

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ООО «БиоХолд»

 И.В. Радюшкин

« 20 » 03 2024 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

**Набор реагентов для выявления и полуколичественного определения дифтерийного антитоксина в реакции пассивной гемагглютинации
«Диагностикум дифтерийный – РПГА»
по ТУ 21.20.23-010-96299156-2021**

1 НАЗНАЧЕНИЕ

- 1.1. Набор реагентов для выявления и полуколичественного определения дифтерийного антитоксина в реакции пассивной гемагглютинации «Диагностикум дифтерийный – РПГА» предназначен для выявления и полуколичественного определения дифтерийного антитоксина в сыворотке крови человека. Дифтерийный антитоксин вырабатывается в ответ на появление *Corynebacterium diphtheriae*, основным фактором патогенности которого является крайне ядовитый дифтерийный белковый экзотоксин. Данный тест служит вспомогательным средством при диагностике дифтерии. Применение медицинского изделия не зависит от популяционных и демографических аспектов. Для диагностики *in vitro*.
- 1.2. Метод основан на определении уровня дифтерийного антитоксина с помощью реакции пассивной гемагглютинации в сыворотке крови человека (РПГА).
- 1.3. Диагностикум эритроцитарный дифтерийный представляет собой 3 % взвесь формализированных танизированных эритроцитов барана, sensibilized дифтерийным 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 клинико-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 дифтерийного антитоксина с помощью реакции пассивной гемагглютинации в сыворотке крови человека (РПГА).

Для определения специфической активности препарата в лунки планшета вносят разведенную стандартную противодифтерийную сыворотку и добавляют дифтерийный эритроцитарный диагностикум. Реакцию сопровождают контролем стандартной сыворотки

противодифтерийной на отсутствие агглютининов к эритроцитам барана, а также контролем диагностикума эритроцитарного дифтерийного на отсутствие спонтанной агглютинации.

Диагностикум дифтерийный в РПГА должен давать реакцию на два креста с ОСО 42-28-255 (Отраслевой стандартный образец активности сыворотки противодифтерийной (ОСО 42-28-255) калиброван в ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России в соответствии с Международным стандартом) активности сыворотки противодифтерийной, содержащим 10 МЕ в 1 мл, в разведении не ниже 1:3200 и не выше 1:12800 при определении микрометодом.

2.2. В состав набора входят:

- диагностикум эритроцитарный дифтерийный;
- эритроциты барана формализированные;
- эритроциты барана контрольные;
- концентрат фосфатно-солевого буфера (концентрат ФСБ);
- концентрат фосфатно-солевого буфера с твином (концентрат ФСБ с твином);
- сыворотка противодифтерийная контрольная.

Комплект выпускается в одном варианте исполнения:

1. Набор:

- Диагностикум эритроцитарный дифтерийный 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 противодифтерийная контрольная 1,0 мл – 1 флакон;
- Инструкция по применению;
- Паспорт качества.

Набор рассчитан на проведение 160 анализов

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Чувствительность выявления дифтерийного антитоксина определяется по восьми образцам положительных проб рабочей панели предприятия, РПП-CD-01, содержащих дифтерийный антитоксин – 100%.

3.2. Специфичность выявления дифтерийного антитоксина определяется по восьми образцам проб рабочей панели предприятия РПП-CD-01, не содержащих дифтерийный антитоксин - 100%.

Ожидаемые значения

Титр 1:10 - серонегативный результат, не обладает защитными свойствами. В случае наличия вакцинации, титр дифтерийного 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 дифтерийный антитоксин, получены результаты:

Дифтерийный антитоксин в защитном титре не менее 1:20 выявлен у 100 пациентов:

Таким образом, диагностическая чувствительность с достоверной вероятностью 95% составила 97,05%-100%.

Дифтерийный антитоксин в защитном титре не выявлен у 500 пациентов:

Таким образом, диагностическая специфичность с достоверной 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 2Б (Приказ № 4н от 06.06.2012 «Об утверждении номенклатурной классификации медицинских изделий» (с изменениями на 25 сентября 2014 года).

4.2. Все компоненты набора 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 набора образуются отходы классов А и Б.

4.4. При работе следует соблюдать требования ГОСТ Р 52905-2007 «Лаборатории медицинские. Требования безопасности», 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, допускается использование сывороток, хранившихся при минус 20оС не более 6 месяцев. Повторное замораживание размороженных образцов не допускается;
- 0,85% свежеприготовленный раствор натрия хлорида (хч по ФС 42-2572-95) – для разведения испытуемых сывороток;
- диагностикум эритроцитарный дифтерийный;
- 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 противодифтерийной контрольной и для проведения РПГА;
- эритроциты барана формализированные - для адсорбции гетерогемагглютининов к эритроцитам барана в испытуемых сыворотках;
- эритроциты барана контрольные - для определения полноты адсорбции гетерогемагглютининов к эритроцитам барана в испытуемых сыворотках;
- сыворотка противодифтерийная контрольная с активностью 10МЕ/мл;

- планшет иммунологический, 96 лунок, V-образное дно;
- пипеточные дозаторы.

5.1.1. Подготовка оснащения, растворов и диагностикума к проведению РПГА:

1. Содержимое флакона с концентратом ФСБ разводят до объема 62,5 мл дистиллированной водой. pH готового раствора должен быть от 7,15 до 7,25. Используют в течении 24 ч.
2. 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.
3. Сыворотку противодифтерийную контрольную разводят в 100 раз до содержания 0,1 МЕ в 1 мл. Для этого к 9,9 мл разведенного ФСБ с твином добавляют 0,1 мл сыворотки.
4. При проведении РПГА микрометодом диагностикум эритроцитарный дифтерийный разводят в 8 раз. Для этого к 7,0 мл разведенного концентрата ФСБ без твина добавляют 1,0 мл 3 % взвеси диагностикума.
5. Эритроциты барана контрольные при проведении РПГА микрометодом разводят в 8 раз. Для этого к 7,0 мл разведенного концентрата ФСБ без твина добавляют 1 мл эритроциты барана контрольные.

5.1.2. Подготовка исследуемых сывороток.

Исследуемую сыворотку человека перед определением уровня дифтерийного 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 дифтерийным встряхивают до образования однородной взвеси и в каждую лунку вносят по 0,025 мл диагностикума эритроцитарного дифтерийного.

Проведение реакции сопровождают следующими контролями:

- испытуемой сыворотки на отсутствие агглютининов к эритроцитам барана контрольным. 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 взвеси эритроцитов барана контрольных.

- контроль на активность диагностикума и отсутствие спонтанной агглютинации: РПГА проводят с сывороткой противодифтерийной контрольной, разведенной в 100 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 1:200, содержимое лунок тщательно перемешивают и, перенося по 0,025 мл раствора из предыдущей лунки в последующую, делают двукратные разведения сыворотки до 10 лунки включительно параллельно в двух рядах. Из 10 лунки 0,25 мл раствора удаляют.

Флакон с разведенным диагностикумом эритроцитарным дифтерийным тщательно встряхивают до образования однородной взвеси эритроцитов и вносят по 0,025 мл разведенного диагностикума эритроцитарного дифтерийного в каждую лунку до конца ряда. 11 и 12 лунки являются контролем диагностикума эритроцитарного дифтерийного 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 И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

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

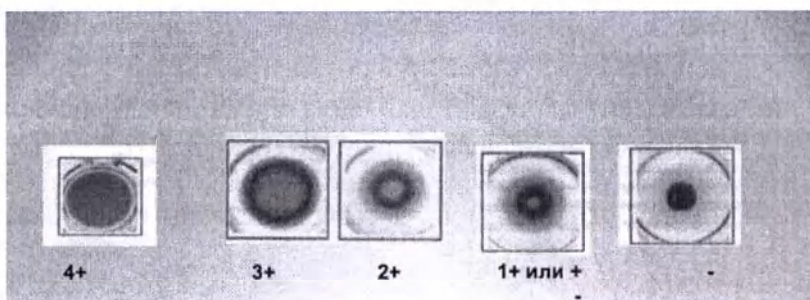
++++ - агглютинировавшие эритроциты ровным слоем выстилают все дно лунки, образуя по форме перевернутый купол; края купола иногда заворачиваются;

+++ - 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 контрольным и на отсутствие спонтанной агглютинации диагностикума должна быть отрицательной.*

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

При определении специфической активности диагностикума эритроцитарного дифтерийного агглютинация на два креста с сывороткой противодифтерийной контрольной должна быть при ее разведении не ниже 1:3200 и не выше 1:12800, что соответствует 5-7 лункам. В противном случае диагностикум 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 дифтерии (дифтерийного антитоксина)
$< 1:20$	Отсутствие защитного титра антител к дифтерии (дифтерийного 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 дифтерийный – 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 +10 ° 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 набора по истечении срока их годности.

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

8.3. Эксплуатация.

8.3.1. При использовании медицинского изделия 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 набора 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» относятся 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 дифтерийного антитоксина в реакции пассивной гемагглютинации «Диагностикум дифтерийный – РПГА» по ТУ 21.20.23-010-96299156-2021 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
(9 лист (ов)),
скреплено печатью

Генеральный директор ООО
«БиоХолд»



И.В. Радюшкин