

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ООО «БиоХолд»



И.В. Радюшкин

2024 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Диагностикум для выявления и полуколичественного определения агглютинирующих антител к возбудителю коклюша в реакции агглютинации «Диагностикум коклюш - РА» по ТУ 21.20.23-009-96299156-2021

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Диагностикум для выявления и полуколичественного определения агглютинирующих антител к возбудителю коклюша в реакции агглютинации «Диагностикум коклюш - РА» предназначен для определения агглютинирующих антител к возбудителю коклюша в реакции агглютинации в сыворотке крови человека.

Диагностикум служит основным средством по оценке наличия иммунитета и выявлению лиц, подлежащих иммунизации. Применение медицинского изделия не зависит от популяционных и демографических аспектов. Для диагностики *in vitro*.

1.2. Коклюш - острая антропонозная бактериальная инфекция, сопровождающаяся катаральными явлениями в верхних дыхательных путях и приступообразным спазматическим кашлем.

Коклюш – острое инфекционное заболевание с воздушно- капельным механизмом передачи, вызываемое *Bordetella pertussis*, относящееся к роду *Bordetella*, и характеризующееся циклическим течением с преимущественным поражением слизистой оболочки гортани, трахеи, бронхов и развитием судорожного приступообразного кашля.

Род *Bordetella* относятся к роду бактерий из семейства *Alcaligenaceae* и включает 9 видов: *B. anserpilis*, *B. avium*, *B. bronchiseptica*, *B. hinzii*, *B. holmesii*, *B. parapertussis*, *B. pertussis*, *B. petrii*, *B. Trematum*. Для человека патогенными являются виды *B. pertussis* (палочка Борде-Жангу, возбудитель коклюша) и *B. parapertussis* (возбудитель паракоклюша). Иногда у человека развивается респираторное заболевание по типу ОРВИ, вызванное *B. Bronchiseptica* – возбудителем коклюшеподобного заболевания у животных (собак, кошек, кроликов). *B. avium* является возбудителем заболевания преимущественно у птиц. Появляются сообщения об обнаружении у людей (чаще с иммунодефицитами) *B. hinzii*, *B. holmesii*, *B. trematum*.

Бордетеллы представляют собой короткие грамтрицательные палочки овоидной формы (коккобациллы) размером 0,2-0,3х0,4-1,2 мкм. Клетки располагаются отдельно или группами. При окраске толуидиновым синим они окрашиваются биполярно за счет зерен волютина. Клетки возбудителей коклюша и паракоклюша неподвижные. Клетки других видов бордетелл (*B. bronchiseptica*, *B. avium*, *B. hinzii*, *B. trematum*) обладают подвижностью. Бордетеллы не образуют спор. У возбудителя коклюша имеются пили. У бактерий из колоний S-формы выявляется нежная микрокапсула.

Коклюш является высоко контагиозной инфекцией. В естественных условиях к коклюшу восприимчив только человек. Источником инфекции являются люди, больные типичными и стертыми формами инфекции. Наиболее заразен больной в катаральном

периоде, но выделение возбудителя происходит на протяжении всей болезни, включая период угасания (разрежения).

Механизм заражения – аэрогенный. Путь передачи – воздушно-капельный. Радиус распространения возбудителя больным коклюшем ограниченный в связи с нестойкостью коклюшного микроба во внешней среде и высокой вязкостью мокроты. Заражения коклюшем через различные предметы обихода не наблюдается, так как возбудитель нестойкий во внешней среде. Большинство заболеваний регистрируется у детей в возрасте до пяти лет. Восприимчивость детей к коклюшу очень высокая: заболевает до 90% контактировавших лиц. В условиях массовой вакцинации коклюш нередко встречается у взрослых, поскольку поствакцинальный иммунитет через 3 года после иммунизации постепенно снижается. Наиболее тяжело коклюш протекает у детей первого года жизни, среди них регистрируется наиболее высокая летальность. После введения специфической профилактики заболеваемость упала в 100-150 раз, и в клинической практике преобладают умеренно выраженные и стертые формы болезни (до 95%).

Коклюш является эпидемической инфекцией (вызывает эпидемии), а паракоклюш – неэпидемической (вызывает спорадические случаи заболевания). При коклюше отмечается осенне-зимняя сезонность: заболевания регистрируются с сентября по апрель, максимальная заболеваемость отмечается в декабре. Бактерионосительство наблюдается у 1-2% детей в возрасте старше 10 лет, привитых против коклюша или переболевших этой инфекцией. У детей младшего возраста случаи бактерионосительства встречаются очень редко. Длительность носительства не превышает 2 недель.

Серотипирование *B. pertussis* в отечественной практике основано на агглютинации бактериальных клеток монофакторными сыворотками, т.е. антителами к агглютиногенам, в реакции агглютинации (РА) на стекле с цельноклеточным диагностикумом, в которой определяются агглютинирующие антитела к агглютиногенам.

Бактерия прихотлива, и её культивируют на специальных средах (картофельно-глицериновом агаре, казеиново-угольном агаре и др.). На плотных средах образует небольшие сероватые блестящие колонии, напоминающие капельки ртути или жемчужины. Обладает сложной антигенной структурой. Три основных серовара возбудителя коклюша различают по вирулентности. Возбудитель образует термолабильный дерматонекротоксин, трахеальный цитотоксин и термостабильный эндотоксин. Бактерии не очень устойчивы во внешней среде и погибают под действием прямого солнечного света через 1 ч, при температуре 56 °С — в течение 15—30 мин. Быстро погибают под воздействием дезинфицирующих веществ. В сухой мокроте сохраняются в течение нескольких часов.

Коклюш дифференцируют от острых респираторных вирусных заболеваний, бронхитов, пневмоний, а также стриктур бронхов различной этиологии, бронхиальной астмы, инородных тел в бронхах.

Поствакцинальный иммунитет не всегда предохраняет от заболевания. Коклюш в этих случаях протекает в виде легких и стертых форм инфекции, которые диагностируются, в основном, ретроспективно (серологически). После перенесенного заболевания остается более длительный иммунитет.

Реакция агглютинации (РА) с антигенами диагностикума коклюшного заключается в обнаружении в исследуемой сыворотке специфических антител. Исследования производят на 2-3-й неделе заболевания, когда в крови больных появляются специфические антитела. Результаты РА имеют диагностическое значение при изучении их в динамике, исследуя парные сыворотки больного с интервалом 1 - 2 недели.

1.3. Тип анализируемого образца

Определение производится из сыворотки крови человека.

1.4. Требования к квалификации пользователей. Медицинский персонал клиничко-диагностических лабораторий. Для работы с Диагностикумом необходимо участие специалистов с высшим и средним специальным образованием, прошедших специальную

подготовку и допущенных к работе с микроорганизмами в соответствии с СанПиН 3.3686-21.

1.5. Функциональное назначение Диагностикума состоит в выявлении специфических антител к *Bordetella pertussis*.

1.6. Показанием к применению Диагностикума являются комплексная диагностика наличия специфического иммунитета к коклюшу у всех групп населения.

1.7. Противопоказанием к применению является нарушение целостности первичной упаковки, истекший срок годности, нарушения условий хранения, не соблюдение требований инструкции.

1.8. Принцип действия. При наличии в исследуемом образце антител к *B. Pertussis* они связываются с антигенами диагностикума с образованием осадка, реакцию агглютинации учитывают через 24 ч. невооруженным глазом или используя агглютиноскоп.

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

1.9. Диагностикум коклюшный предназначен для диагностики *in vitro*.

1.10. Область применения - Профессиональное применение в клинической лабораторной диагностике, в клинко-диагностических и бактериологических лабораториях учреждений медицины и здравоохранения.

1.11. Требования к квалификации пользователей. Для работы с медицинским изделием необходимо участие специалистов с высшим и средним специальным образованием, прошедших специальную подготовку и допущенных к работе с микроорганизмами в соответствии с СП 1.3.2322-08.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода

При наличии в исследуемом образце антител к *B. Pertussis* они связываются с антигенами диагностикума с образованием осадка, реакцию агглютинации учитывают через 24 ч. невооруженным глазом или используя агглютиноскоп.

2.2. В состав медицинского изделия входят следующие компоненты

Диагностикум коклюшный жидкий представляет собой взвесь коклюшных микроорганизмов 1 фазы, инаktivированных формалином.

В 1,0 мл диагностикума коклюшного содержится $(20,0 \pm 2,0)$ МЕ коклюшных бактерий. Консервант - мертиолят.

2.3. Набор:

- Диагностикум коклюшный жидкий 5,0 мл – 10 ампул.
- Инструкция по применению.
- Паспорт качества.

Число анализируемых проб – диагностикум рассчитан на 400 исследований, включая контроли.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Чувствительность выявления и полуколичественного определения агглютинирующих антител к возбудителю коклюша в реакции агглютинации определяется по двадцати четырем образцам положительных проб рабочей панели предприятия Ч1-Ч24 РПП ВР (РПП-ВР-01), содержащих антитела к *B. Pertussis* – 100%.

3.2. Специфичность выявления агглютинирующих антител к возбудителю коклюша в реакции агглютинации определяется по двадцати четырем отрицательным образцам рабочей панели предприятия С1-С24 РПП ВР (РПП-ВР-01), не содержащих антитела к *B. Pertussis* - 100%.

3.3. Потенциальные интерференции:

Не обнаружено перекрестной реактивности со следующими потенциальными интерферентами:

Не обнаружено перекрестной реактивности со следующими потенциальными интерферентами:

- гемоглобин (гемолизированные эритроциты) – не более 10 г/л;
- триглицериды – 1 ммоль/л;
- билирубин – 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, 50 мг/л;
- Ампициллин, 400 мг/л;
- Аскорбиновая кислота, 200 мг/л;
- Циклоспорин, 5 мг/л;
- Цефокситин, 800 мг/л;
- Гепарин, 2000 Ед/л;
- Леводопа, 10 мг/л;
- Метилдопа, 20 мг/л;
- Метронидазол, 70 мг/л;
- Фенилбутазон, 200 мг/л;
- Доксциклин, 20 мг/л;
- Ацетилсалициловая кислота, 400 мг/л;
- Рифампицин, 35 мг/л;
- Ацетаминофен, 70 мг/л;
- Ибупрофен, 200 мг/л;
- Теофиллин, 40 мг/л.
- Мидекамицин, не более 25 мкг/л

*Не обнаружено перекрестной реакции с *B. Parapertusis* с подтвержденным титром 1:80 диагностикума паракклюшного в сыворотке крови.*

3.4. Диагностические характеристики:

В ходе проведения клинико-лабораторных испытаний, антитела к возбудителю коклюша в защитном титре не менее 1:160 выявлены у 306 пациентов:

Таким образом, диагностическая чувствительность с доверительной вероятностью 95% составила 99,03%-100%.

Антитела к возбудителю коклюша в защитном титре не выявлены у 166 пациентов:

Таким образом, диагностическая специфичность с доверительной вероятностью 95% составила 98,21%-100%.

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

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И БЕЗОПАСНОСТИ

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). В процессе производства используются микроорганизмы 3 класса патогенности. В готовом продукте живые патогенные микроорганизмы отсутствуют.

4.2. Диагностикум изготавливается в соответствии с требованиями безопасности производственных процессов (ГОСТ 12.3.002) на оборудовании с использованием ГОСТ

12.2.003. Диагностикум коклюшный предназначен только для *in vitro* диагностики. Все работы должны проводиться в соответствии с требованиями, изложенными в Инструкциях по технике безопасности, утвержденных генеральным директором предприятия.

4.3. В процессе производства диагностикума коклюшного отработанные питательные среды после выращивания культур *B. pertussis* обеззараживаются автоклавированием при 132°C (2 ат) в течение 2 часов и выливаются в спецканализацию. При случайном попадании микробной массы на окружающие предметы необходимо залить их 6% раствором перекиси водорода на 2 ч., а затем тщательно вымыть с использованием любого моющего средства.

4.4. Все компоненты Реагента 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 Реагента со слизистыми оболочками. При работе с медицинским изделием следует надевать одноразовые защитные перчатки. Отработанные реагенты обезвреживаются 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.

4.5. При использовании Диагностикума образуются отходы классов А и Б.

Утилизацию или уничтожение, дезинфекцию Диагностикума следует проводить в соответствии с СанПиН 2.1.3684-21, СанПиН 3.3686-21 и МУ 287-113.

4.6. Перечень рисков, связанных с применением изделия согласно ГОСТ ISO 14971, приведен в Файле менеджмента риска.

4.7. Противопоказаний в рамках установленного назначения не имеет.

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

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

4.10. Не использовать Диагностикум по истечении срока годности.

4.11. Диагностикум не содержит тканей, клеток и биологических веществ человеческого происхождения. Реагент 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

- Пробирки медицинские полимерные или агглютинационные;
- Флаконы для предварительного разведения образцов.
- Пипетки градуированные.
- 0,9 % раствор NaCl.
- Агглютиноскоп.
- Термостат (температура 20-40°C).
- ОСО 42-28-85 (ОСО на 10 единиц мутности ориентировочно соответствует следующим концентрациям клеток в 1 мл: 11×10^9 клеток/мл для микробов коклюшной группы).

5.1. Анализируемые пробы

Сыворотка 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.

5.2. Подготовка исследуемых образцов

Исследуемые образцы развести 0,9 % раствором NaCl в соотношении 1:10, для чего 100 мкл каждого образца внести в 0,9 % раствор NaCl.

Из полученного разведения 1:10 исследуемых образцов приготовить последовательные двукратные разведения (1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 1:640, 1:1280, 1:2560, 1:5120) в 0,9 % растворе NaCl, для чего 500 мкл разведения 1:10 внести в пробирку с 500 мкл 0,9 % раствора NaCl, тщательно перемешать пипетированием, 500 мкл полученного разведения (1:20) внести в следующую пробирку с 500 мкл в 0,9 % раствора NaCl, тщательно перемешать пипетированием и так – до последнего разведения, из которого удалить лишние 500 мкл.

В случае необходимости, ряд разведений можно продолжить.

Из каждого полученного разведения отобрать по 250 мкл и внести в соответствующую пробирку второго ряда.

5.3. Приготовление рабочего разведения диагностикума коклюшного

Ампулу с диагностикумом коклюшным вскрыть и приготовить его рабочее разведение с мутностью 10 МОЕ/мл, для чего к 1,0 мл диагностикума коклюшного добавить 1,0 мл 0,9 % раствор NaCl.

Диагностикум коклюшный следует готовить из расчета по 1,25 мл диагностикума и 1,25 мл 0,9 % раствора NaCl на один исследуемый образец.

5.4. Проведение исследования (анализа)

5.4.1. Выявление и определение титра антител к возбудителю коклюша.

Приготовить один ряд по 10 пробирок.

В 10 пробирок внести по 0,25 мл каждого разведения исследуемого образца и по 0,25 мл рабочего разведения диагностикума коклюшного.

Для контроля спонтанной агглютинации:

В одну пробирку внести 0,25 мл исследуемого образца в разведении 1:10 и 0,25 мл 0,9 % раствора NaCl (контроль 1);

В одну пробирку внести 0,25 мл рабочего разведения диагностикума коклюшного и 0,25 мл 0,9 % раствора NaCl (контроль 2);

После этого пробирки встряхнуть, поместить в термостат на 2 ч при температуре 37°C и затем оставить при температуре от 18° до 25°C на сутки.

5.5. Учет результатов

Реакцию агглютинации учитывают невооруженным глазом или агглютиноскопом через 24 часа по схеме:

- 4 креста - полная агглютинация: большой плотный осадок, чётко виден «зонтик», полное просветление надосадочной жидкости; после лёгкого встряхивания — крупные хлопья в прозрачной надосадочной жидкости;
- 3 креста - осадок большой, рыхлый, надосадочная жидкость ещё прозрачна, слегка опалесцирует; после лёгкого встряхивания — средние хлопья в слегка опалесцирующей надосадочной жидкости;
- 2 креста - мелкие нестойкие хлопья, осадок небольшой, рыхлый, надосадочная жидкость непрозрачна, после лёгкого встряхивания — мелкие нестойкие хлопья;
- 1 крест — следы агглютинации: в центре небольшой осадок, надосадочная жидкость непрозрачна;
- отрицательная реакция — осадка нет или небольшой компактный осадок в центре дна пробирки, взвесь равномерно мутная.

Оценка результатов контроля: контрольные пробирки с сывороткой и раствором натрия хлорида должны быть прозрачными. В пробирках с диагностикумом коклюшным и раствором натрия хлорида должна быть однородная взвесь желтовато-молочного цвета.

Положительной реакцией считают наибольшее разведение сыворотки, при котором получают реакцию агглютинации, оцениваемую не менее чем на три креста.

Для определения иммунологических сдвигов в организме больного реакцию агглютинации ставят на протяжении болезни в динамике и парные сыворотки должны быть исследованы с одной и той же серией диагностикума коклюшного.

Четырехкратное и выше нарастание титра специфических антител может свидетельствовать о наличии или перенесённом заболевании.

У вакцинированных серологическое исследование проводят через 1,5 месяца после третьей прививки или ревакцинации. Титр антител 1:160 и более условно принят за защитный титр.

Для исключения паракоклюшной инфекции испытуемую сыворотку параллельно проверяют с диагностикумом паракоклюшным по той же методике.

6. ОГРАНИЧЕНИЕ МЕТОДА

Диагностикумы коклюшные предназначены 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.

7. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВКИ И ЭКСПЛУАТАЦИИ

7.1. Транспортирование.

7.1.1. 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»). Допускается транспортирование при температуре от 9 до 25°С в течение 14 суток.

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

7.2. Хранение.

7.2.1. Хранение комплектов – 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. Замораживание не допускается.

Срок годности – 18 месяцев со дня приемки ОКК предприятия-изготовителя. Не допускается применение диагностикумов коклюшных по истечении срока их годности.

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

7.3. Эксплуатация.

7.3.1. Диагностикум коклюшный должен применяться согласно инструкции по применению, утверждённой в установленном порядке.

7.3.2. Не допускается смешивание или одновременное использование реагентов из разных серий Диагностикума.

7.3.4 Срок годности: 18 месяцев со дня приемки ОКК предприятия-изготовителя. Реагент с истекшим сроком годности применению не подлежит.

8. ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

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

Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.

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

8.3. 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.

По вопросам качества медицинского изделия Диагностикум для выявления и полуколичественного определения агглютинирующих антител к возбудителю коклюша в реакции агглютинации «Диагностикум коклюш -РА» по ТУ 21.20.23-009-96299156-2021 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