

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от _____ 201__ г.

№ _____

«УТВЕРЖДАЮ»



Генеральный директор

Осин Н.С.

10 января 2010 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению Набора реагентов для количественного определения альфа-фетопротеина
в сыворотке крови методом лантанидного иммунофлуоресцентного анализа
«АФП-ЛИФА»

1. НАЗНАЧЕНИЕ.

1.1. Набор реагентов «АФП-ЛИФА» предназначен для количественного определения содержания альфа-фетопротеина (АФП) в сыворотке крови человека методом лантанидного иммунофлуоресцентного анализа.

1.2. Альфа-фетопротеин является гликопротеином с молекулярной массой около 70 000 Да. В процессе развития человеческого зародыша АФП образуется главным образом в желточном мешке и эмбриональной печени и, в меньшей степени, в желудочно-кишечном тракте.

Являясь главным белком сыворотки крови плода на ранних стадиях развития, АФП выделяется почками плода в амниотическую жидкость и оттуда через плаценту и пупочный канатик проникает в систему кровообращения матери.

Динамика показателей содержания АФП в крови беременных отражает характер и скорость процессов созревания органов и тканей плода и позволяет оценивать состояние функциональной зрелости плода в зависимости от срока гестации и массы.

Повышенное содержание АФП в сыворотке крови беременных и в амниотической жидкости наблюдается при анэнцефалии плода, расщеплении позвоночника, гастрошизисе, эмбриональной грыже, врожденном нефрозе, патологическом состоянии плода и внутриутробной смерти, а также при многоплодной беременности; уровень АФП понижен при наличии у плода синдрома Дауна и других хромосомных патологий, а также низкой массы тела.

Повышенное содержание АФП в сыворотке крови часто наблюдается у больных с гепатоцеллюлярным раком и эмбрионально-клеточными опухолями: у людей, страдающих первичной печеночноклеточной карциномой, несеминочным раком яичка и опухолями эндодермальной пазухи яичника.

1.3. Диагностическая значимость определения.

Определение содержания АФП может быть использовано для пренатальной диагностики некоторых врожденных заболеваний плода, мониторинга течения беременности, а также при диагностике и мониторинге различных видов рака.

1.4. Область применения – клиническая лабораторная диагностика.

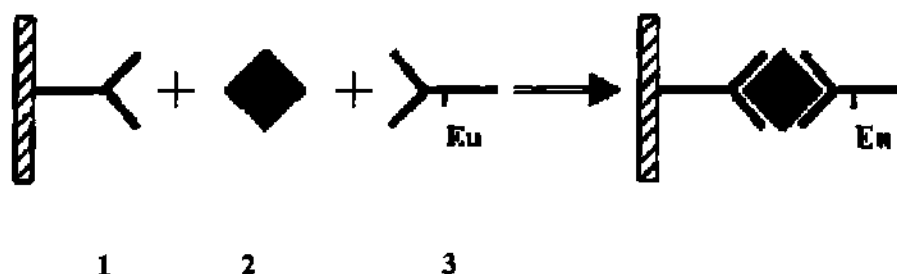
1.5. Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 40 неизвестных образцов, 6 калибровочных проб и 2 контрольных сывороток - всего 96 определений при использовании всего комплекта планшетов (стрипов).

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА.

Принцип работы Набора.

Набор "АФП-ЛИФА" основан на принципе иммунофлуоресценции, включающей использование двух мышиных моноклональных антител с различной эпитопной специфичностью к АФП. Анализ проводится в одну стадию с образованием иммунного сэндвич-комплекса.

АФП калибровочных проб, контрольных сывороток и неизвестных проб одновременно образует сэндвич между моноклональными антителами, сорбированными на поверхности полистирольных стрипов, и вторыми моноклональными антителами, конъюгированными с ионами европия.



1. Анти-АФП покрытые стрипы

2. АФП в неизвестных, калибровочных и контрольных пробах

3. Конъюгат моноклональных антител с хелатом европия

После инкубации несвязавшиеся компоненты пробы и избыток конъюгата отмываются. Затем добавляют усиливающий раствор, позволяющий диссоциировать ионы европия из иммунного комплекса с последующим образованием сильно флуоресцирующих хелатов с компонентами раствора.

Интенсивность флуоресценции ионов европия прямо пропорциональна содержанию АФП в образце. Результаты анализа регистрируются с помощью флуориметра с временным разрешением на длине волны 615 нм.



Ген. дир.

Содержание АФП указано в паспорте. Контрольные сыворотки приготовлены из человеческой сыворотки. Содержание АФП указано в паспорте.

4. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.

4.1. Специфичность антител к АФП обеспечивает определение истинной концентрации АФП при наличии в анализируемой пробе сывороточного альбумина, хорионического гонадотропина, плацентарного лактогена и иммуноглобулинов человека.

4.2. Диапазон определяемых концентраций АФП составляет 1-1000 МЕ/мл.

4.3. Тест на "открытие".

Соответствие определяемой концентрации АФП и рассчитанной концентрации в пробе, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы, содержащей 10 МЕ/мл, находится в пределах 90-110 %.

4.4. Тест на "линейность".

Отклонение от расчетной величины при разведении калибровочных проб, содержащих 1000 и 100 МЕ/мл АФП в 2, 4, 8 раз, калибровочной пробы, содержащей 500 МЕ/мл, в 8 раз, и калибровочной пробы, содержащей 10 МЕ/мл, в 2, 4 и 10 раз находится в пределах 90-110%.

4.5. Чувствительность.

Минимальная концентрация АФП, выявляемая с помощью набора, составляет не более 0,2 МЕ/мл.

4.6. Воспроизводимость результатов.

Коэффициент вариации результатов определений АФП в образцах не превышает 8%.

4.7. Концентрация АФП в крови у взрослых людей в норме находится в диапазоне от 0 до 10 МЕ/мл. Концентрация АФП в крови беременных женщин составляет от 2 до 500 МЕ/мл в зависимости от срока беременности и состояния плода.

Рекомендуется при использовании набора уточнить нормальные значения концентрации АФП для каждой лаборатории.

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

5.1. Потенциальный риск применения Набор – класс 1 (ГОСТ Р 51609-2000).

5.2. Меры предосторожности - соблюдение «Правил устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемиологического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

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

- Флуориметр с временным разрешением;
- пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками с фиксированным или переменным объемом, позволяющие отбирать объемы жидкости 20, 25, 100, 200, 1000 мкл.



- встряхиватель (шейкер);
- промывающее устройство;
- устройство (диспенсер) с переменным объемом, позволяющее вносить в лунки планшета 200 мкл усиливающего раствора;
- холодильник бытовой;
- перчатки резиновые хирургические;
- бумага фильтровальная;
- цилиндр мерный вместимостью 100 мл;
- колба мерная вместимостью 500 мл;
- вода дистиллированная.

7. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ.

Исследуемые образцы сыворотки крови собирать в сухие пробирки; пробы можно хранить при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ в течение 48 часов или замороженными в герметично закрытых пробирках (-20°C) в течение 1 года, если определение проводится не сразу. Повторное замораживание не допускается.

8. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА.

8.1. Извлечь набор из холодильника и выдержать реагенты при комнатной температуре ($+18-25^{\circ}\text{C}$) не менее 30 минут. Перед использованием реагенты тщательно перемешать легким встряхиванием.

8.2. Приготовление рабочего промывочного раствора.

В мерную колбу вместимостью 0,5 л внести 20 мл концентрата промывочного раствора, добавить дистиллированную воду до метки 500 мл и тщательно перемешать. Приготовленного раствора достаточно для полного цикла отмытки 1 планшета.

Рабочий промывочный раствор можно хранить не более 7 дней при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$.

8.3. Подготовка калибровочных проб и контрольных сывороток.

Внести по 0,5 мл дистиллированной воды во флаконы с калибровочными пробами (P_7-P_{12}) и контрольными сыворотками (P_5-P_6) и через 5-10 минут тщательно перемешать.

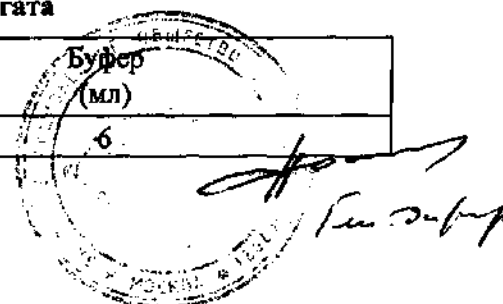
Приготовленные калибровочные пробы и контрольные сыворотки можно хранить не более 1 недели при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$.

8.4. Приготовление раствора конъюгата.

Необходимое количество конъюгата (P_4) и соответствующее количество буфера (P_2) внести во флакон, тщательно перемешать. Конъюгат разводить согласно схеме:

Схема разведения конъюгата

Число стрипов	Конъюгат (мкл)	Буфер (мл)
2	60	6



4	120	12
6	180	18
8	240	24

Раствор конъюгата необходимо использовать в течение 1 часа после приготовления!

8.5. Подготовка планшетов.

Извлечь планшет (рамку с установленными стрипами) из полимерной упаковки. Оставить в рамке необходимое для проведения анализа число стрипов.

Оставшиеся неиспользованными стрипы поместить в полиэтиленовый пакет и хранить при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ не более 1 месяца.

8.6. Составить схему расположения проб так, как это указано ниже:

Расположение проб на 12-луночных стрипах

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	КПА	КПА	КПВ	КПВ	КПС	КПС	КПД	КПД	КПЕ	КПЕ	КПФ	КПФ
B	КС1	КС1	КС2	КС2	НП1	НП1	НП2	НП2	НП3	НП3	и т.д.	и т.д.

КПА-КПФ - лунки для калибровочных проб, КС - лунки для контрольных сывороток, НП - лунки для неизвестных проб.

9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА.

Набор можно использовать для проведения нескольких независимых серий анализа в течение срока годности подготовленных реагентов. В каждой серии анализов калибровочные, контрольные и неизвестные пробы следует измерять в дубликатах. Калибровочная кривая обязательно строится для каждой серии анализов.

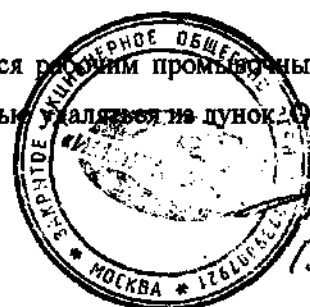
9.1. Калибровочные пробы А - F с содержанием АФП от 0 до 1000 МЕ/мл (P_7-P_{12}), контрольные сыворотки (P_3-P_6) и анализируемые образцы сыворотки крови внести в лунки по 25 мкл в дубликатах.

9.2. Во все лунки внести по 200 мкл раствора конъюгата (см п. 8.4.). Первый объем раствора конъюгата следует отбросить. При внесении раствора конъюгата нельзя касаться наконечником пипетки края лунок и поверхности жидкости.

9.3. Планшет инкубировать на встряхивателе в режиме "быстро" при комнатной температуре ($+18-25^{\circ}\text{C}$) в течение 2 минут, затем инкубировать в течение 1 часа при комнатной температуре в режиме "медленно".

9.4. Провести 6-кратное отмывание стрипов рабочим промывочным раствором (см п. 8.2.) с помощью промывающего устройства в соответствии с программой, прилагаемой к промывающему устройству.

При промывании стрипов все лунки должны заполняться рабочим промывочным раствором полностью. В конце каждого промывания буфер должен полностью уходить из лунок. Оставшуюся в



лунках планшета жидкость удалить, постукивая перевернутым планшетом о ровную поверхность, покрытую чистой фильтровальной бумагой.

9.5. Во все лунки внести по 200 мкл усиливающего раствора только с помощью специального устройства для внесения усиливающего раствора. Перед внесением усиливающего раствора отбросить 10-15 вносимых объемов. При внесении усиливающего раствора не касаться краев лунок или их содержимого.

9.6. Суммарное время внесения калибровочных, контрольных и неизвестных проб и внесения растворов реагентов не должно превышать 30 минут для одного планшета.

9.7. Инкубировать планшет в течение 5 минут при встряхивании в режиме "медленно" и дополнительно в течение 10-15 минут без встряхивания при комнатной температуре.

Краткая схема анализа приведена на стр.8.

10. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ.

10.1. Измерить интенсивность флуоресценции (ИФ) на флуориметре с временным разрешением при длине волны 615 нм в течение 1 часа после окончания времени инкубации.

11. ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА. РАСЧЕТЫ И ГРАФИЧЕСКИЕ ПОСТРОЕНИЯ.

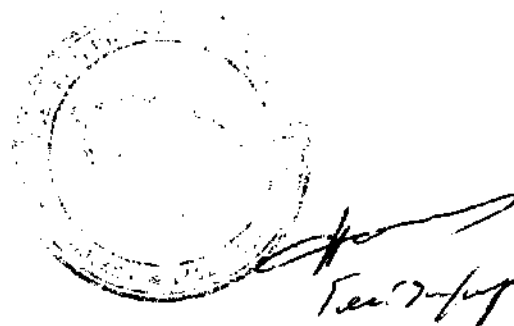
11.1. Интенсивность флуоресценции контрольных лунок с калибровочной пробой P_1 (A) должна быть не больше 2500 имп/с.

11.2. Интенсивность флуоресценции калибровочной пробы P_{12} (F) должна быть не меньше 800000 имп/с.

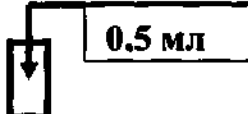
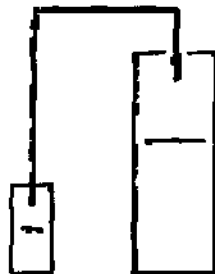
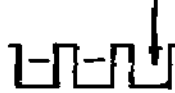
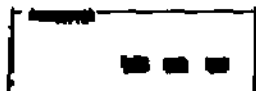
11.3. По уровню флуоресценции калибровочных проб возможно построение калибровочной кривой с использованием программных средств флуориметра с временным разрешением. Содержание АФП в исследуемых пробах определяется по калибровочной кривой.

11.4. Типичный калибровочный график приведен на рис. (стр.9).

11.5. По построенному графику определить значение концентрации АФП в исследуемых пробах сыворотки крови.



АФП-ЛИФА
КРАТКАЯ СХЕМА АНАЛИЗА

Подготовка калибровочных проб и контрольных сывороток		Разведение в 0,5 мл дистиллированной воды									
Приготовить раствор конъюгата		Схема разведения конъюгата									
		<table><tr><td>Число стрипов</td><td>Конъюгат (мкл)</td><td>Буфер (мл)</td></tr><tr><td>4</td><td>120</td><td>12</td></tr><tr><td>8</td><td>240</td><td>24</td></tr></table>	Число стрипов	Конъюгат (мкл)	Буфер (мл)	4	120	12	8	240	24
		Число стрипов	Конъюгат (мкл)	Буфер (мл)							
4	120	12									
8	240	24									
Добавить калибровочные, контрольные и неизвестные образцы крови		25 мкл									
Добавить раствор конъюгата		200 мкл									
Инкубация		2 мин при сильном встряхивании + 1 час при слабом встряхивании и комнатной температуре									
Отмывание		Шестикратное									
Внести усиливающий раствор		200 мкл, инкубация 5 мин при слабом встряхивании +10-15 мин без встряхивания									
Измерить интенсивность флуоресценции		Флуориметр с временным разрешением									

Handwritten signature and date: 10.07.17

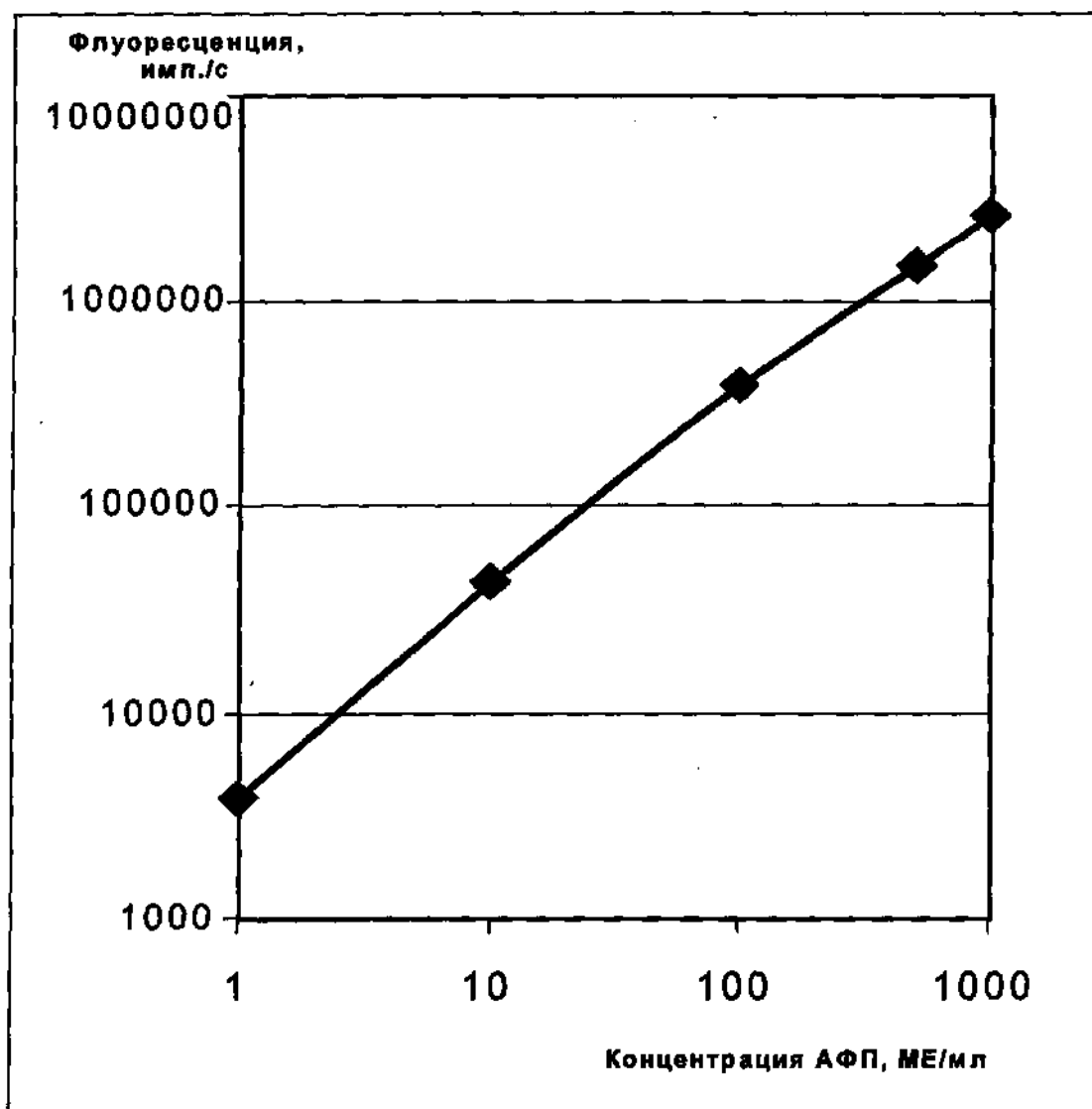


Рис. Типичный калибровочный график

12. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА.

12.1. Набор должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности. Допускается хранение наборов при температуре до $+25^{\circ}\text{C}$ не более 3 суток.

12.2. Срок годности набора - 12 месяцев.

12.3. Неиспользованные стрипы можно хранить в полиэтиленовом пакете при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ не более 1 месяца.

12.4. Калибровочные пробы и контрольные сыворотки, приготовленные для использования, можно хранить при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ - не более 1 недели.

12.5. Конъюгат после вскрытия флакона можно хранить при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ в течение срока годности набора.

Ген. директор

12.6. Конъюгат после разведения хранению не подлежит.

12.7. Усиливающий раствор после вскрытия флакона можно хранить в темном месте при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ в течение срока годности набора.

12.8. Буфер и промывочный раствор после вскрытия флаконов можно хранить при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ в течение срока годности набора.

12.9. Рабочий промывочный раствор можно хранить при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ не более 7 дней.

12.10. Не следует использовать реагенты из различных серий наборов.

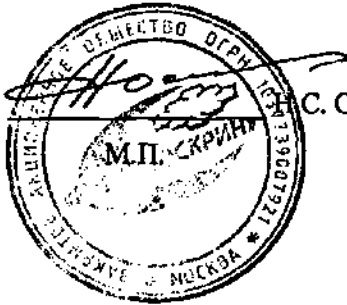
12.11. Не следует использовать гемолизированные образцы сыворотки крови, а также образцы сывороток крови людей, получавших препараты, содержащие мышинные моноклональные антитела, способные изменить свойства реагентов набора.

12.12. Не следует держать реагенты на ярком свете во время инкубации и хранения.

12.13. Для отбора и добавления реагентов и образцов сыворотки крови рекомендуется использовать аттестованные полуавтоматические одноканальные пипетки со сменными наконечниками. Следует избегать загрязнения реагентов ионами металлов в связи с возможностью получения ложных результатов.

12.14. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

По вопросам, касающимся качества Набора «АФП-ЛИФА», следует обращаться в ЗАО «Иммуноскрин» по адресу: Юридический адрес: 125424, г. Москва, Волоколамское шоссе, д. 73. Фактический адрес: 125424, Москва, Волоколамское ш., 75, корп. 1. тел/факс (495) 490-57-04, e.mail immunoscr@immunoscreen.ru

Генеральный директор ЗАО «Иммуноскрин»  С. Осин

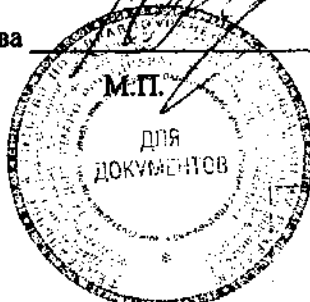
10 января 2010 г.

«СОГЛАСОВАНО»

Заведующий кафедрой клинической
лабораторной диагностики

ГОУ ДПО РМАПО Росздрава

д.м.н., профессор В.В. Долгов



В.В. Долгов

[Signature]