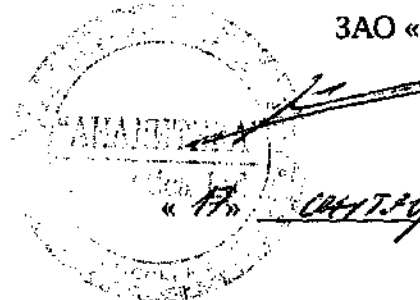


УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ЗАО «АНАЛИТИКА»



П.Г. Каленик

2010 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Набор реагентов для определения альфа-фетопроteина (AFP) производства фирмы HUMAN GmbH (Германия)

Альфа-фетопроtein (AFP)

Иммуноферментный тест для количественного определения альфа-фетопроteина в сыворотке крови человека

Набор рассчитан на 96 определений

НАЗНАЧЕНИЕ

Альфа-фетопроtein (АФП) представляет собой гликопротеин с молекулярным весом около 70000 дальтон, вырабатываемый желточным мешком, печенью и желудочно-кишечным трактом эмбриона. С повышением концентрации АФП в крови плода происходит соответствующий рост концентрации АФП в амниотической жидкости и крови беременной. Аномально высокие уровни АФП в материнской сыворотке и амниотической жидкости связаны с пороками развития плода, такими как анэнцефалия и расщелина позвоночника. Пониженная концентрация АФП в материнской сыворотке обнаруживается при синдроме Дауна у зародыша. Определение АФП полезно, таким образом, при мониторинге беременности и для пренатальной диагностики пороков развития плода.

Определение АФП используется также при диагностике и, особенно, мониторинге терапии злокачественных новообразований, в частности, первичной гепатомы и карциномы. Поскольку первичный гепатоцеллюлярный рак является следствием цирроза печени, крайне важным является мониторинг групп повышенного риска развития рака печени (вирусоносители гепатита В, больные алкогольным циррозом).

ПРИНЦИП МЕТОДА

АФП иммуноферментный тест фирмы HUMAN основан на классическом «сэндвич» методе ИФА с использованием высокоаффинной системы биотин-стрептавидин. На лунках микропланшета адсорбирован стрептавидин. При первой инкубации образцы сыворотки, калибраторы или контроли, конъюгат (меченые пероксидазой антитела к АФП), а также биотинилированные моноклональные антитела к АФП смешиваются друг с другом, образуя при этом структуру типа «сэндвич», связанную с поверхностью лунок за счет взаимодействия биотина с иммобилизованным стрептавидином. После инкубации не связавшийся конъюгат и моноклональные антитела удаляются промывкой. Добавление в лунки субстрата приводит к образованию окрашенного продукта, который меняет цвет на желтый при добавлении стоп-реагента, вносимого для остановки реакции. Интенсивность окраски измеряется фотометрически и пропорциональна концентрации АФП в пробе. Численное значение концентрации определяется с помощью калибровочной кривой, построенной по калибраторам, входящим в состав набора.

МАТЕРИАЛЫ И РЕАГЕНТЫ

Набор содержит реагенты, достаточные для выполнения 96 определений:

MIC	Стрилы 8-луночные (в рамке-держателе) Стрипы, разделяемые на отдельные лунки, покрытые стрептавидином	12
CAL	Калибраторы (А - F)*(белая крышка) Готовые к использованию; сыворотки человека, содержащие АФП в концентрациях 0 (А), 5 (В), 25 (С), 50 (D), 250 (Е) и 500 (F) нг/мл *Откалиброваны по 1-му Международному стандарту ВОЗ (72/225); 1 нг/мл = 0,825 МЕ/мл	6x2,0 мл
CON	Конъюгат (белая крышка)	1x13 мл

Готовый к использованию, <u>желтого цвета</u> , содержащий антитела козы к АФП, меченые пероксидазой хрена, и биотинилированные моноклональные антитела мыши к АФП; pH 7,45±0,1		
WS	Промывочный раствор (черная крышка) Концентрат MOPS-солевого буфера (на 1000 мл готового раствора), 5 ммоль/л; pH 8,8±0,4	1×20 мл
SA	Субстратный реагент А (желтая крышка) Ацетатный буфер (0,05 моль/л ацетата натрия), содержащий 1 г/л 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ); pH 3,5±0,1	1×7,0 мл
SB	Субстратный реагент В (голубая крышка) Ацетатный буфер (0,05 моль/л ацетата натрия), содержащий 10 ммоль/л комплекса мочевины с перекисью водорода; pH 4,5±0,1	1×7,0 мл
STOP	Стоп-реагент (красная крышка) Серная кислота 0,5 моль/л	1×7,5 мл
	Пленка для заклейки стрипов	1

- Общее содержание консервантов в реагентах < 0,04%.

Необходимое оборудование и материалы, не входящие в состав набора

1. Откалиброванные микропипетки со сменными наконечниками
2. Градуированная лабораторная посуда
3. Планшетный фотометр с длиной волны 450 и 630-690 нм
4. Дистиллированная или деионизованная вода.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Не пипетируйте реагенты ртом, не курите, не принимайте пищи во время исследования.
2. Избегайте контакта реагентов и проб с кожей и слизистыми.
3. Пользуйтесь специальной одеждой и одноразовыми перчатками.
4. Обращайтесь с калибраторами CAL и пробами, как с материалами, несущими инфекционную опасность.
5. Калибраторы CAL, входящие в состав набора, проверены на отсутствие антител к ВИЧ 1 и 2, вирусу гепатита С, а также HBs-антигена, тем не менее обращаться с ними надлежит, как с несущими потенциальную инфекционную опасность.
6. После исследования все материалы, контактировавшие с исследуемыми пробами или калибраторами, должны быть подвергнуты дезактивации автоклавированием в течение 1 часа при температуре 121 °С, или замачиванием в 5% растворе гипохлорита натрия в течение 1 часа.
7. Стоп-реагент STOP содержит серную кислоту, способную вызвать ожоги глаз и кожи. При попадании его на кожный покров и слизистые тщательно промойте их большим количеством проточной воды, после чего обратитесь к врачу.

ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ РЕАГЕНТОВ

Все реагенты должны храниться при температуре 2...8 °С. Конечная дата использования реагентов указана на их этикетках.

После вскрытия все реагенты и стрипы следует использовать в течение 60 дней (см. также раздел ПРИМЕЧАНИЕ).

Стрипы MIC

Стрипы запаяны в пластиковый металлизированный пакет с влагопоглотителем.

Перед вскрытием упаковки стрипы должны быть доведены до комнатной температуры во избежание конденсации влаги внутри лунок.

После вскрытия вакуумной упаковки остающиеся стрипы вернуть в пакет с влагопоглотителем и плотно закрыть его имеющейся на пакете самоуплотняющейся застежкой. Хранящиеся в таком виде при температуре 2...8 °С стрипы остаются пригодными к использованию до истечения срока годности (см. также раздел ПРИМЕЧАНИЕ).

Не трогайте руками дно лунок с наружной стороны и их верхние грани.

ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ И ПРОБ

Перед использованием все реагенты должны быть доведены до комнатной температуры (20-25 °С).

Не используемые реагенты должны храниться при температуре 2...8 °С.

Промывочный раствор WASH

Помутнение концентрата WS, которое может иметь место при хранении, полностью исчезает после разведения его водой до рабочей концентрации и не влияет на результаты анализа.

Для получения рабочего раствора WASH разведите концентрат WS свежей деионизированной водой до объема 1000 мл (остатки концентрата смыть из флакона несколькими порциями воды).

Промывочный раствор стабилен в течение 60 дней при 15-25 °C.

Рабочий раствор субстрата SUB

Определите предварительно количество рабочего раствора субстрата, необходимое для работы. Приготовьте раствор смешиванием равных объемов субстратного реагента SA и субстратного реагента SB. Используйте только чистую пластиковую посуду, промытую деионизованной водой.

Избегайте загрязнения раствора! Не используйте раствор, если он приобрел голубую окраску!

Храните рабочий раствор в защищенном от света месте.

Рабочий раствор субстрата SUB стабилен в течение 30 суток при 2...8 °C.

Если весь набор предполагается израсходовать в течение месяца, для приготовления рабочего раствора субстрата достаточно перелить содержимое флакона SA во флакон SB, перемешать и хранить при 2...8 °C.

Исследуемые пробы

Сыворотка крови.

Не используйте образцы с микробной контаминацией, гемолизом или гиперлипемией.

Пробы могут храниться до 5 дней при температуре 2...8 °C, или до 30 дней при температуре минус 20 °C.

Повторное замораживание проб не допускается. После размораживания пробы необходимо гомогенизировать. Видимые включения следует удалить центрифугированием или фильтрацией.

ПРОЦЕДУРА ИССЛЕДОВАНИЯ

Внимание! Точность полученных результатов зависит от строгого следования приведенной ниже процедуре исследования.

Предварительные замечания

1. Не смешивайте реагенты из разных партий наборов. Не путайте крышки от флаконов. Не пользуйтесь просроченными реагентами.
2. Не пользуйтесь реагентами, если они загрязнены, либо имеют запах или вид, отличный от обычного.
3. Аккуратно впишите номера калибраторов CAL, контролей и проб в листок-формуляр, приложенный к оригиналу инструкции.
4. Подсчитайте количество лунок, необходимое для данного исследования. Выньте необходимое количество стрипов MIC или отдельных лунок из упаковки и вставьте их в рамку-держатель. Исследование калибраторов CAL, контролей и проб должно проводиться в дубликатах.
5. Вносить пробы и калибраторы CAL необходимо как можно ближе к дну лунки.
6. Всегда вносите реагенты в лунки в одном и том же порядке, чтобы свести к минимуму разброс по времени реакции между отдельными лунками. Это важно для воспроизводимости результатов. Общее время пипетирования не должно превышать 10 минут. В противном случае, калибраторы следует вносить в отведенные для них лунки после пипетирования первой половины проб. Если для анализа используется больше одного микропланшета, калибровку следует выполнить заново.
7. Любые воздушные пузырьки в лунках должны быть удалены до начала инкубации или измерения оптической плотности.
8. Добавление рабочего раствора субстрата SUB инициирует процесс развития окраски, который прерывается при добавлении стоп-реагента STOP. Во время развития окраски предохраняйте ячейки от попадания яркого света.
9. После каждого пипетирования необходимо аккуратно перемешивать содержимое лунок в течение 20-30 секунд, избегая переноса жидкости из лунки в лунку. При возможности используйте шейкер для микропланшетов (например, встроенный шейкер планшетного фотометра HUMAREADER).

Методика промывки

Промывка лунок является исключительно важной стадией. Недостаточная промывка ведет к снижению точности полученных результатов и завышению оптической плотности.

1. Снимите со стрипов защитную пленку, после чего удалите жидкость из лунок и внесите в них промывочный раствор WASH. Через 30 секунд удалите жидкость из лунок и повторите промывку.
2. При использовании автоматического промывочного устройства заправьте его промывочным раствором и промойте лунки 3 раза. Следите за тем, чтобы вошер целиком заполнял ячейки жидкостью и полностью удалял ее через каждые 30 секунд (остаток жидкости должен быть менее 15 мкл).
3. После окончания промывки удалите остатки жидкости из лунок, постукивая перевернутым микропланшетом (стрипом) о фильтровальную бумагу.

Перед использованием все реагенты и образцы должны быть комнатной температуры.			
Стадия 1	Внесите в лунки:	Лунка [объем жидкости в мкл]	
		A1...D2	E2...
		Калибраторы	Образцы
		25	--
		--	25
CAL A – F; каждый в две лунки (дубликаты)		100	100
образцы, контроли; каждый в две лунки (дубликаты)			
конъюгат CON во все лунки			

Перемешайте и закройте стрипы MIC клейкой пленкой		
Инкубируйте 60 минут при 20-25 °C.		
Промойте лунки 3 раза, как описано (см. W1 - W3).		
Рабочий раствор промывочного буфера WASH	300	300
Стадия 2 Внесите в лунки:		
Рабочий раствор субстрата SUB	100	100
Инкубируйте 15 минут при 20-25 °C (см. P8).		
Добавьте стоп-реагент STOP	50	50
Тщательно перемешайте.		
После добавления стоп-реагента как можно быстрее (в течение <u>не более чем 30 минут</u>) измерьте оптическую плотность при длине волны 450 нм, используя (по возможности) референтную длину волны 630-690 нм.		

ВАЛИДАЦИЯ ТЕСТА

Результаты теста могут считаться достоверными, если выполняются следующие условия:

- Максимальная оптическая плотность ОП_{max} (калибратор CAL F) $\geq 1,5$
- Концентрация АФП при 80% ОП_{max} = 300 ± 75 нг/мл
- Концентрация АФП при 50% ОП_{max} = 145 ± 35 нг/мл
- Концентрация АФП при 20% ОП_{max} = 45 ± 12 нг/мл

РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для определения концентрации АФП в пробе по измеренной оптической плотности строится калибровочная кривая.

- Построить на миллиметровой бумаге калибровочный график, откладывая по оси абсцисс (X) концентрации АФП калибраторов CAL, а по оси ординат (Y) – соответствующие им дубликаты значений оптической плотности. Дубликаты перед нанесением не усреднять.
- Соединить точки на графике плавной линией.
- Для определения неизвестной концентрации АФП в пробе отложить на оси Y среднее для дубликата значение оптической плотности и провести горизонтальную прямую до пересечения с калибровочной кривой. Вертикальная линия, проведенная из точки пересечения до оси X, укажет значение концентрации АФП в пробе. Дубликаты значений оптической плотности для проб с неизвестной концентрацией можно предварительно усреднить.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Определение АФП показано при пренатальной диагностике дефектов плода, а также при диагностике и мониторинге терапии первичной гепатомы и тератомы.

При беременности аномально повышенный или пониженный уровни АФП могут указывать на пороки развития плода (см. раздел НАЗНАЧЕНИЕ). Физиологический уровень АФП в материнской сыворотке растет с 10 по 36-ю неделю беременности, достигая максимума в 400-500 нг/мл, после чего снижается до 250 нг/мл к моменту рождения. Референтные значения концентрации АФП для рекомендуемых сроков его определения приведены в Таблице 2.

АФП является опухолевым маркером первичной гепатоцеллюлярной карциномы – наиболее распространенной во всех странах формы рака. Чувствительность и специфичность теста в отношении этого заболевания составляет 95-100%.

Результаты определения АФП не могут являться единственным критерием при диагностике рака, диагноз должен основываться на всей совокупности клинических и лабораторных данных.

ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Таблица 1

	Концентрация АФП, нг/мл
Нормальный уровень для здоровой популяции (97-98%)	< 8,5
Пациенты с высоким риском гепатоцеллюлярной карциномы	100-350
Указание на гепатоцеллюлярную карциному	> 350

Концентрация АФП в сыворотке беременных зависит от срока гестации и варьирует для различных географических регионов. Ниже приведены типичные значения для медианы концентрации АФП при физиологической беременности:

Таблица 2

Неделя беременности	Концентрация АФП (медиана), нг/мл
16	33,4

17	37,5
18	44,8
19	50,8
20	58,1
21	68,2

Для пересчета единиц: 1 нг/мл = 0,825 МЕ/мл

Каждой лаборатории рекомендуется самостоятельно определять диапазон нормальных концентраций АФП с учетом используемого оборудования, способа взятия крови и методики анализа.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

АФП иммуноферментный тест фирмы HUMAN имеет чувствительность около 0,025 нг, что эквивалентно концентрации АФП в пробе 1 нг/мл.

Пробы с концентрацией АФП выше 500 нг/мл следует развести нормальной человеческой сывороткой (АФП < 3 нг/мл) в соотношении 1+9 и исследовать повторно. Полученный при этом результат умножьте на 10.

Сведения об аналитических характеристиках ИФА теста АФП фирмы HUMAN можно найти в Отчете об испытаниях, опубликованном в Интернете на сайтах:

<http://www.human.de/data/gb/vr/el-afp.pdf>

или

<http://www.human.de/data/gb/vr/el-afp.pdf>

ПРИМЕЧАНИЕ

Компоненты набора стабильны до окончания указанного срока годности даже после вскрытия их упаковки. Тем не менее, контаминация реагента зависит от количества отборов реагентов. 60-дневный срок использования реагентов установлен из соображений надежности получения результатов.

При работе с набором следует обеспечить постоянное соблюдение в лаборатории основных требований GLP (надлежащей лабораторной практики).

Данные требования в т.ч. включают: необходимость плотно закрывать флаконы их собственными крышками немедленно после отбора реагентов; отбирать только необходимое количество реагента, если предполагается его соприкосновение с другими растворами, способными вызвать контаминацию, например образцами пациентов; как можно быстрее возвращать исходные реагенты, если они не используются, в стандартные условия хранения (2...8 °C). Всегда должно проверяться соблюдение условий достоверности результатов теста.

СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

Список литературы приведен в оригинале инструкции на английском языке.

Внимание! Перевод сделан с английского оригинала инструкции.

Начальник отдела продукции



К.И. Бланк