая масса желтовато-белого цвета;

Взамен Инструкции по применению, утвержденной 19 мая 1999 года

* **положительный контрольный образец анти-Пуумала (К2+),** сухой – сыворотка крови реконвалесцента после ГЛПС, содержащая антитела к хантавирусу серотипа Пуумала, инактивированная, лиофилизированная; пористая масса желтовато-белого цвета;
* **отрицательный контрольный образец (К-),** сухой ― сыворотка крови человека, не содержащая антител к хантавирусам, инактивированная, лиофилизированная; пористая масса желтовато-белого цвета;
* **ФИТЦ – коньюгат, сухой** ― антитела против иммуноглобулинов человека меченные флюоресцеинизотиоцианатом (ФИТЦ), содержит в качестве контрастера Эванс-голубой (1:50 000); пористая масса серо-голубого цвета;
* **вода очищенная** для разведения реагентов; прозрачная

бесцветная жидкость.

Набор рассчитан на исследование 210 образцов, включая контрольные.

**Назначение.** Выявление специфических антител к хантавирусам в сыворотках крови людей, а также в сыворотках крови диких и лабораторных животных, для использования in vitro.

**Способ применения**

Проведение реакции НИФ

Приготовление растворов и реагентов для НИФ.

* Фосфатно-солевой буфер (ФСБ) – раствор для титрования контрольных сывороток: в колбу ёмкостью 1 л вносят 8,7 г натрия хлорида (NaCl), 1,8 г натрия фосфорнокислого двузамещенного 2-х водного (Na2HPO4 х 2Н2О), 1,25 г натрия фосфорнокислого однозамещенного безводного (Na2HPO4); растворяют в воде, доводят общий объём до 1 л. Устанавливают рН 7,4 с помощью 1N раствора натрия гидроокиси (NaOH). Хранение: 7 сут при 2-8 0С
* Физиологический раствор (ФР) – 0,9% раствор хлорида натрия для отмывки стекол с препаратами: в колбу емкостью 1 л вносят 9 г натрия хлорида (NaCl), растворяют в воде и доводят общий объем до 1 л.

Хранение: до 14 суток при 2-8 0С.

* Контрольные образцы К1+  и К2+ и К-  растворяют в 0,2 мл воды и разводят на ФСБ или ФС до рабочего разведения, указанного на флаконе.
* ФИТЦ-конъюгат растворяют в 0,25 мл воды и доводят ФСБ или ФС до рабочего разведения, указанного на флаконе.

*Хранение: растворенные сыворотки и коньюгаты хранят при температуре 2-8 0С в течение 1 недели.*

Перед использованием стекла с антигенным препаратом, хранившиеся при температуре не выше минус 20 0С, подсушивают при комнатной температуре (16-24 0С), промывают дистиллированной водой и высушивают в тех же условиях.

Во вспомогательном ряду пробирок или лунок пластиковых панелей на ФСБ готовят двукратные разведения исследуемых сывороток крови людей и, начиная с разведения 1:16, наносят по одной капле (5 мкл) на отдельное «пятно». На каждое стекло наносят также 3 контрольные сыворотки в рабочих разведениях. Препараты с нанесенными исследуемыми и контрольными образцами помещают во влажную камеру и инкубируют при 37 0С в течение 30 мин или при 2-8 0С в течение 18 ч после окончания инкубации препараты 3-кратно по 3 мин выдерживают в физиологическом растворе, промывают в течение 1 мин дистиллированной водой и высушивают при комнатной температуре. На каждое «пятно» наносят ФИТЦ-коньюгат в рабочем разведении по 1 капле (5 мкл). Препараты инкубируют во влажной камере при температуре 37 0С в течение 30 мин, после чего 3-кратно по 5 мин выдерживают в физиологическом растворе, промывают в

течение 1 мин дистиллированной водой и высушивают при комнатной температуре.

***Учет результатов.***

Препараты исследуют с помощью люминесцентного микроскопа ЛЮМАМ-2 или другой марки под водно-иммерсионным объективом (х40 или х60). Для хантавирусов характерна локализация специфического антигена с четкой гранулярной структурой в цитоплазме клеток. Яркое изумрудно-зеленое зернистое свечение цитоплазмы клеток, содержащих антиген хантавируса, просматривается на фоне от серо-бурого до темно-коричневого или кирпично-красного окрашивания структуры неинфицированных клеток.

Интенсивность специфического сведения антиген содержащих клеток оценивают по условной 4-х крестовой шкале:

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

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

++ (2 креста) – отчетливое зеленое свечение;

+ (1 крест) – тусклое зелено-серое сведение;

0 – свечение отсутствует.

Реакцию учитывают при отсутствии специфического свечения с К-.

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

Оптимальные сроки забора и обследования сывороток крови для определения 4-кратного и более нарастания титра специфических антител:

1-я сыворотка – при поступлении больного в стационар или при обращении в поликлинику; 2-я – через 3-4 дня после взятия 1-ой сыворотки. В случае отсутствия нарастания титра антител в парных

сыворотках, следует произвести забор 3-й сыворотки через 7-10 дней после взятия второй сыворотки.

**Форма выпуска:** выпускается в наборе из 6 компонентов:

* АГ+ – 10 предметных стекол.
* К1+ – 1 ампула (0,2 мл)
* К2+ – 1 ампула (0,2 мл)
* К- – 1 амплуа (0,2 мл)
* Вода – 1 ампула (1,0 мл)
* ФИТЦ-коньюгат – 1 флакон (0,25 мл)
* Инструкция по применению – 1 шт.

**Срок годности** – 2 года.

Диагностикум ГЛПС с истекшим сроком годности применению не подлежит

**Условия отпуска.** Для лечебно-профилактических и санитарно-профилактических учреждений.

**Транспортирование:** в соответствии с СП 3.3.2.1248-03 при температуре от 2 до 8 0С. Допускается транспортирование при температуре до 20 0С в течение не более 2-х сут.

**Хранение:** К1+, К2+, К-, ФИТЦ-коньюгат в соответствии с СП 3.3.2.1248-03 при температуре от 2 до 8 0С. Препарат подлежит разукомплектации при получении: предметнее стекла с АГ+ хранят при температуре не выше минус 20 0С. Препарат хранить в недоступном для детей месте.

Регистрационные номер ……………. Дата регистрации ………………..

Рекламации на качество диагностикума геморрагической лихорадки с почечным синдромом культурального, поливалентного для непрямого метода иммунофлуоресценции направлять в ФГУН ГИСК им. Л.А. Тарасевича Роспотребнадзора (119 002, г. Москва, ул. Сивцев

Вражек, 41, телефон (095) 241-39-22) и в ФГУП «ПИПВЭ им. М.П. Чумакова» РАМН 9142782, Московская область, Ленинский район, п/о Институт полиомиелита, тел/факс (095) 439-93-22).