

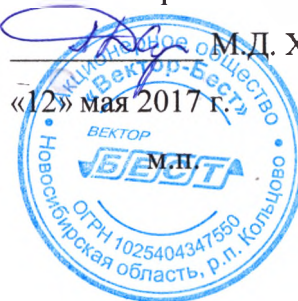
«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

АО «Вектор-Бест»

М.Д. Хусаинов

«12» мая 2017 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для иммуноферментного определения концентрации плазменного белка А, ассоциированного с беременностью, в сыворотке крови (РАРР-А-ИФА-БЕСТ)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов для иммуноферментного определения концентрации плазменного белка А, ассоциированного с беременностью, в сыворотке крови «РАРР-А-ИФА-БЕСТ» предназначен для определения концентрации плазменного белка А, ассоциированного с беременностью, в сыворотке крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Количественное определение содержания РАРР-А в первом триместре беременности может быть использовано в оценке риска развития у плода трисомии по 21 паре хромосом (синдром Дауна).

1.3. Набор рассчитан на проведение анализа в дублях 41 неизвестного образца, 6 калибровочных образцов и 1 контрольного образца, всего 96 определений при использовании всех стрипов планшета.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода

Метод определения основан на одностадийном «сэндвич»-варианте твердофазного иммуноферментного анализа с использованием двух типов моноклональных антител к РАРР-А.

В лунках планшета при добавлении исследуемого образца и конъюгата во время инкубации происходит связывание РАРР-А с моноклональными антителами к РАРР-А, иммобилизованными на внутренней поверхности лунок, и с моноклональными антителами, конъюгированными с пероксидазой.

Во время инкубации с раствором тетраметилбензидина происходит окрашивание раствора в лунках. Интенсивность окрашивания пропорциональна концентрации РАРР-А в анализируе-

Инструкция составлена сотрудниками АО «Вектор-Бест»: директором НИИ СД

ЭЛЕКТРОННАЯ КОПИЯ ОФОРМЛЕНА ЦЕНТРОМ ИСПЫТАНИЙ И РЕГИСТРАЦИИ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ лабораторией Н.Н. Сорокиной.

мом образце. После измерения величины оптической плотности растворов в лунках на основании калибровочного графика рассчитывается концентрация PAPP-A в анализируемом образце.

2.2. Состав набора

В состав набора входят:

- планшет разборный (12 восьмилуночных стрипов, «ломающихся» по 1 лунке) с иммобилизованными на внутренней поверхности моноклональными антителами к PAPP-A, готовый для использования – 1 шт.;
- калибровочные образцы, содержащие известные количества PAPP-A – 0; 250; 1000; 2500; 5000; 10000 мЕд/л, аттестованные относительно NEQAS approved Reference material for Down Syndrome Screening IRP 76/610; концентрации PAPP-A в калибровочных образцах могут несколько отличаться от указанных величин, точные величины указаны на этикетках флаконов; готовые для использования – 6 флаконов (по 0,3 мл);
- контрольный образец на основе инактивированной сыворотки крови человека с известным содержанием PAPP-A, аттестованный относительно NEQAS approved Reference material for Down Syndrome Screening IRP 76/610; готовый для использования – 1 флакон (0,3 мл);
- конъюгат моноклональных антител к PAPP-A с пероксидазой хрена, готовый для использования – 1 флакон (25 мл);
- концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25) – 1 флакон (28 мл);
- раствор тетраметилбензидина плюс (раствор ТМБ плюс), готовый для использования – 1 флакон (13 мл);
- стоп-реагент, готовый для использования – 1 флакон (12 мл).

Принадлежности:

- плёнка для заклеивания планшета – 2 шт.;
- трафарет для построения калибровочного графика – 1 шт.;
- ванночка для реагента – 2 шт.;
- наконечники для дозатора на 2-200 мкл – 16 шт.;
- планшет для предварительного разведения исследуемых образцов – 1 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность. Используемые в наборе реагентов моноклональные антитела обеспечивают высокую специфичность выявления PAPP-A. Не обнаружено перекрестной реактивности используемых моноклональных антител со свободной бета-субъединицей хорионического гонадотропина и альфа-фетопротеином

3.2. Использование в наборе реагентов специфических блокирующих агентов исключает возможность получения ложноположительных результатов в сыворотках крови, содержащих гетерофильные, в том числе антимышьиные (НАМА), антитела.

3.3.* Воспроизводимость. Коэффициент вариации результатов определения концентрации РАРР-А в контрольном образце, не превышает 8%.

3.4.* Линейность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «линейность» – отклонение от расчётной величины концентрации РАРР-А при разведении калибровочных образцов, содержащих 10000, 5000, 2500 мЕд/л РАРР-А, в 2 раза и калибровочного образца 1000 мЕд/л РАРР-А – в 4 раза. Процент «линейности» составляет 90-110%.

3.5.* Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» – соответствие измеренной концентрации РАРР-А предписанной в пробе, полученной путём смешивания равных объёмов контрольного образца и калибровочного образца 1000 мЕд/л. Процент «открытия» составляет 90-110%.

3.6.* Чувствительность. Минимально определяемая концентрация РАРР-А рассчитанная на основании среднего арифметического значения оптической плотности калибровочного образца B_0 плюс 2σ (σ – среднее квадратичное отклонение от среднего арифметического значения), не превышает 20 мЕд/л.

3.7. Клиническая проверка. Концентрация РАРР-А, измеренная в сыворотке крови 168 небеременных женщин в возрасте 18-50 лет, не превышала предела 30 мЕд/л.

В таблице 1 приведены значения медиан концентраций РАРР-А, полученные в результате анализа 1281 образца сыворотки крови женщин в I триместре физиологической беременности.

Таблица 1

Срок беременности, недели	Медиана РАРР-А, мЕд/л	Число образцов
8	430,6	16
9	1033,5	104
10	1564,2	175
11	2249,1	309
12	3546,0	389
13	4123,1	288

3.8. Значения медиан могут отличаться в разных регионах ввиду расовых и популяционных особенностей, поэтому приведенные в таблице значения носят рекомендательный характер и могут быть использованы только на этапе накопления собственных значений медиан в каждой лаборатории.

* по ГОСТ Р 51352-2013.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

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

4.2. Стоп-реагент и раствор тетраметилбензида плюс обладают раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания стоп-реагента и раствора тетраметилбензида плюс на кожу и слизистые необходимо пораженный участок промыть большим количеством проточной воды. Калибровочные и контрольный образцы содержат натрия мертиолят и проклин 150. Конъюгат содержит проклин 150.

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», утв. департаментом госсанэпиднадзора Минздрава РФ от 30.12.1998.

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

4.5. Химическая 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» и МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации из-

делий 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 нм - 655 нм; допускается измерение при длине волны 450 нм;
- шейкер термостатируемый орбитального типа, позволяющий производить встряхивание с частотой 400-800 об/мин и температуре 37 ± 1 °С;
- промывочное устройство для планшетов;
- дозаторы полуавтоматические одноканальные с переменным или фиксированным объёмом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкости от 5 до 5000 мкл;
- дозатор полуавтоматический многоканальный со сменными наконечниками, позволяющий отбирать объёмы жидкости от 5 до 350 мкл;
- цилиндр мерный вместимостью 1000 мл;
- вода дистиллированная;
- флаконы вместимостью 15 мл;
- перчатки медицинские диагностические одноразовые;
- бумага фильтровальная;
- дезинфицирующий раствор.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Для проведения анализа использовать сыворотку крови.

6.2. Для проведения анализа не следует использовать гемолизированную, мутную сыворотку крови, а также сыворотку крови, содержащую азид натрия.

6.3. Образцы сыворотки крови можно хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 5 суток или при температуре минус 20 °С (и ниже) не более 3 мес.

Повторное замораживание-размораживание образцов сыворотки крови не допускается.

После размораживания образцы следует тщательно перемешать.

6.4. Образцы сывороток крови, содержащие осадок, необходимо очистить центрифугированием при 1500 об/мин в течение 10 мин при температуре от 18 до 25 °С.

7. ПОДГОТОВКА КОМПОНЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

7.1. Перед проведением анализа извлечь набор из холодильника, вскрыть упаковку, извлечь все компоненты, в том числе и запечатанный пакет с планшетом. Выдержать все компоненты и анализируемые образцы сывороток крови 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 неиспользованными 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 рабочего буферного раствора.

Рабочий буферный раствор приготовить разведением концентрата фосфатно-солевого буферного раствора с твином в 25 раз. Для этого в соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов) внести в мерный цилиндр необходимое количество концентрата ФСБ-Т и довести до соответствующего объема дистиллированной водой.

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

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

7.4. Приготовление калибровочных и контрольного образцов.

Калибровочные и контрольный образцы готовы для использования и не требуют дополнительного разведения.

Хранение: после первого вскрытия в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности.

7.5. Предварительное разведение исследуемых сывороток.

В лунки планшета для предварительного разведения исследуемых образцов внести по 90 мкл рабочего буферного раствора (п. 7.3) и добавить по 10 мкл исследуемых образцов сыворотки крови, тщательно перемешать.

Хранение: при температуре от 2 до 8 °С не более 1 часа.

7.6. Подготовка конъюгата.

Конъюгат готов для использования.

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

Утилизировать конъюгат, оставшийся во флаконе или ванночке для реагента после проведения ИФА (не сливать во флакон с исходным конъюгатом).

Хранение: после первого вскрытия в плотно закрытом флаконе при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности набора.

7.7. Подготовка раствора тетраметилбензидина плюс (раствора ТМБ плюс).

Раствор ТМБ плюс готов для использования.

Исключить воздействие прямого света на раствор ТМБ 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 ванночку для реагента.

Утилизировать раствор ТМБ плюс, оставшийся во флаконе или ванночке для реагента после проведения ИФА (не сливать во флакон с исходным раствором ТМБ плюс).

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: после первого вскрытия в плотно закрытом флаконе при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности набора.

7.8. Стоп-реагент готов для использования.

Хранение: после первого вскрытия в плотно закрытом флаконе при температуре от 2 до 8°С в течение всего срока годности набора.

Таблица 2 (расход компонентов)

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

8. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

8.1. Внести в дублях, начиная с верхних лунок первых двух стрипов, по 20 мкл каждого калибровочного образца и по 20 мкл контрольного образца. В остальные лунки внести в дублях по 20 мкл анализируемых образцов сыворотки крови в предварительном разведении.

Время внесения образцов не должно превышать 10 мин при использовании всех лунок

планшета.

8.2. Внести во все лунки по 200 мкл конъюгата (см п. 7.6).

Для внесения конъюгата использовать флакон или ванночку для реагента и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.

8.3. Планшет заклеить пленкой и инкубировать в течение 60 мин при встряхивании на шейкере с частотой 650 об/мин и температуре 37 ± 1 °C.

8.4. По окончании инкубации снять пленку и удалить в сосуд с дезинфицирующим раствором. С помощью промывочного устройства промыть лунки планшета 5 раз рабочим буферным раствором (см п. 7.3), чередуя аспирацию и немедленное заполнение лунок каждого стрипа. В каждую лунку вносить 350 мкл рабочего буферного раствора в процессе промывки каждого стрипа. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек. Необходимо добиваться полного опорожнения лунок после каждого их заполнения. По окончании промывки удалить остатки жидкости из лунок, постукивая планшетом в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

8.5. Внести во все лунки по 100 мкл раствора ТМБ плюс (см п. 7.6) и инкубировать в защищенном от света месте в течение 15 мин при встряхивании на шейкере с частотой 650 об/мин и температуре 37 ± 1 °C.

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

8.6. Внести во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор тетраметилбензидина плюс, по 100 мкл стоп-реагента; встряхнуть планшет на шейкере в течение 10-15 сек, при этом содержимое лунок окрашивается в желтый цвет.

8.7. 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 нм - 655 нм; допускается измерение при длине волны 450 нм.

Время между остановкой реакции и измерением оптической плотности не должно превышать 10 мин.

9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Вычислить средние арифметические значения оптической плотности для каждой пары лунок, содержащих калибровочные, контрольный и анализируемые образцы.

9.2. Построить в линейных координатах калибровочный график зависимости среднего арифметического значения оптической плотности (ед. опт. плотн.) от концентрации РАРР-А в калибровочных образцах (мЕд/л).

9.3. Определить концентрацию РАРР-А в контрольном образце и анализируемых образцах по калибровочному графику.

9.4. Результаты анализа исследуемых образцов учитывать, если вычисленное по калибровочному графику значение концентрации РАРР-А в контрольном образце соответствует указанному диапазону концентраций на этикетке флакона.

9.5. В клинической практике* для оценки риска врожденной патологии плода используется выражение полученных концентраций в МоМ (кратное медианы).

$$\text{МоМ} = \frac{\text{измеренное значение РАРР-А, мЕд/л}}{\text{медиана РАРР-А, мЕд/л}}$$

Значение медиан указано в таблице 1.

* «Современные алгоритмы пренатальной диагностики наследственных болезней: Методические рекомендации». Под редакцией члена-корреспондента РАМН, д.м.н., профессора В.С. Баранова и академика РАМН, заслуженного деятеля науки РФ, д.м.н., профессора Э.К. Айламазяна — СПб.: Изд-во Н-Л, 2009.

9.6. При динамическом наблюдении пациента для получения результатов, адекватно отражающих изменение концентрации РАРР-А в сыворотке крови, необходимо использовать наборы реагентов одного наименования (одного предприятия-изготовителя).

9.7. Для представления результатов измерения концентрации РАРР-А в мкг/мл, следует использовать коэффициент пересчёта 222 (1 мкг/мл = 222 мЕд/л).

Примечание: Образцы, содержащие гемоглобин в концентрации до 46,8 г/л; билирубин в концентрации до 141,3 мг/л и триглицериды в концентрации до 100,1 г/л пригодны для использования.

10. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ 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 их годности.

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

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

– калибровочные и контрольный образцы, конъюгат, концентрат фосфатно-солевого бу-

ферного раствора с твином, раствор ТМБ плюс и стоп-реагент после вскрытия флаконов хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности;

– рабочий буферный раствор хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 5 суток.

10.5. Построение калибровочного графика необходимо проводить для каждого независимого эксперимента, а также рекомендуется определение концентрации РАРР-А в контрольном образце.

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

Нельзя использовать реагенты из наборов других фирм-производителей.

10.7. 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 скрытого дефекта материалов или некачественного изготовления изделия производителем.

По вопросам, касающимся качества набора «РАРР-А-ИФА-БЕСТ», следует обращаться в АО «Вектор-Бест» по адресу:

630559, Новосибирская область, р.п. Кольцово, а/я 121,
тел. (383) 227-67-64, тел. (383) 363-23-77.

E-mail: vbobtk@vector-best.ru

Зав. лабораторией НИИ СД
АО «Вектор-Бест»

Н.Н. Сорокина

Директор НИИ СД
АО «Вектор-Бест»

М.Ю. Рукавишников

«СОГЛАСОВАНО»

Ректор ФГБОУ ВО Саратовский ГМУ
им. В.И. Разумовского
Минздрава России
д.м.н., профессор

M.П.



В.М. Попков

«12» мая 2017 г.

Пронумеровано, пронумеровано и
скреплено печатью 11 листов
Ректор ФГБОУ ВО Саратовский ГМУ
им. В.И. Разумовского Минздрава России
д.м.н., профессор

12 05 2017 г. В.М. Пожков

