

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

АО «Вектор-Бест»

М.Д. Хусаинов

2017 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для иммуноферментного выявления
суммарных антител к микобактериям туберкулеза

(АТ-Туб-Бест)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов для иммуноферментного выявления суммарных антител к микобактериям туберкулеза «АТ-Туб-Бест» (далее по тексту – набор) предназначен для выявления суммарных антител (иммуноглобулинов G, M и A) к микобактериям туберкулеза в сыворотке (плазме) крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА).

1.2. Набор рассчитан на проведение 96 анализов, включая контроли. Для исследования небольшой партии проб возможны 12 независимых постановок ИФА по 8 анализов каждая, включая контроли.

2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

2.1. Принцип метода

Метод определения основан на твердофазном иммуноферментном анализе. Основным реагентом набора являются антигены микобактерий, сорбированные на поверхности лунок полистиролового разборного планшета.

На первой стадии анализа исследуемые и контрольные образцы инкубируют в лунках стрипов с иммобилизованными антигенами микобактерий. Специфические антитела, содержащиеся в исследуемых образцах, связываются с иммобилизованными антигенами. Не

Инструкция составлена сотрудниками АО «Вектор-Бест»: Директором НИИ СД М.Ю. Рукавишниковым, начальником отделения НИИ СД С.С. Решетниковым и с.н.с. С.Е. Гладковой

связавшийся материал удаляют отмывкой. Образовавшийся комплекс «антиген-антитело» выявляют с помощью пероксидазного конъюгата антител к каппа- и лямбда-цепям иммуноглобулинов G, M, A человека. Далее, во время инкубации с раствором тетраметилбензидина происходит окрашивание раствора в лунках. Реакцию останавливают добавлением стоп-реактанта и измеряют оптическую плотность растворов в лунках стрипов.

2.2. Состав набора

В состав набора входят:

- планшет разборный (12 восьмилучных стрипов) с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок антигенами микобактерий, готовый для использования – 1 шт;
- положительный контрольный образец (K^+) на основе инактивированной сыворотки крови человека, содержащий антитела (IgG, IgM и IgA) к микобактериям туберкулеза, готовый для использования – 1 флакон (1,5 мл);
- отрицательный контрольный образец (K^-) на основе инактивированной сыворотки крови человека, не содержащий антитела к микобактериям туберкулеза, готовый для использования – 1 флакон (2,5 мл);
- конъюгат моноклональных антител к лямбда- и каппа-цепям иммуноглобулинов G, M и A человека с пероксидазой хрена, готовый для использования – 1 флакон (13,0 мл);
- раствор для разведения сывороток (PPC) – 2 флакона (по 10,0 мл);
- концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25) – 1 флакон (28,0 мл);
- раствор тетраметилбензидина плюс (раствор ТМБ плюс), готовый для использования – 1 флакон (13,0 мл);
- стоп-реактент, готовый для использования – 1 флакон (12,0 мл);
- планшет для предварительного разведения исследуемых образцов – 1 шт.

Принадлежности:

- пленка для заклеивания планшета – 2 шт.;
- ванночка для реагентов – 2 шт.;
- наконечники для дозаторов на 2-200 мкл – 16 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ*

3.1. Чувствительность выявления суммарных антител к микобактериям туберкулеза – соответствие результатов определения набором суммарных антител к микобактериям туберкулеза требованиям стандартной панели предприятия (СПП, рег. № 05-2-50), аттестованной ОБТК ЗАО «Вектор-Бест» – составляет 100%.

3.2. Специфичность выявления суммарных антител к микобактериям туберкулеза – соответствие результатов определения набором суммарных антител к микобактериям туберкулеза требованиям стандартной панели предприятия (СПП, рег. № 05-2-50), аттестованной ОБТК ЗАО «Вектор-Бест» – составляет 100%.

3.3. Диагностическая чувствительность выявления суммарных антител к микобактериям туберкулеза: клинические испытания, проведенные на 102 положительных образцах сыворотки и плазмы крови, полученных от 77 пациентов, показали 100 % чувствительность (интервал 96,2 % - 100 %, с доверительной вероятностью 90 %);

3.4. Диагностическая специфичность выявления суммарных антител к микобактериям туберкулеза: клинические испытания, проведенные на 158 отрицательных образцах сыворотки и плазмы крови, полученных от 133 пациентов, показали 100 % специфичность (интервал 97,8 % - 100 %, с доверительной вероятностью 90 %).

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2б (приказ МЗ РФ от 06.06.2012 № 4н).

4.2. Все компоненты набора являются нетоксичными. Стоп-реагент обладает раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания стоп-реагента на кожу и слизистые необходимо промыть поражённый участок большим количеством проточной воды.

4.3. При работе с исследуемыми образцами следует соблюдать меры предосторожности, принятые при работе с потенциально инфекционным материалом. Основные правила работы изложены в «Инструкции по мерам профилактики распространения инфекционных заболеваний при работе в клиничко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений», утвержденной Минздравом СССР 17 января 1991 г. и в методических указаниях МУ-287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

4.4. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы сыворотки крови человека следует рассматривать как потенциально инфекционные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирусы гепатита или возбудителей других инфекций.

4.5. Лабораторная посуда и оборудование, которые используются в работе с набором, должны быть соответствующим образом промаркированы и храниться отдельно.

4.6. Запрещается приём пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами.

4.7. Для дезинфекции посуды и материалов, контактировавших с исследуемыми и контрольными образцами, рекомендуем использовать дезинфицирующие средства, не оказывающие негативного воздействия на качество ИФА, не содержащие активный кислород и хлор, например, комбинированные средства на основе ЧАС, спиртов, третичных аминов. Использование дезинфицирующих средств, содержащих активный кислород и хлор (H_2O_2 , деохлор, хлорамин), приводит к серьезному искажению результатов.

4.8. При использовании набора образуются отходы классов А, Б и Г, которые классифицируются и уничтожаются (утилизируются) в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами». Дезинфекцию наборов реагентов следует проводить по МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ:

- Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках планшета в двухволновом режиме: при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620 - 655 нм; допускается измерение только при длине волны 450 нм;
- термостат, поддерживающий температуру $(37 \pm 1)^\circ C$;
- промывочное устройство для планшетов;
- холодильник бытовой;
- дозаторы полуавтоматические одноканальные с переменным объёмом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкости от 5 до 5000 мкл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 5%);
- дозаторы полуавтоматические многоканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкостей от 5 до 300 мкл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 5%);
- цилиндр мерный вместимостью 1000 мл;
- вода дистиллированная;
- перчатки медицинские диагностические одноразовые;
- бумага фильтровальная лабораторная;
- дезинфицирующий раствор.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Для проведения анализа не следует использовать гемолизованную, мутную

сыворотку крови.

6.2. Для проведения анализа можно использовать образцы плазмы, полученной с использованием цитрата натрия в качестве антикоагулянта.

6.3. Образцы сыворотки (плазмы) крови можно хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 5 суток или при температуре минус 20°С (и ниже) не более 6 месяцев.

Следует избегать многократного замораживания/оттаивания, так как это может привести к получению неадекватных результатов. После размораживания образцы следует тщательно перемешать.

6.4. Образцы сывороток крови, содержащие осадок, необходимо очистить центрифугированием при 1500-2000 об/мин в течение 5 минут при температуре от 18 до 25 °С.

7. ПОДГОТОВКА КОМПОНЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

7.1. Перед работой извлечь набор из холодильника, вскрыть упаковку, вынуть все компоненты и выдержать их при температуре от 18 до 25 °С не менее 30 мин.

При дробном использовании набора после отбора части содержимого флаконы сразу плотно закрыть заворачивающимися крышками, поместить в холодильник и хранить при 2–8°С в течение срока годности набора.

7.2. Подготовка планшета.

Вскрыть пакет выше замка и установить на рамку необходимое для проведения анализа количество стрипов. Оставшиеся неиспользованные стрипы немедленно поместить вновь в пакет с влагопоглотителем, удалить из него воздух, плотно закрыть замок и поместить в холодильник.

Хранение: при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности набора.

7.3. Приготовление промывочного раствора.

В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов) внести в мерный цилиндр необходимое количество ФСБ-Т×25 и довести до соответствующего объёма дистиллированной водой. При выпадении осадка солей в концентрате необходимо прогреть его при температуре от 30 до 40 °С до полного растворения осадка.

В таблице приведен расход реагента в зависимости от количества используемых стрипов.

Хранение: при температуре от 2 до 8 °С не более 5 суток.

7.4. Подготовка контрольных образцов.

Положительный и отрицательный контрольные образцы готовы к использованию и не требуют дополнительного разведения.

Хранение: при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности набора

7.5. Подготовка исследуемых образцов.

Исследуемые образцы развести в 10 раз раствором для разведения сывороток. Для этого внести в лунки вспомогательного планшета по 90 мкл РРС и добавить по 10 мкл цельного образца сыворотки (плазмы), тщательно перемешать.

Хранение: не более 3 ч при температуре от 18 до 25°C.

7.6. Подготовка конъюгата

Конъюгат готов к использованию.

В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов) отобрать в пластиковую ванночку для реагента необходимое количество конъюгата.

Остатки конъюгата из ванночки утилизировать (не сливать во флакон с исходным конъюгатом).

Хранение: при температуре от 2 до 8 °C в течение всего срока годности.

Таблица расхода компонентов набора реагентов

Количество используемых стрипов	Промывочный раствор		Конъюгат, мл	Раствор ТМБ плюс, мл
	ФСБ-Т× 25, концентрат мл	Дистиллированная вода, мл		
1	2,0	до 50	1,0	1,0
2	4,0	до 100	2,0	2,0
3	6,0	до 150	3,0	3,0
4	8,0	до 200	4,0	4,0
5	10	до 250	5,0	5,0
6	12,0	до 300	6,0	6,0
7	14,0	до 350	7,0	7,0
8	16,0	до 400	8,0	8,0
9	18,0	до 450	9,0	9,0
10	20,0	до 500	10,0	10,0
11	22,0	до 550	11,0	11,0
12	24,0	до 600	12,0	12,0

7.7. Подготовка раствора тетраметилбензидина плюс.

Исключить воздействие прямого света на раствор тетраметилбензидина плюс. Непосредственно перед внесением и в соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов) отобрать необходимое количество раствора ТМБ плюс в чистый флакон или в пластиковую ванночку для реагента.

Утилизировать раствор тетраметилбензидина, оставшийся в ванночке или флаконе после проведения ИФА (не сливать во флакон с исходным раствором).

Внимание! Для работы с раствором ТМБ плюс необходимо использовать только одноразовые наконечники. Посуду, предназначенную для раствора ТМБ плюс, нельзя отмывать с применением синтетических моющих средств, поскольку даже их следы ведут к

неконтролируемому окислению ТМБ плюс в ходе реакции. После работы посуду ополоснуть водой, промыть 70% этиловым спиртом и тщательно отмыть дистиллированной водой.

Хранение: при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности.

7.8. Подготовка стоп-реактента.

Стоп-реактент готов к использованию.

Хранение: при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности.

8. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

8.1. Внесение контрольных образцов и исследуемых образцов.

Внести в лунку А-1 100 мкл положительного контрольного образца (K^+). В лунки В-1 и С-1 внести по 100 мкл отрицательного контрольного образца (K^-). В остальные лунки внести по 90 мкл РРС и по 10 мкл исследуемых образцов сыворотки (плазмы) крови, предварительно разведенных в 10 раз в планшете для предварительного разведения образцов (см. п. 7.5) (конечное разведение образцов 1:100).

Сразу после внесения образца содержимое лунок перемешать пипетированием. Для этого следует 6–7 раз набрать и опорожнить наконечник пипетки, которым вносили образец, избегая образования пены и разбрызгивания.

Внесение образцов необходимо производить быстро, в течение не более 10 мин.

8.2. Планшет заклеить пленкой и инкубировать в термостате в течение 40 мин при температуре 37 ± 1 °С.

8.3. По окончании инкубации снять липкую пленку и поместить ее в сосуд с дезинфицирующим раствором. С помощью промывочного устройства промыть лунки планшета 5 раз промывочным раствором (п. 7.3), чередуя аспирацию и немедленное заполнение лунок каждого стрипа. В каждую лунку вносить не менее 350 мкл жидкости в процессе каждого цикла промывки. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек. Необходимо добиваться полного опорожнения лунок после каждого их заполнения. По окончании промывки остатки влаги из лунок тщательно удалить, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.

8.4. Внести во все лунки по 100 мкл конъюгата (см п. 7.6).

Для внесения конъюгата использовать ванночку для реактента и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.

8.5. Планшет заклеить пленкой и инкубировать в термостате в течение 40 мин при температуре 37 ± 1 °С.

8.6. По окончании второй инкубации промыть планшет 5 раз, как описано в п. 8.3.

8.7. Внести во все лунки по 100 мкл раствора тетраметилбензидина плюс (п.7.7).

Для внесения раствора ТМБ плюс использовать ванночку для реагента и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.

Планшет выдержать в защищенном от света месте в течение 15 мин при температуре от 18 до 25 °С.

8.8. Внести во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор тетраметилбензидина плюс, по 100 мкл стоп-реагента; при этом содержимое лунок окрашивается в жёлтый цвет.

8.9. Измерить величину оптической плотности растворов в лунках стрипов на спектрофотометре вертикального сканирования в двухволновом режиме: при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620 - 655 нм; допускается измерение только при длине волны 450 нм (выведение спектрофотометра на нулевой уровень («бланк»)) осуществлять по воздуху). Измерение проводить не позднее 10 мин после остановки реакции.

9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Рассчитать среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках с отрицательным контрольным образцом (ОП_{ср}К⁻).

Среднее арифметическое значений оптической плотности в лунках с отрицательным контрольным образцом (ОП_{ср} К⁻) должно быть в диапазоне от 0,10 до 0,27 ед. опт. плотн.

Значение оптической плотности в лунке с положительным контрольным образцом (ОПК⁺) должно быть не менее 0,6 ед. опт. плотн.

Только при соблюдении указанных условий можно учитывать результаты, полученные для анализируемых образцов.

9.2. Результат анализа считают положительным, если $ОП_{обр} \geq (ОП_{ср}К^{-}) \times 1,4 + 0,15$.

Результат анализа считают отрицательным если $ОП_{обр} < (ОП_{ср}К^{-}) \times 1,2 + 0,09$,

где: ОП_{обр} – оптическая плотность в лунке с анализируемым образцом сыворотки (плазмы) крови.

Если ОП_{обр} находится между этими значениями, то результат считают сомнительным. Сомнительные образцы анализируют повторно. При аналогичном результате эти образцы считают содержащими антитела к микобактериям туберкулеза.

9.3. Положительный результат анализа не является основанием для постановки диагноза «туберкулез». Для подтверждения диагноза требуются результаты тщательного клинико-рентгенологического обследования пациента.

10. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1. Транспортировать изделия следует транспортом всех видов в крытых

транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида, при температуре от 2 до 8 °С. Допускается транспортирование при температуре до 25 °С не более 10 суток.

10.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно осуществляться при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности в холодильных камерах или холодильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим с ежедневной регистрацией температуры.

10.3. Срок годности набора – 12 месяцев со дня выпуска. Не допускается применение наборов по истечении срока годности.

10.4. Дробное использование набора может быть реализовано в течение всего срока годности. В случае дробного использования набора:

- неиспользованные стрипы можно хранить в плотно закрытом пакете при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности;

- концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином; раствор для разведения сывороток; раствор тетраметилбензидина плюс; контрольные образцы; конъюгат и стоп-реагент после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности набора;

- промывочный раствор можно хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут.

10.5. При постановке ИФА нельзя использовать компоненты из наборов разных серий или смешивать их при приготовлении растворов, кроме неспецифических компонентов (ФСБ-Т×25, стоп-реагент, раствор ТМБ плюс), которые взаимозаменяемы в наборах АО «Вектор-Бест».

10.6. Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

11. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

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

Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.

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

11.3. 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

крытого дефекта материалов или некачественного изготовления изделия производителем.

По вопросам, касающимся качества набора «АТ-Туб-Бест», следует обращаться в АО «Вектор-Бест» по адресу:

630559, Новосибирская область, Новосибирский район, п. Кольцово, а/я 121,

тел. (383) 227-67-64, тел. (383) 363-05-97.

E-mail: vbobtk@vector-best.ru

С.н.с. лаборатории иммунохимии

НИИ СД АО «Вектор-Бест»

С.Е. Гладкова

Начальник отделения иммунохимии

НИИ СД АО «Вектор-Бест»

С.С. Решетников

Директор НИИ СД

АО «Вектор-Бест»

М.Ю. Рукавишников

Проректор по научной работе

ФГБОУ ВО НГМУ Минздрава России

д.м.н., профессор

М.П.

Т.И. Поспелова





Прошнуровано, пронумеровано и
скреплено печатью 10 листов.

Отв. за учет договоров НИР ФГБОУ ВО НГМУ
Минздрава России

Л.Н. Захарова Захарова Л.Н.
“27” января 2017 г.

