

74 9398-099-2308172-002

УТВЕРЖДАЮ

Главный государственный
санитарный врач
Российской Федерации

_____ Г.Г. Онищенко

« ____ » _____ 200_ г.

№ _____

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ
набора реагентов для иммуноферментного выявления
суммарных антител к микобактериям туберкулеза
(АТ-Туб-Бест)

Набор реагентов АТ-Туб-Бест (далее по тексту – набор) предназначен для выявления суммарных антител к микобактериям туберкулеза методом твердофазного иммуноферментного анализа для использования в клинической практике в качестве вспомогательного средства диагностики.

Набор рассчитан на проведение анализа 45 исследуемых образцов, 3 контрольных образцов, всего 96 определений при использовании всех стрипов планшета.

СОСТАВ НАБОРА

В состав набора входят:

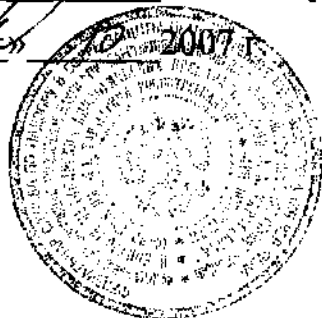
- иммуносорбент – антигены микобактерий, сорбированные в лунках разборного полистиролового планшета (12 восьмилуночных стрипов) для иммунологических реакций – 1 шт;
- положительный контрольный образец (K^+) – инаktivированная сыворотка крови человека, содержащая антитела к микобактериям туберкулеза, не содержащая антитела к ВГС, *Treponema pallidum*, ВИЧ-1 и ВИЧ-2, не содержащая HBsAg и антиген ВИЧ – прозрачная или с легкой опалесценцией жидкость красного цвета – 1 флакон (1,5 мл);
- отрицательный контрольный образец (K^-) – инаktivированная сыворотка крови человека, не содержащая антитела к микобактериям туберкулеза, ВГС, *Treponema pallidum*, ВИЧ-1 и ВИЧ-2, не содержащая HBsAg и антиген ВИЧ – прозрачная или с легкой опалесценцией жидкость синего цвета – 1 флакон (1,5 мл);

«СОГЛАСОВАНО»

Директор ФГУН ГИСК
им. Л.А. Тарасевича
Роспотребнадзора

Н.В. Медуницын

«15»



– конъюгат, концентрат – смесь мышинных моноклональных антител к лямбда- и каппа-цепям иммуноглобулинов человека (IgG, IgM, IgA), конъюгированных с пероксидазой хрена – прозрачная жидкость синего цвета – 1 флакон (1,5 мл);

– 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином – прозрачная бесцветная жидкость, возможно выпадение небольшого осадка солей, растворяющегося при температуре от 30 до 40 °С в течение 20 мин, при встряхивании пенится – 1 флакон (28 мл);

– раствор для разведения сывороток – прозрачная жидкость светло-фиолетового цвета – 2 флакона (по 10 мл);

– раствор для разведения конъюгата – бесцветная или светло-желтая жидкость с легкой опалесценцией – 1 флакон (13 мл);

– субстратный буферный раствор – прозрачная бесцветная жидкость – 1 флакон (13 мл);

– тетраметилбензидин, концентрат – прозрачная бесцветная жидкость – 1 флакон (1,0 мл);

– стоп-реагент – прозрачная бесцветная жидкость – 1 флакон (12 мл).

Дополнительно в комплект поставки набора входят:

– пленка для заклеивания планшета – 2 шт.;

– ванночка для реагентов – 2 шт.;

– наконечники для пипетки на 4–200 мкл – 16 шт.

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 связавшийся материал удаляют отмывкой. Образовавшийся комплекс «антиген-антитело» выявляют с помощью иммуноферментного конъюгата. Далее, во время инкубации с раствором тетраметилбензидина происходит окрашивание раствора в лунках. Реакцию останавливают добавлением стоп-реагента и измеряют оптическую плотность растворов в лунках стрипов.

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

Благодаря наличию в иммуносорбенте иммуногенных антигенов комплекса микобактерий туберкулеза, а также благодаря использованию конъюгата, обнаруживающего все основ-

ные классы иммуноглобулинов (IgG, IgA и IgM), набор АТ-Туб-Бест позволяет выявлять специфичные антитела к микобактериям туберкулеза.

По данным клинических испытаний, проведенных с набором АТ-Туб-Бест на нескольких группах больных с различными формами туберкулеза, суммарные антитела к микобактериям туберкулеза выявлялись в 68 – 84 % случаев, в зависимости от выборки образцов сывороток, в среднем – примерно у 75 % обследованных лиц.

По данным клинических испытаний, проведенных с набором АТ-Туб-Бест на нескольких группах людей, не болеющих туберкулезом (доноров крови, персонала тубдиспансера, лиц, проходящих обследование на сифилис, больных с бронхо-легочными заболеваниями, спортсменов, студентов), суммарные антитела к микобактериям туберкулеза не обнаруживались в 56 – 93 % случаев, в зависимости от выборки образцов сывороток, в среднем – примерно у 75 % обследованных лиц.

Воспроизводимость и повторяемость результатов – 99,5 %.

Результаты анализов по выявлению специфичных антител, проводившихся на одной и той же выборке клинического материала с набором АТ-Туб-Бест и с коммерческими наборами Mycobacteria A-60 ELISA-KIT IgG, IgM и IgA (производства фирмы Anda Biologicals, Франция), практически совпадали.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Потенциальный риск применения набора – класс 2а (ГОСТ Р 51609-2000).

Все компоненты набора, за исключением стоп-реагента (раствор серной кислоты), являются нетоксичными.

Раствор серной кислоты обладает раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания раствора серной кислоты на кожу и слизистые необходимо промыть поражённый участок большим количеством проточной воды.

При работе с набором следует соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы сыворотки (плазмы) крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированные.

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

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

ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках стрипов при длине волны 450 нм и/или в двухволновом режиме при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620 - 650 нм;
- термостат, поддерживающий температуру 37 °С;
- холодильник бытовой;
- пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным или фиксированным объёмом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкости от 5 до 5000 мкл;
- пипетки полуавтоматические многоканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкостей от 5 мкл до 300 мкл;
- промыватель ручной восьмиканальный ПР-8 в комплекте с отсасывателем медицинским В-40А или автоматический промыватель любого типа;
- перчатки резиновые хирургические;
- вспомогательный полистироловый планшет для разведения исследуемых образцов в 10 раз;
- бумага фильтровальная лабораторная;
- флаконы стеклянные вместимостью 15 мл;
- цилиндр мерный 2-го класса точности вместимостью 100 мл и 1000 мл;
- колба вместимостью 1000 мл;
- вода дистиллированная;
- 6 % раствор перекиси водорода.

СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ

1. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

- На наличие антител анализируют образцы сыворотки или плазмы крови человека.
- Для проведения анализа не следует использовать гемолизированные, мутные образцы, а также образцы, содержащие азид натрия.
- Образцы сыворотки или плазмы крови можно хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 1 нед или при температуре минус 20 °С и ниже не более 6 мес.
- Образцы, содержащие осадок, необходимо очистить центрифугированием при 5000-10000 об/мин в течение 5 мин при комнатной температуре.

2. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАСТВОРОВ И РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИФА

2.1. Перед работой извлечь набор из холодильника, вскрыть упаковку и выдержать все компоненты набора, в том числе и запечатанный пакет с планшетом, при температуре от 18

до 25 °С не менее 30 мин. При подготовке к анализу и проведении анализа запрещается использовать компоненты из наборов других серий.

2.2. Подготовка планшета.

Непосредственно перед использованием вскрыть пакет с планшетом выше замка. Оставить на рамке необходимое для проведения анализа количество стрипов; остальные стрипы снять с рамки и немедленно поместить вновь в пакет, удалить из него воздух и плотно закрыть замок.

Стрипы могут быть использованы в течение 1 мес после первого вскрытия пакета при условии их хранения при температуре от 2 до 8 °С.

2.3. Приготовление рабочего промывочного раствора.

При выпадении осадка солей в концентрате необходимо прогреть его при температуре от 30 до 40 °С до полного растворения осадка.

В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу), отобрать в мерный цилиндр необходимое количество 25-кратного концентрата фосфатно-солевого буферного раствора с твином и довести до соответствующего объема дистиллированной водой. Приготовленный рабочий промывочный раствор можно хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 3 сут.

2.4. Подготовка контрольных образцов.

Контрольные образцы готовы к использованию и не требуют дополнительного разведения.

После отбора части содержимого контрольные образцы можно использовать в течение 1 мес при условии их хранения при температуре от 2 до 8 °С.

2.5. Подготовка исследуемых образцов сыворотки (плазмы) – разведение в 10 раз.

В лунки вспомогательного планшета внести по 90 мкл раствора для разведения сывороток и добавить по 10 мкл неразбавленного образца сыворотки (плазмы) крови, тщательно перемешать. Использовать в течение 30 мин после приготовления.

2.6. Приготовление рабочего раствора конъюгата.

В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу) отобрать в чистый флакон необходимое количество раствора для разведения конъюгата и добавить необходимое количество концентрата конъюгата. Хранить не более 30 мин при температуре от 18 до 25 °С.

2.7. Приготовление рабочего раствора тетраметилбензидина.

В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу) отобрать в чистый флакон необходимое количество субстратного буферного раствора и добавить необходимое ко-

личество концентрата тетраметилбензидина. В таблице приведен расход реагентов в зависимости от количества используемых стрипов.

Рабочий раствор тетраметилбензидина можно хранить в защищенном от света месте при температуре от 18 до 25 °С не более 3 ч.

2.8. Стоп-реагент готов к использованию.

В таблице приведен расход реагентов в зависимости от количества используемых стрипов:

Таблица

Количество используемых стрипов	Рабочий раствор конъюгата		Рабочий раствор тетраметилбензидина		Рабочий промывочный раствор	
	Конъюгат, концентрат, мл	Раствор для разведения конъюгата, мл	Тетраметилбензидин, концентрат, мкл	Субстратный буферный раствор, мл	25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином, мл	Дистиллированная вода, мл
2	0,2	2,0	140	2,0	4,0	96
3	0,3	3,0	210	3,0	6,0	144
4	0,4	4,0	280	4,0	8,0	192
5	0,5	5,0	350	5,0	10,0	240
6	0,6	6,0	420	6,0	12,0	288
7	0,7	7,0	490	7,0	14,0	336
8	0,8	8,0	560	8,0	16,0	384
9	0,9	9,0	630	9,0	18,0	432
10	1,0	10,0	700	10,0	20,0	480
11	1,1	11,0	770	11,0	22,0	528
12	1,2	12,0	840	12,0	24,0	576

3. ПРОВЕДЕНИЕ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА (ИФА)

3.1. Внесение контрольных образцов и исследуемых сывороток.

В лунки А-1, В-1 внести по 100 мкл раствора для разведения сывороток. Лунки А-1, В-1 являются контролем поглощения для конъюгата.

В лунки, С-1, D-1 внести по 100 мкл отрицательного контрольного образца (K^-). В лунки Е-1, F-1 – по 100 мкл положительного контрольного образца (K^+).

В остальные лунки внести по 90 мкл раствора для разведения сывороток и, в дублях, по 10 мкл исследуемых образцов сыворотки (плазмы) крови, предварительно разведенных в 10 раз во вспомогательном планшете; перемешать пипетированием.

Внесение образцов необходимо производить быстро, в течение времени не более 10-15 мин.

3.2. Проведение инкубации.

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

3.3. Промывание планшета.

По окончании инкубации содержимое лунок удалить отсасыванием в сосуд с дезинфицирующим раствором (6 % раствор перекиси водорода) и промыть с помощью промывателя или многоканальной пипетки, добавляя во все лунки по 350 мкл рабочего промывочного раствора (см. п. 2.3). Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек. Общее число промывок равно 5. Необходимо следить за полным опорожнением лунок после каждого цикла отмывки. Раствор из лунок тщательно удалить, постукивая планшетом в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

3.4. Внесение рабочего раствора конъюгата и проведение инкубации.

Внести во все лунки по 100 мкл рабочего раствора конъюгата (см п. 2.6). Планшет заклеить пленкой и инкубировать в течение 40 мин при температуре 37 °С.

3.5. По окончании второй инкубации удалить содержимое лунок и промыть планшет 5 раз, как описано в п. 3.3.

3.6. Внесение рабочего раствора тетраметилбензидина.

Внести во все лунки по 100 мкл рабочего раствора тетраметилбензидина (см п. 2.7.) и инкубировать в темноте в течение 15 мин при температуре от 18 до 25 °С.

3.7. Добавление стоп-реагента.

Внести во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и рабочий раствор тетраметилбензидина, по 100 мкл стоп-реагента.

4. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Измерить величину оптической плотности растворов в лунках на спектрофотометре вертикального сканирования в двухволновом режиме, при котором из показателей, полученных при основной длине волны 450 нм, автоматически вычитаются показатели, полученные при длине волны сравнения в диапазоне 620 нм – 650 нм; или при длине волны 450 нм (при этом выведение спектрофотометра на нулевой уровень («бланк») следует осуществлять по воздуху). Измерение проводить не позднее 15 мин после остановки реакции.

5. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

5.1. Среднее арифметическое значений оптической плотности в лунках с отрицательным контрольным образцом (ОП_{кр} К⁻) не должно превышать 0,27 ед. опт. плотн.

5.2. Среднее арифметическое значений оптической плотности в лунках с положительным контрольным образцом ($ОП_{cp} K^+$) должно быть не менее 0,6 ед. опт. плотн.

5.3. Значение оптической плотности в лунке с контролем конъюгата должно быть не более 0,10.

5.4. Результат анализа считают положительным, если $ОП_{обр} > (ОП_{cp} K^+) \times 1,4 + 0,15$.

Результат анализа считают отрицательным если $ОП_{обр} < (ОП_{cp} K^+) \times 1,2 + 0,09$.

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

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

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

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

Набор реагентов АТ-Туб-Бест должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности (6 мес). Допускается хранение набора при температуре не выше 25 °С не более 10 сут. Замораживание набора не допускается.

Дробное использование набора может быть реализовано в течение 1 мес. В случае дробного использования набора:

- неиспользованные стрипы можно хранить в плотно закрытом пакете при температуре от 2 до 8 °С в течение 1 мес.

- вскрытые флаконы с 25-кратным концентратом фосфатно-солевого буферного раствора с твином, раствором для разведения конъюгата, раствором для разведения сывороток, и стоп-реагентом можно хранить плотно закрытыми в течение всего срока годности при температуре от 2 до 8 °С;

- вскрытые флаконы с контрольными образцами, концентратом конъюгата, субстратным буферным раствором, концентратом тетраметилбензидина можно хранить плотно закрытыми в течение 1 мес при температуре от 2 до 8 °С;

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

По вопросам, касающимся качества набора АТ-Туб-Бест, следует обращаться:
в Федеральное государственное учреждение науки «Государственный НИИ стандар-
тизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А. Тарасевича»
Роспотребнадзора по адресу:

119002, Москва, пер. Сивцев Вражек, 41, тел. (495) 241-39-22.

и в ЗАО «Вектор-Бест» по адресу:

630559, Новосибирская обл., Новосибирский район, п. Кольцово, а/я 121, тел. (383) 336-
73-46, 332-37-58, тел./факс (383) 336-60-30, 332-67-52, e-mail: vobtk@vector-best.ru.

Генеральный директор
ЗАО «Вектор-Бест»



М.Д. Хусаинов

Руководитель Государственных
испытаний

Д.Т. Леви