

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный Директор
АО «Витал Девелопмент Корпорэйшн»
Е.Н. Схолль-Энгбертс
«29» Февраля 2017.



**ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ
ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ
АЛЬФА-ФЕТОПРОТЕИНА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА
«АФП-Имаксиз (IMAXYZ)»**

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов для количественного иммуноферментного определения альфа-фетопротеина в сыворотке крови человека «АФП-Имаксиз (IMAXYZ)» предназначен для количественного *in vitro* определения концентрации альфа-фетопротеина в сыворотке крови человека.

1.2. По своей структуре АФП является гликопротеином с молекулярной массой около 69 кДа, состоящим из одной полипептидной цепи, включающей около 600 аминокислот и содержащей примерно 4% углеводов.

АФП - основной сывороточный белок, характерный для эмбрионального периода развития человека. Он синтезируется печенью плода и висцеральной энтодермой желточного мешка, а также, частично, эмбриональной почкой, поджелудочной железой и энтодермой желудочно-кишечного тракта. АФП обнаруживается в сыворотке крови плода и матери, и его концентрация в сыворотке крови плода достигает максимального значения на 12-16-ой неделе внутриутробного развития. К моменту рождения уровень АФП резко снижается и в сыворотке крови взрослых особей он обнаруживается лишь в следовых количествах. Значительные изменения уровня АФП в материнской сыворотке наблюдаются при некоторых нарушениях развития плода. Так, существенные повышения уровня АФП происходят при дефектах развития нервной трубки у плода, а снижение его количества характерно для синдрома Дауна. Совместные тесты на АФП, хорионический гонадотропин и эстриол (так называемый тройной тест) на 15-20-й неделях беременности

применяются для проверки плода на дефекты развития и хромосомные аномалии, но не являются абсолютными показателями патологии или нормального развития плода.

Увеличение концентрации АФП в сыворотке крови у взрослых особей является признаком возникновения патологических состояний, в первую очередь, опухолевых заболеваний, таких как первичный рак печени и тератокарцинома. Повышение уровня АФП наблюдается также при остром и хроническом гепатите, циррозе печени, панкреатобластоме и раке желудка.

1.3. Набор «АФП-Имаксиз (IMAXYZ)» рассчитан на проведение анализа в дубликатах 40 неизвестных, 6 калибровочных проб, одной пробы контрольной сыворотки и одной пробы для определения оптической плотности раствора тетраметилбензида (ТМБ) при использовании всех стрипов одновременно. Всего – 96 определений.

В случае дробного применения необходима обязательная постановка всех калибровочных проб для каждого отдельного анализа.

2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

В наборе «АФП-Имаксиз (IMAXYZ)» использована технология количественного «сэндвич» - варианта твердофазного иммуноферментного анализа. Для реализации этого варианта на внутренней поверхности лунок микропланшетов иммобилизованы моноклональные антитела к АФП. Другие моноклональные антитела к АФП конъюгированы с пероксидазой. Во время инкубации происходит связывание АФП, содержащегося в образцах, контрольных материалах и калибровочных пробах, с моноклональными антителами, иммобилизованными на внутренней поверхности лунок, и взаимодействие связавшегося АФП с моноклональными антителами мечеными пероксидазой. Оба моноклональных антитела имеют разную эпитопную специфичность к АФП, что позволяет использовать их для реализации одностадийного высокоспецифичного анализа.

По окончании инкубации во время промывки происходит удаление всех несвязавшихся компонентов из зоны реакции.

Во время инкубации с раствором ТМБ происходит окрашивание в синий цвет раствора в лунках с пробами, содержащими АФП. Степень

окраски прямо пропорциональна концентрации АФП в анализируемых образцах, калибровочных пробах и контрольных материалах.

После остановки реакции стоп-реагентом (цвет раствора меняется с синего на желтый) и измерения оптической плотности (ОП) раствора в лунках проводится расчет концентрации АФП в исследуемых образцах и контрольных материалах по калибровочному графику.

Калибровочный график строится на основании результатов анализа калибровочных проб, участвующих в анализе одновременно с исследуемыми образцами.

3. СОСТАВ НАБОРА

МИКРОПЛАНШЕТ С МОНОКЛОНАЛЬНЫМИ АНТИТЕЛАМИ К АФП

1 упаковка

Разборный полистирольный микропланшет со стрипами, разделяемыми на отдельные лунки, с иммобилизованными мышиными моноклональными антителами к АФП, маркирован «Микропланшет с моноклональными антителами к АФП».

КОНЬЮГАТ

1 флакон, 18 мл

Конъюгат моноклональных антител к АФП с пероксидазой, маркирован «Конъюгат».

КАЛИБРОВОЧНЫЕ ПРОБЫ (КП)

комплект

Лиофилизированные или жидкости.

Аттестованы по стандарту WHO 1st IRP 72/225, содержат известные количества АФП.

КП№1- 1 флакон, 0,5 мл, содержит 0 МЕ/мл АФП, маркирован «Калибровочная проба №1».

КП№2- 1 флакон, 0,5 мл, содержит 10 МЕ/мл АФП, маркирован «Калибровочная проба №2».

КП№3- 1 флакон, 0,5 мл, содержит 25 МЕ/мл АФП, маркирован «Калибровочная проба №3».

КП№4- 1 флакон, 0,5 мл, содержит 50 МЕ/мл АФП, маркирован «Калибровочная проба №4».

КП№5- 1 флакон, 0,5 мл, содержит 100 МЕ/мл АФП, маркирован «Калибровочная проба №5».

КП№6- 1 флакон, 0,5 мл, содержит 300 МЕ/мл АФП, маркирован «Калибровочная проба №6».

КОНТРОЛЬНАЯ СЫВОРОТКА (КС)

1 флакон, 0,5 мл

Лиофилизированная или жидкость.

Аттестована по Международному стандарту WHO 1st IRP 72/225, маркирована «Контрольная сыворотка», содержит известное количество АФП, диапазон концентраций указан на этикетке флакона.

ПРИМЕЧАНИЕ: точные значения калибровочных проб и диапазон контрольной сыворотки указаны на этикетках флаконов и в паспорте к набору реагентов.

БУФЕР Р

1 флакон, 3.0 мл

Для разведения образцов сыворотки крови,
Водно-солевой раствор, маркирован «Буфер Р»

РАСТВОР ТМБ

1 флакон, 14 мл

Раствор тетраметилбензидина, маркирован «Раствор ТМБ».

СТОП-РЕАГЕНТ

1 флакон, 14 мл

1М соляная кислота, маркирован «Стоп-реагент».

БУФЕР П

1 флакон, 20 мл

Концентрированный водно-солевой раствор для промывки лунок (20-кратный концентрат), маркирован «Буфер П».

Принадлежности:

- пакет полиэтиленовый закрывающийся – 1 штука;
- пленка для заклеивания микропланшета – 1 штука.

4. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА.

4.1. Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая набором концентрация АФП в сыворотке крови человека не превышает 0,8 МЕ/мл.

4.2. Специфичность. Перекрестной реакции обоим моноклональным антител к сывороточному альбумину, ХГч, пролактину, ЛГ, СА-125, ПСА не обнаружено.

4.3. Линейность. Зависимость концентрации АФП в образцах сыворотки крови при разведении «Калибровочной пробой №1», имеет линейный характер в диапазоне концентраций калибровочных проб № 2 – № 6 и составляет 90-110%.

4.4. Точность. Соответствие измеренной концентрации АФП в пробе, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы № 3, составляет 90–110%.

4.5. Коэффициент вариации результатов определения АФП в одном и том же образце с использованием набора «АФП-Имаксиз (IMAXYZ)» не превышает 8%.

4.6. Хук-эффект высоких концентраций. В наборе реагентов «АФП-Имаксиз (IMAXYZ)» хук-эффект не обнаружен вплоть до концентрации 16000 МЕ/мл.

4.7. Набор реагентов содержит специальные добавки, позволяющие исключить влияние на результаты анализа анти-мышинных антител (НАМА) и гетерофильных антител. Однако чрезвычайно высокие концентрации НАМА и гетерофильных антител могут повлиять на результаты анализа.

4.8. Нормальные значения.

Нормальные значения в сыворотке крови составляют 0 – 10,5 МЕ/мл

Концентрации АФП во время беременности представлены в таблице:

Срок беременности	Концентрация АФП, МЕ/мл
до 12 недель	< 15
от 13 до 15 недель	15-60
от 15 до 19 недель	15-95
от 20 до 24 недель	27 - 125
от 25 до 27 недель	52 - 140
от 28 до 30 недель	67 - 150
от 31 до 32 недель	100 - 250

При использовании набора рекомендуется уточнить значения концентраций АФП, соответствующие нормальным, с учетом особенностей популяции.

4.9. Аналитические характеристики метода исследования, используемого в наборе «АФП-Имаксиз (IMAXYZ)», (точность, чувствительность, линейность, воспроизводимость результатов измерения) установлены в соответствии с требованиями ГОСТ Р 53022.2-2008.

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.

5.1. Реагенты, входящие в состав набора, предназначены исключительно для лабораторной *in vitro* диагностики.

5.2. Потенциальный риск применения набора — класс 2б.

5.3. В учреждениях, в которых осуществляется работа с наборами реагентов, следует соблюдать ГОСТ Р 52905-2007 «Лаборатории медицинские. Требования безопасности» и СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

5.4. Несмотря на то, что производные крови человека, входящие в состав наборов, были проверены на наличие антител к ВИЧ 1 и 2 типа, вирусу гепатита С, а также HBsAg и дали отрицательный результат, с калибраторами, контрольными материалами необходимо обращаться как с образцами, несущими инфекционную опасность, так как ни один существующий метод тестирования не может на 100% гарантировать отсутствие инфекционных агентов.

5.5. При работе с исследуемыми образцами пациентов следует соблюдать меры предосторожности как в отношении инфекционно опасного материала. Настоятельно рекомендуется использование одноразовых перчаток и других рекомендованных мер защиты (спецодежду), позволяющих снизить риск инфицирования.

5.6. Все материалы, контактировавшие с образцами крови пациентов, контрольными и калибровочными материалами должны быть инаktivированы официально регламентированными методами (автоклавированием в течение 1 часа при 121°C, замачиванием в 5% растворе хлорамина Б в течение 1 часа или обработкой в соответствии с инструкцией каким-либо иным лабораторным дезинфектантом). Жидкие отходы, включая промывочные воды, должны быть инаktivированы добавлением сухого хлорамина Б из расчета 50 г/л в течение 2 часов, либо обработкой в соответствии с инструкцией каким-либо иным лабораторным дезинфектантом.

5.7. Стоп-реагент представляет собой 1 М раствор соляной кислоты и обладает раздражающим действием на кожу и слизистые оболочки. В случае попадания раствора стоп-реагента на кожу и слизистые необходимо промыть пораженный участок большим количеством проточной воды.

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

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

- Одно- или многоканальные дозаторы с изменяемым объемом отбора жидкостей в диапазонах 10 – 100 мкл, 50 – 300 мкл для постановки анализа и в диапазонах 100 – 1000 мкл, 1000 – 5000 мкл, 1000 – 10000 мкл для приготовления реагентов.

- Одноразовые сменные наконечники для дозаторов.
- Ванночки для реактивов для многоканального дозатора.
- Спектрофотометр, позволяющий производить измерение оптической плотности раствора в лунках при 450 нм.

- Автоматический промыватель для планшетов или дозирующее устройство.

- Фильтровальная бумага.
- Цилиндр мерный на 200 мл.
- Стакан стеклянный вместимостью 500 мл.
- Вода деионизованная или дистиллированная.
- Перчатки резиновые или пластиковые.

7. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ.

7.1. Взятие крови для анализа следует проводить с использованием стандартных процедур для венозной крови, а образцы сыворотки должны быть освобождены от клеток крови центрифугированием. После центрифугирования сыворотка крови должна быть перенесена в отдельную пробирку.

7.2. Следует избегать использования в анализе плазмы крови, гемолизованной или мутной сыворотки.

7.3. Не допускается использование в качестве консерванта азид натрия.

7.4. Образцы сыворотки крови следует использовать в течение 24 часов с момента получения при условии их хранения при +2...8°C. Если тестирование откладывается более, чем на 24 часа, сыворотку следует

отделить от сгустка и хранить при $+2...8^{\circ}\text{C}$ не более 7 суток. Для более длительного хранения образцы необходимо заморозить при температуре ниже -20°C . Избегать повторного замораживания образцов.

8. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА.

8.1. Все реагенты перед проведением анализа должны быть тщательно перемешаны и доведены до комнатной температуры ($+18...25^{\circ}\text{C}$).

8.2. **Предварительное разведение исследуемых образцов.** Если значения АФП в исследуемых образцах по предварительным данным выше значения концентрации калибровочной пробы № 6, образцы следует развести Буфером Р в 10 раз:

- 180 мкл Буфера Р + 20 мкл исследуемого образца.

Тщательно перемешать.

Разведение сывороток крови пациентов следует проводить только непосредственно перед проведением анализа. Хранение разведенных образцов не допускается.

8.3. **Микропланшет.** Перед вскрытием пакет необходимо выдержать при комнатной температуре ($+18...25^{\circ}\text{C}$) не менее 30 минут во избежание конденсации влаги на поверхности лунок. Открыть пакет и переставить на свободную рамку необходимое количество стрипов или лунок. Оставшиеся стрипы хранить в пакете с герметично закрытым замком при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности.

8.4. **Калибровочные пробы и контрольная сыворотка.** Перед вскрытием флаконов с *лиофилизированными калибровочными пробами и контрольной сывороткой* стряхнуть частицы лиофилизованного порошка, прилипшие к стенкам флаконов и крышкам. Аккуратно открыть флаконы и положить пробки перевернутыми на сухую поверхность. В каждый флакон внести по 0,5 мл деионизованной воды, закрыть флаконы крышками и выдержать в течение 20 минут при комнатной температуре ($18^{\circ}\text{C}...25^{\circ}\text{C}$).

Перемешать содержимое флаконов, аккуратно наклоняя и вращая их, избегая пенообразования.

Жидкие калибровочные пробы и контрольная сыворотка готовы к использованию.

8.5. Буфер П. Необходимое количество промывочного буфера развести дистиллированной водой в 20 раз.

Например:

10 мл Буфера П + 190 мл деионизованной или дистиллированной воды.

Тщательно перемешать, избегая пенообразования. Готовый к использованию Буфер П хранить закрытым при комнатной температуре (+18...25°C) не более 5 суток. Оставшийся неиспользованным 20-кратный Буфер П хранить закрытым при температуре +2...8°C в течение всего срока годности

8.6. Конъюгат анти-АФП-пероксидаза готов к использованию.

8.7. Буфер Р готов к использованию.

8.8. Раствор ТМБ готов к использованию.

8.9. Стоп-реагент готов к использованию.

9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

9.1. Составить протокол маркировки лунок. Лунки промаркировать следующим образом:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ТМБ	ТМБ	1	1	9	9	17	17	25	25	33	33
B	КП1	КП1	2	2	10	10	18	18	26	26	34	34
C	КП2	КП2	3	3	11	11	19	19	27	27	35	35
D	КП3	КП3	4	4	12	12	20	20	28	28	36	36
E	КП4	КП4	5	5	13	13	21	21	29	29	37	37
F	КП5	КП5	6	6	14	14	22	22	30	30	38	38
G	КП6	КП6	7	7	15	15	23	23	31	31	39	39
H	КС	КС	8	8	16	16	24	24	32	32	40	40

9.2. Во все лунки, кроме A1 и A2, внести по 150 мкл Конъюгата.

9.3. Внести в соответствующие лунки по 25 мкл калибровочных проб и контрольной сыворотки, в оставшиеся лунки по 25 мкл исследуемой сыворотки крови в дубликатах. *Общее время внесения*

калибровочных проб, контрольной сыворотки и исследуемых образцов не должно превышать 15 минут во избежание получения неправильных результатов исследования.

9.4. Аккуратно перемешать содержимое лунок постукиванием по краю планшета в течение 1-2 минут.

9.5. Заклеить микропланшет специальной пленкой, входящей в состав набора.

9.6. Инкубировать стрипы в течение 1 часа при комнатной температуре (+18...25°C) без встряхивания.

9.7. По окончании инкубации удалить содержимое лунок в специальную емкость для сбора инфицированного материала и промыть лунки пять раз. При каждой промывке во все лунки добавить по 300 мкл промывочного буфера, приготовленного по п. 8.4, с последующим удалением жидкости в емкость для инфицированного материала. По окончании промывки тщательно удалить остатки жидкости из лунок постукиванием рамки со стрипами в перевернутом положении по фильтровальной бумаге до исчезновения следов наличия жидкости в лунках стрипов.

9.8. Внести во все лунки по 100 мкл раствора ТМБ. Инкубировать стрипы в темноте при комнатной температуре (+18...25°C) в течение 15–30 минут в зависимости от степени развития окраски.

9.9. Остановить ферментную реакцию добавлением в каждую лунку по 100 мкл стоп-реагента. Цвет реакционной смеси в лунках должен измениться с синего на желтый. Время между остановкой реакции и измерением ОП не должно превышать 20 минут.

Схема проведения анализа приведена на **Рисунке 1**.

10. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.

10.1. Измерить на фотометре вертикального сканирования ОП раствора в лунках при длине волны 450 нм.

10.2. Определить среднее значение ОП в лунках А1 и А2 (контроль ТМБ) и вычесть его из среднего значения ОП калибровочных проб, контрольной сыворотки и анализируемых образцов.

11. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ.

11.1. Результаты анализа следует учитывать, если среднее значение ОП в лунках А1 и А2 не превышает 0,1 ед.ОП.

11.2. В линейных координатах построить график зависимости ОП (ед.опт.плотн.) от концентрации АФП в калибровочных пробах (МЕ/мл), используя средние значения ОП дубликатов.

11.3. При наличии автоматической программы расчета на фотометре в качестве метода аппроксимации калибровочной кривой выбрать метод 4PL, 5PL или кубический сплайн.

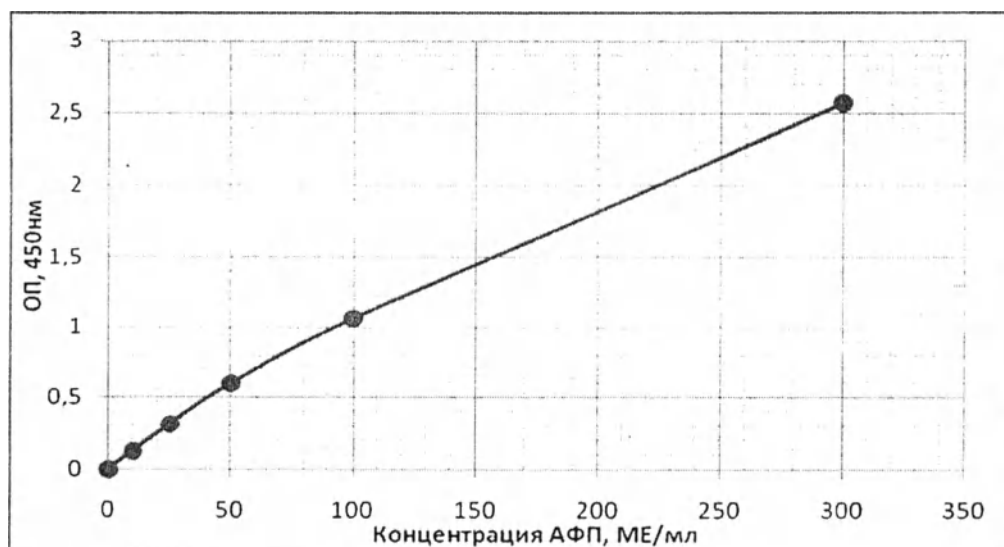
11.4. Определить содержание АФП в исследуемых образцах и контрольной сыворотке по калибровочному графику, используя среднее значение ОП для дубликатов. В случае предварительного разведения образцов необходимо измеренную концентрацию АФП умножить на фактор разведения.

При необходимости пересчета полученных результатов в другие единицы измерения следует использовать формулы 1 и 2:

$$\text{МЕ/мл} \times 1,21 = \text{нг/мл} \quad (1)$$

$$\text{нг/мл} \times 0,83 = \text{МЕ/мл} \quad (2)$$

Ниже приведен типичный график зависимости ОП калибровочных проб от концентрации в них АФП. Данный график приведен исключительно в целях иллюстрации и не может быть использован для расчета концентрации АФП в образцах сывороток пациентов:



12. ОГРАНИЧЕНИЯ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ АНАЛИЗА.

12.1. При использовании набора для проведения нескольких независимых серий анализов необходимо иметь в виду, что количество независимых экспериментов ограничено объемом калибровочных проб.

12.2. Для каждого независимого эксперимента необходимо построение нового калибровочного графика и определение концентрации аналита в контрольной сыворотке.

12.3. Не допускается использование реагентов разных серий при проведении анализа, а также использование ТМБ, стоп-реагента и промывочного буфера других фирм-производителей.

12.4. После окончания внесения реагентов необходимо плотно закрыть крышки флаконов и поместить их на хранение при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$.

13. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВКИ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА.

13.1. Набор реагентов для количественного иммуноферментного определения альфа-фетопротеина в сыворотке крови человека «АФП-Имаксиз (IMAXYZ)» должен храниться и транспортироваться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности. Допускается хранение и транспортировка набора при температуре до $+25^{\circ}\text{C}$ не более 5 суток.

Габаритные размеры набора - $165 \times 130 \times 100$ мм, вес нетто – 200 г., вес брутто – 300 г.

Срок годности набора — 18 месяцев. До окончания срока годности набора, при условии соблюдения температурного режима хранения, транспортировки и применения, производитель гарантирует работоспособность набора и соответствие всех аналитических и диагностических характеристик набора заявленным. Не допускается использование серии набора по истечении срока ее годности.

В случае дробного использования компоненты набора необходимо после вскрытия хранить следующим образом:

- Микропланшет со стрипами хранить в герметично закрытом пакете с замком при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности;

- Конъюгат и раствор ТМБ после вскрытия флаконов хранить не более 2 месяцев при температуре +2...8°C;
- Калибровочные пробы и контрольную сыворотку, Буфер Р после вскрытия хранить не более 1 месяца при температуре +2...8°C. Для длительного хранения (в течение срока годности) заморозить при температуре ниже -20°C.
- Буфер П и стоп-реагент после вскрытия флаконов хранить при температуре +2...8°C в течение всего срока годности.
- Буфер П, готовый к использованию, хранить закрытым не более 5 суток при комнатной температуре (+18...25°C). Не добавлять в емкость с используемым Буфером П вновь приготовленный раствор.

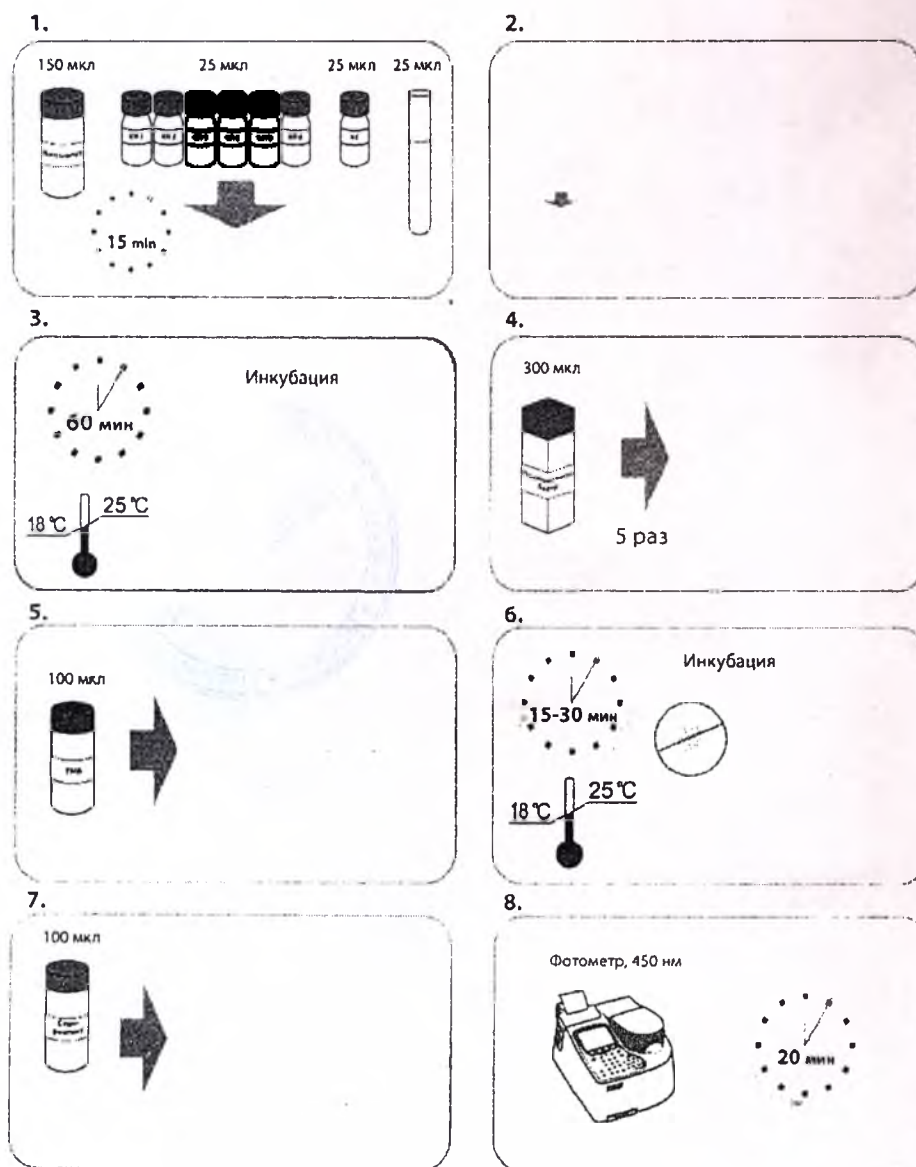
13.2. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции. Любые отклонения от рекомендованных процедур проведения анализа и приготовления реагентов могут привести к получению неверных результатов исследования.

14. СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ

Согласно классификации по СанПиН 2.1.7.2790-10 компоненты набора могут быть отнесены к классу «Г». Утилизация использованных реагентов и реагентов с истекшим сроком годности производить в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 в отношении отходов класса «Г». Дезинфекцию следует проводить в соответствии с МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

Рисунок 1.



По вопросам качества набора «АФП-Имаксиз (IMAXYZ)» обращаться в АО «Витал Девелопмент Корпорэйшн» по адресу: 194356, Россия, г. Санкт-Петербург, Дорога в Каменку, д. 56, лит. А, тел./факс (812)326-61-98.

Генеральный директор

АО «Витал Девелопмент Корпорэйшн»  Е.Н. Схолль-Энгбертс.

Генеральный директор

ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР» 

П.К.Варнавичус

Прошито, пронумеровано,
и скреплено печатью



Всего

листа(ов)

Ген. директор

Скопль-Энгбертс Е.Н.

ПРОШИТО
В КОЛИЧЕСТВЕ 14 ЛИСТОВ

14 МАР 2017

» 2017 год



Ген. Директор

ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»

Варнавичус П.К.