

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

**Набор реагентов для выявления и полуколичественного определения столбнячного антитоксина в реакции пассивной гемагглютинации
«Диагностикум столбнячный – РПГА»
по ТУ 21.20.23-011-96299156-2021**

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов для выявления и полуколичественного определения столбнячного антитоксина в реакции пассивной гемагглютинации «Диагностикум столбнячный – РПГА» предназначен для выявления и полуколичественного определения столбнячного антитоксина в сыворотке крови человека. Столбнячный антитоксин вырабатывается в ответ на появление *Clostridium tetani*, основным фактором патогенности которого является крайне ядовитый столбнячный белковый экзотоксин. Столбнячный анатоксин входит в состав вакцин против столбняка и вызывает выработку специфических антител, предупреждая заболевание этой инфекцией. Набор реагентов служит основным средством по оценке наличия титра к столбнячному антиоксину и выявлению лиц, подлежащих иммунизации. Применение медицинского изделия не зависит от популяционных и демографических аспектов. Для диагностики *in vitro*.

1.2. Метод основан на определении уровня столбнячного антитоксина с помощью реакции пассивной гемагглютинации в сыворотке крови человека (РПГА).

Возбудитель столбняка *Clostridium tetani* (син.: столбнячная палочка) относится к роду *Clostridium* – облигатно анаэробных грамположительных бактерий, насчитывающему около 120 видов, является крайне ядовитый столбнячный белковый экзотоксин поражающий не только нервную систему, в патологический процесс вовлекаются все системы организма.

1.3. Диагностикум эритроцитарный столбнячный представляет собой 3 % взвесь формализированных танизированных эритроцитов барана, сенсibilизированных столбнячным анатоксином.

1.4. Окончательный диагноз должен быть поставлен врачом после полного клинического и лабораторного обследования пациента.

1.5. Набор предназначен для диагностики *in vitro*.

1.6. Область применения - клиническая лабораторная диагностика. Потенциальным потребителем является медицинский персонал клинко-диагностических лабораторий.

1.7. Противопоказанием к применению медицинского изделия является нарушение целостности первичной упаковки, истекший срок годности, не соблюдение требований инструкции.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода

Метод основан на определении уровня столбнячного антитоксина с помощью реакции пассивной гемагглютинации в сыворотке крови человека (РПГА).

Для определения специфической активности Набора в лунки планшета вносят разведенную стандартную противостолбнячную сыворотку и добавляют диагностикум эритроцитарный столбнячный. Реакцию сопровождают контролем стандартной сыворотки

противостолбнячной на отсутствие агглютининов к эритроцитам барана, а также контролем диагностикума эритроцитарного столбнячного на отсутствие спонтанной агглютинации.

Диагностикум в РПГА должен давать реакцию на 2 креста с ОСО 42-28-246 (Отраслевой стандартный образец активности сыворотки противостолбнячной (ОСО 42-28-246) калиброван в ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России в соответствии с Международным стандартом) активности сыворотки противостолбнячной (4 МЕ в мл) в разведении не ниже 1:1280 и не выше 1:5120 при определении микрометодом.

2.2. В состав набора входят:

- диагностикум эритроцитарный столбнячный;
- эритроциты барана формализированные;
- эритроциты барана контрольные;
- концентрат фосфатно-солевого буфера (концентрат ФСБ);
- концентрат фосфатно-солевого буфера с твином (концентрат ФСБ с твином);
- сыворотка противостолбнячная контрольная 1,0 мл.

Набор выпускается в одном варианте исполнения:

- Диагностикум эритроцитарный столбнячный 5,0 мл – 2 флакона;
- Эритроциты барана формализированные 5,0 мл – 2 флакона;
- Эритроциты барана контрольные 5,0 мл – 1 флакон;
- Концентрат фосфатно-солевого буфера (концентрат ФСБ) 3,2 мл – 4 флакона;
- Концентрат фосфатно-солевого буфера с твином (концентрат ФСБ с твином) 6,4 мл – 4 флакона;
- Сыворотка противостолбнячная контрольная 1,0 мл – 1 флакон;
- Инструкция по применению;
- Паспорт качества;

Набор рассчитан на проведение 160 анализов

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Чувствительность выявления столбнячного антитоксина определяется по восьми образцам положительных проб рабочей панели предприятия, РПП-СТ-01, содержащих столбнячный антитоксин – 100%.

3.2. Специфичность выявления столбнячного антитоксина определяется по восьми образцам проб рабочей панели предприятия РПП-СТ-01, не содержащих столбнячный антитоксин - 100%.

Ожидаемые значения

Титр 1:10 - серонегативный результат, не обладает защитными свойствами. В случае наличия вакцинации, титр столбнячного антитоксина увеличивается, что свидетельствует о наличии защитных антител.

3.3. Не обнаружено перекрестной реактивности со следующими потенциальными интерферентами:

- гемоглобин (гемолизированные эритроциты) – не более 150 г/л;
- триглицериды – не более 11 ммоль/л;
- билирубин – не более 120 мкмоль/л;
- вирус иммунодефицита человека (ВИЧ);
- вирус гепатита В (ВГВ);
- вирус гепатита С (ВГС);
- *Treponema pallidum*;
- Ревматоидный Фактор, 500Е/мл;
- Цитомегаловирус;
- Вирус Эпштейна-Барр;
- Вирус краснухи;
- *Toxoplasma gondii*;
- лекарственными средствами:
- Ацетилцистеин, 150 мг/л;
- Ампициллин, 1000 мг/л;

- Аскорбиновая кислота, 300 мг/л;
- Циклоспорин, 5 мг/л;
- Цефокситин, 2500 мг/л;
- Гепарин, 5000 Ед/л;
- Леводопа, 20 мг/л;
- Метилдопа, 20 мг/л;
- Метронидазол, 200 мг/л;
- Фенилбутазон, 400 мг/л;
- Доксициклин, 50 мг/л;
- Ацетилсалициловая кислота, 1000 мг/л;
- Рифампицин, 60 мг/л;
- Ацетаминофен, 200 мг/л;
- Ибупрофен, 500 мг/л;
- Теофиллин, 100мг/л.

3.4. Диагностические характеристики:

В результате проведения испытаний 600 образцов биоматериала, содержащих и не содержащих столбнячный антитоксин, получены результаты:

Столбнячный антитоксин выявлен у 100 пациентов:

Таким образом, диагностическая специфичность с доверительной вероятностью 95% составила 97,05%-100%.

Столбнячный антитоксин в защитном титре не выявлен у 500 пациентов:

Таким образом, диагностическая чувствительность с доверительной вероятностью 95% составила 99,40%-100%.

Полученный результат не может использоваться в качестве единственного показателя для диагностики заболеваний, но используется в сочетании с другими лабораторными показателями и другой диагностической информацией.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.

4.1. Потенциальный риск применения – класс 26 (Приказ № 4н от 06.06.2012 «Об утверждении номенклатурной классификации медицинских изделий» (с изменениями на 25 сентября 2014 года).

4.2. Все компоненты комплекта в используемых концентрациях являются нетоксичными и безопасными. Однако, исследуемые клинические образцы, а также сточные растворы, оборудование и материалы, находящиеся с ними в контакте, представляют собой потенциально инфекционный материал, и обращаться с ними следует, соблюдая технику безопасности. Следует избегать любого контакта компонентов набора реагентов со слизистыми оболочками. При работе с медицинским изделием следует надевать одноразовые защитные перчатки. Отработанные реагенты обезвреживают в 3% растворе хлорамина или в 6% растворе перекиси водорода в течение 24 часов или автоклавированием под давлением 0,11 Мпа при 120°C в течение 24 часов. Оборудование дезинфицируют до и после работы 70% этиловым спиртом.

4.3. При использовании комплекта образуются отходы классов А и Б.

4.4. При работе следует соблюдать требования ГОСТ Р 52905-2007 «Лаборатории медицинские. Требования безопасности» и СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий», СанПин 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

4.5. Удалять неиспользованные реактивы необходимо в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-

противоэпидемических (профилактических) мероприятий», МУ 287-113 по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения.

4.6. Реагенты в соответствии с СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий» относится к классу Б (эпидемиологически опасные отходы). Применять МИ строго по назначению, согласно инструкции.

4.7. Противопоказаний в рамках установленного назначения не имеет.

4.8. Не использовать Набор реагентов, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не соответствует описанию.

4.9. Не использовать Набор реагентов, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.

4.10. Не использовать Набор реагентов по истечении срока годности.

4.11. Набор не содержит тканей, клеток и биологических веществ человеческого происхождения. Набор не содержит веществ, обладающих канцерогенным, мутагенным или влияющим на репродуктивную деятельность человека действием. При использовании по назначению и соблюдении мер предосторожности является безопасным.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

Для проведения реакции необходимы следующие ингредиенты и оснащение:

- испытуемые сыворотки крови человека. Образцы сыворотки крови с выраженным гемолизом, гиперлипидемией и бактериальным ростом исследованию не подлежат. Образцы, предназначенные для исследования, могут храниться от 2° до 8° С не более 7 суток, допустимо их длительное хранение в замороженном состоянии при температуре минус 20° С и ниже. Повторное замораживание размороженных образцов не допускается;
- 0,85% свежеприготовленный раствор натрия хлорида (хч по ФС 42-2572-95) – для разведения испытуемых сывороток;
- диагностикум эритроцитарный столбнячный;
- концентрат фосфатно-солевой буфера (концентрат ФСБ) - для разведения диагностикума и контрольных эритроцитов;
- концентрат фосфатно-солевой буфера с твином (концентрат ФСБ с твином) - для разведения сыворотки противостолбнячной контрольной и для проведения РПГА;
- эритроциты барана формализированные - для адсорбции гетероагглютининов к эритроцитам барана в испытуемых сыворотках;
- эритроциты барана контрольные - для определения полноты адсорбции гетероагглютининов к эритроцитам барана в испытуемых сыворотках;
- сыворотка противостолбнячная контрольная с активностью 4МЕ/мл;
- планшет иммунологический, 96 лунок, V-образное дно;
- пипеточные дозаторы.

5.1.1. Подготовка оснащения, растворов и диагностикума к проведению РПГА

Содержимое флакона с концентратом ФСБ разводят до объема 62,5 мл дистиллированной водой. Используют в день проведения реакции, pH готового раствора должен быть от 7,15 до 7,25. Используют в течение 24 ч.

Содержимое флакона с концентратом ФСБ с твином разводят до объема 125 мл дистиллированной водой, pH готового раствора должен быть от 7,15 до 7,25. Разведенный раствор можно разлить по флаконам, герметически укупорить хранить при температуре от 5 до 8 °С в течение 70-72 ч.

Сыворотку противостолбнячную контрольную разводят в 40 раз до содержания 0,1 МЕ в 1 мл. Для этого к 3,9 мл разведенного ФСБ с твином добавляют 0,1 мл сыворотки.

При проведении РПГА микрометодом диагностикум эритроцитарный столбнячный разводят в 8 раз. Для этого к 7,0 мл разведенного ФСБ без твина добавляют 1,0 мл 3 % взвеси диагностикума.

Эритроциты барана контрольные при проведении РПГА микрометодом разводят в 8 раз. Для этого к 7,0 мл разведенного ФСБ без твина добавляют 1 мл эритроциты барана контрольные.

5.1.2. Подготовка исследуемых сывороток

Исследуемую сыворотку человека перед определением уровня столбнячного антитоксина разводят 0,85% свежеприготовленным раствором натрия хлорида в 5 раз следующим образом:

- к 0,1 мл исследуемой сыворотки добавляют 0,4 мл 0,85 % раствора натрия хлорида;
- разведенную сыворотку прогревают в течение 30-31 мин в водяной бане при температуре 55-56 °С. Разведенную и прогретую сыворотку адсорбируют эритроцитами барана формализированными, которые перед использованием встряхивают до получения однородной взвеси. Эритроциты добавляют из расчета 0,05 мл на 1 мл разведенной сыворотки, выдерживают 15-20 часов при температуре от 2 до 8 °С. После сорбции прозрачная надосадочная жидкость готова к исследованию (без предварительного центрифугирования).

5.1.3. Проведение серологической реакции РПГА:

В 12 лунок планшета с V-образными лунками вносят по 0,025 мл разведенного концентрата ФСБ с твином, затем в первую лунку вносят 0,025 мл разведенной в 5 раз испытуемой прогретой, адсорбированной сыворотки, тщательно перемешивают, получают разведение 1:10 и, перенося по 0,025 мл раствора из предыдущей лунки в последующую, делают двукратные разведения сыворотки до 10 лунки включительно. Из 10 лунки 0,025 мл раствора удаляют. Флаконы с разведенным диагностикумом эритроцитарным столбнячным встряхивают до образования однородной взвеси и в каждую лунку вносят по 0,025 мл диагностикума эритроцитарного столбнячного.

Проведение реакции сопровождают следующими контролями:

- испытуемой сыворотки на отсутствие агглютининов к эритроцитам барана. В 11 лунку каждого ряда вносят 0,025 мл испытуемой сыворотки, разведенной 1:5, прогретой, адсорбированной из 11 лунки 0,025 мл переносят в 12 лунку, из 12 лунки 0,025 мл удаляют, и добавляют в обе лунки по 0,025 мл разведенной в 8 раз 3 % взвеси эритроцитов барана контрольных.
- контроль на активность диагностикума эритроцитарного столбнячного и отсутствие спонтанной агглютинации: РПГА проводят с сывороткой противостолбнячной контрольной, разведенной в 40 раз. В два ряда по 12 лунок планшета вносят по 0,025 мл разведенного ФСБ с твином. В первую лунку каждого ряда добавляют по 0,025 мл разведенной сыворотки, получают разведение 1:80, содержимое лунок тщательно перемешивают и, перенося по 0,025 мл раствора из предыдущей лунки в последующую, делают двукратные разведения сыворотки до 10 лунки включительно. Из 10 лунки 0,25 мл раствора удаляют.

Флакон с разведенным диагностикумом эритроцитарным столбнячным тщательно встряхивают до образования однородной взвеси эритроцитов и вносят по 0,025 мл разведенного диагностикума эритроцитарного столбнячного в каждую лунку до конца ряда. 11 и 12 лунки являются контролем диагностикума эритроцитарного столбнячного на отсутствие спонтанной агглютинации.

Равномерное распределение эритроцитов в лунках планшета достигается путем постукивания по углам планшета. Планшет оставляют на ровной поверхности в течение 2,5-3,5 часов при температуре 20-22 °С (перемещение планшета до учета реакции исключается). Учет реакции проводят не ранее, чем через 2,5 часа. Допустимо проводить учет реакции в течение 24 часов.

6. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Учет реакции проводят визуально по степени агглютинации эритроцитов, которую оценивают по следующей схеме:

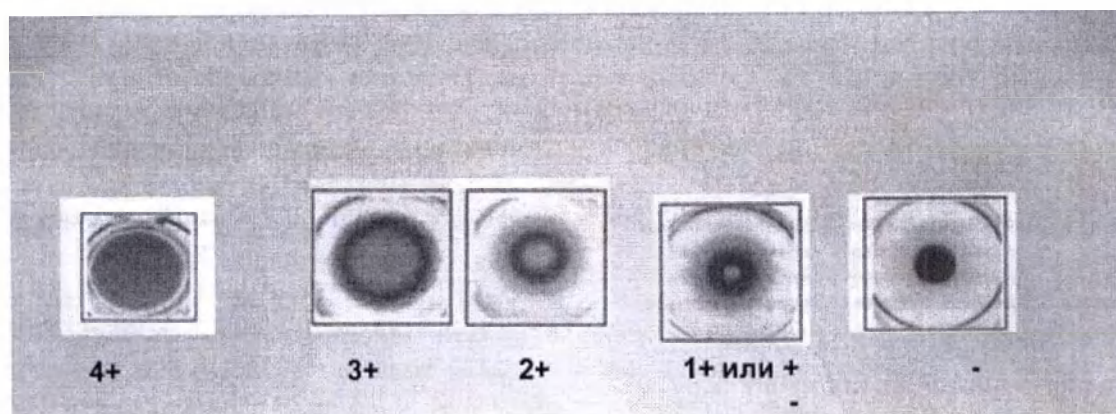
++++ - агглютинировавшие эритроциты ровным слоем выстилают все дно лунки, образуя по форме перевернутый купол; края купола иногда заворачиваются;

+++ - в верхней части агглютината отмечается узкое, плотное кольцо;

++ - в верхней части агглютината отмечается более широкое плотное кольцо из эритроцитов, но меньшее по диаметру;

+ - на дне лунки образуется широкое плотное кольцо из эритроцитов барана с признаками агглютинации по краю осадка;

-- на дне лунки образуется плотный диск или плотное широкое кольцо с полностью гладким краем.



Реакция в контрольных лунках на отсутствие в испытуемой сыворотке агглютининов к эритроцитам барана и на отсутствие спонтанной агглютинации диагностикума эритроцитарного столбнячного должна быть отрицательной.*

За титр испытуемой и контрольной сывороток принимают последнее разведение, дающее агглютинацию эритроцитов на два креста (++).

При определении специфической активности диагностикума эритроцитарного столбнячного агглютинация на два креста с сывороткой противостолбнячной контрольной должна быть при ее разведении не ниже 1:1280 и не выше 1:5120, что соответствует 5-7 лункам. В противном случае диагностикум эритроцитарный столбнячный бракуют и реакцию не учитывают.

*Если в лунках с контрольными эритроцитами отмечается реакция на «+» или «++», необходимо провести повторную адсорбцию испытуемой сыворотки.

Таблица

Интерпретация результатов*

Результат	Интерпретация
$\geq 1:20$	Наличие защитного титра антител к столбняку (столбнячного антитоксина)
$< 1:20$	Отсутствие защитного титра антител к столбняку (столбнячного антитоксина)

* п.6.2. МУ 3.1.2943-11. 3.1. Профилактика инфекционных болезней. Организация и проведение серологического мониторинга состояния коллективного иммунитета к инфекциям, управляемым средствами специфической профилактики (дифтерия, столбняк, коклюш, корь, краснуха, эпидемический паротит, полиомиелит, гепатит В). Методические указания" (утв. Роспотребнадзором 15.07.2011)

7. ОГРАНИЧЕНИЕ МЕТОДА

7.1. Набор «Диагностикум столбнячный – РПГА» предназначен для диагностических целей, однако окончательный диагноз не должен основываться только на результатах данного теста. Диагноз должен быть поставлен врачом после полного клинического и лабораторного обследования пациента.

8. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВКИ И ЭКСПЛУАТАЦИИ

8.1. Транспортирование.

8.1.1. Транспортирование медицинского изделия должно проводиться при температуре от +2° до +8 ° С. Транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида. (СанПиН 3.3686-21 "Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней").

8.1.2. Изделия, транспортированные с нарушением температурного режима, применению не подлежат.

8.2. Хранение.

8.2.1. Хранение изделия осуществляется в сухом, защищенном от прямых солнечных лучей месте, в холодильных камерах или холодильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим в упаковке предприятия-производителя при температуре от +2° до +8° С в течение всего срока годности в соответствии с СанПиН 3.3686-21 "Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней". Замораживание не допускается.

Срок годности – 18 месяцев со дня приемки ОКК предприятия-производителя. Не допускается применение диагностикума столбнячного по истечении срока их годности.

8.2.2. Изделия, хранившиеся с нарушением регламентированного режима, применению не подлежат.

8.3. Эксплуатация.

8.3.1. При использовании набора необходимо придерживаться следующих правил:

- не использовать набор после окончания срока годности.
- не использовать набор, если упаковка повреждена.
- использовать только оборудование, прошедшее метрологическую поверку.
- после использования реагента немедленно закрывайте крышку флакона. Закрывайте каждый флакон своей крышкой.

8.3.2. Все компоненты набора при соблюдении требований данной Инструкции стабильны в течение всего срока годности. Не используйте Набор с истекшим сроком годности. Срок годности набора указан на внешней стороне упаковки.

8.3.3. Неправильное обращение с образцами и изменение процедуры постановки анализа могут повлиять на результаты. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение Инструкции по применению.

8.4. Утилизация.

8.4.1. Изделия, пришедшие в непригодность, в том числе в связи с истечением срока годности, подлежат утилизации.

8.4.2. При использовании диагностикума эритроцитарного столбнячного образуются отходы классов А и Б.

8.4.3. Удалять неиспользованные реактивы необходимо в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-

противоэпидемических (профилактических) мероприятий», СанПиН 3.3686-21 "Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней", МУ 287-113 по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения.

8.4.4. Реагенты в соответствии с СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий» относится к классу Б (эпидемиологически опасные отходы). Применять МИ строго по назначению, согласно инструкции.

8.4.5. Утилизация проводится специализированными организациями, которые имеют лицензию на право утилизации медицинских отходов.

9. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

9.1. Производитель гарантирует соответствие выпускаемых изделий требованиям нормативной и технической документации.

Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.

9.2. Производитель отвечает за недостатки изделия, за исключением дефектов, возникших вследствие нарушения правил пользования, условий транспортирования и хранения, либо действия третьих лиц, либо непреодолимой силы.

9.3. Производитель обязуется за свой счет заменить изделие, технические и функциональные характеристики (потребительские свойства) которого не соответствуют нормативной и технической документации, если указанные недостатки явились следствием скрытого дефекта материалов или некачественного изготовления изделия производителем.

9.4. Основаниями для рекламации являются: отсутствие активности, неспецифичность реагентов, нарушение целостности флакона, недостаточные сведения. При составлении рекламации необходимо указать дату получения, номер серии, причины, по которым реагенты признаны негодными. Вместе с рекламацией направляют образцы данной серии реагентов и протокол с результатами проверки. Рекламацию следует направить на предприятие-производитель.

По вопросам качества медицинского изделия

Набор реагентов для выявления и полуколичественного определения столбнячного антитоксина в реакции пассивной гематтлютинации «Диагностикум столбнячный – РПГА» по ТУ 21.20.23-011-96299156-2021 просьба обращаться на предприятие-производитель:

Общество с ограниченной ответственностью «БиоХолд» (ООО «БиоХолд»), 111394; Г.МОСКВА, ВН.ТЕР.Г.МУНИЦИПАЛЬНЫЙ ОКРУГ НОВОГИРЕЕВО, УЛ ПЕРОВСКАЯ; Д. 61/2, СТР.1, тел.+7 (495) 280-35-52; e-mail: info@biohold.ru

Адрес производства:

Общество с ограниченной ответственностью «Научно-Производственное Предприятие «ДиаВита» (ООО «НПП «ДиаВита»), 141074, Московская область, г. Королев, ул. Пионерская, д.4, к. 203

Генеральный директор ООО «БиоХолд»



И.В. Радюшкин

Прошито, пронумеровано
(8) лист (ов)),
скреплено печатью

Генеральный директор ООО
«БиоХолд»



И.В. Радюшкин