

«УТВЕРЖДЕНА»

«УТВЕРЖДАЮ»

Приказом _____ Росздравнадзора
от «__» _____ 20__ г. № _____



Генеральный директор
ООО «Компания Алкор Био»
Швырев М.В.
«12» апреля 2010г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ
ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ИММУНОФЕРМЕНТНОГО
ОПРЕДЕЛЕНИЯ
альфа-ФЕТОПРОТЕИНА
В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА
(«ИФА-АФП»)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «ИФА-АФП» предназначен для количественного определения альфа-фетопротеина (АФП) в сыворотке крови человека методом твердо-фазного иммуноферментного анализа.

1.2. АФП является гликопротеином с молекулярной массой около 70 000 Да. В процессе развития человека АФП образуется главным образом в желточном мешке и эмбриональной печени и в меньшей степени в желудочно-кишечном тракте. Своей максимальной концентрации (до 240 000 МЕ/мл) в сыворотке крови плода АФП достигает в период 12–15 недель внутриутробного развития, после чего его уровень снижается и достигает нормы (0–16 МЕ/мл) к концу второго года жизни. В таких пределах в норме этот показатель сохраняется на протяжении всей жизни.

АФП, являясь главным белком сыворотки крови раннего плода, выделяется почками плода в амниотическую жидкость и оттуда через плаценту и пупочный канатик проникает в систему кровообращения матери. Уровень АФП в крови беременных женщин постоянно возрастает и достигает максимума (до 400 МЕ/мл) к середине третьего триместра беременности.

Изменение концентрации АФП в сыворотке крови беременных женщин является важным показателем пренатальной диагностики некоторых врожденных заболеваний (открытые пороки медуллярной трубы, синдром Дауна). Кроме того, этот метод широко применяется в акушерстве при диагностике множественной беременности, внутриутробной смерти плода и угрозе выкидыша. Определение уровня АФП также может быть использовано при диагностике и мониторинге различных видов рака. Так, например, высокий и удерживающийся уровень АФП (800–80 000 МЕ/мл и выше) очень часто сопутствует первичной гепатоме, тератомам семенников и опухолям эндодермального синуса яичников.

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

Примечание: в случае дробного применения набор может быть использован только в течение месяца после вскрытия компонентов набора.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип действия

В наборе «ИФА-АФП» использован «сэндвич»-вариант твердофазного иммуноферментного анализа. Для реализации этого варианта использованы два моноклональных антитела с различной эпитопной специфичностью к АФП. Одно из них иммобилизовано на твердой фазе (внутренняя поверхность лунок), второе конъюгировано с пероксидазой хрена. В лунках, при добавлении исследуемого образца и конъюгата анти-АФП-пероксидаза, во время инкубации одновременно происходит иммобилизация АФП, содержащегося в исследуемом образце, и связывание образовавшегося комплекса с конъюгатом.

Несвязавшиеся компоненты удаляются промывкой. Количество связавшегося конъюгата прямо пропорционально количеству АФП в исследуемом образце (Рисунок 1).

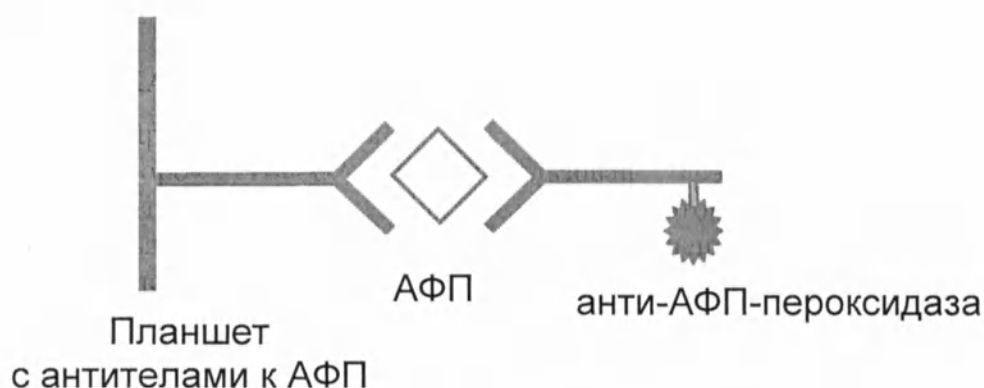


Рисунок 1. Схема анализа

Во время инкубации с раствором ТМБ происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски прямо пропорциональна концентрации АФП в анализируемых пробах. После измерения оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочного графика рассчитывается концентрация АФП в исследуемых образцах.

2.2. Состав набора

— комплект из двенадцати восьмилуночных стрипов в рамке с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок моноклональными антителами к АФП, маркирован «Стрипы с моноклональными антителами к АФП» — 1 упаковка;

— калибровочные пробы (КП), аттестованные по Первому международному стандарту WHO на АФП 72/225, содержащие известные количества АФП. Флаконы маркированы «Калибровочная проба №1», «Калибровочная проба №2», «Калибровочная проба №3», «Калибровочная проба №4», «Калибровочная проба №5», «Калибровочная проба №6»; точные значения концентраций АФП в калибровочных пробах указаны на этикетках флаконов, ориентировочные — 0; 10; 50; 100; 200; 300 МЕ/мл — 6 флаконов (лиофилизированные препараты или жидкости по 0,5 мл);

— конъюгат анти-АФП-пероксидаза, маркирован «Конъюгат Е» — 1 флакон (14 мл);

— водно-солевой раствор для разведения образцов сыворотки крови, маркирован «Буфер Д» — 1 флакон (10 мл);

— концентрированный водно-солевой раствор для промывки лунок, маркирован «Буфер Р» — 1 флакон (14 мл);

— раствор тетраметилбензидина, маркирован «Раствор ТМБ» — 1 флакон (14 мл);

- стоп-реагент (1 Н соляная кислота), маркирован «Стоп-реагент» — 1 флакон (14 мл);
- контрольная сыворотка с известным содержанием АФП, маркирована «Контрольная сыворотка» — 1 флакон (лиофилизированный препарат или жидкость 0,5 мл);
- прозрачный пластиковый пакет с замком (при упаковке стрипов в пакет из 2-слойного полиэтилена).

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность. Не обнаружено перекрестной реакции обоих моноклональных антител к АФП с сывороточным альбумином, хорионическим гонадотропином, плацентарным лактогеном и иммуноглобулинами человека.

3.2. Коэффициент вариации результатов определения АФП в одном и том же образце сыворотки крови человека с использованием набора «ИФА-АФП» не превышает 8%.

3.3. Линейность. Зависимость концентрации АФП в образцах сыворотки крови при разведении их буфером Д имеет линейный характер в диапазоне концентраций калибровочных проб №2 - №6 и составляет 90–110%.

3.4. Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» АФП — проверка соответствия значения определяемой концентрации АФП расчетной величине, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы №6. Процент открытия составляет 90–110%.

3.5. Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая набором концентрация АФП в сыворотке крови человека не превышает 0,9 МЕ/мл.

3.6. Хук-эффект высоких концентраций. В наборах реагентов, основанных на «сэндвич»-принципе анализа, при высоких концентрациях аналита зависимость величины оптической плотности от концентрации становится обратно пропорциональной (так называемый хук-эффект высоких концентраций). При использовании набора «ИФА-АФП» хук-эффект не обнаружен вплоть до концентрации АФП 12 500 МЕ/мл.

3.7. Диапазон ожидаемых значений. Концентрация АФП в сыворотке крови у 200 здоровых доноров обоих полов составила 0–14,4 МЕ/мл. В таблице 1 приведены значения ожидаемых показателей АФП у женщин на различных сроках нормально протекающей беременности. Значения медиан получены в Федеральном медико-генетическом центре при ГУНИИАГ им. Д.О. Отта РАМН, г. Санкт-Петербург. Всего исследовано 22 058 образцов крови беременных женщин Северо-Западного региона.

Таблица 1

Срок беременности (полных недель)	Медиана АФП, МЕ/мл	Толерантные пределы, МЕ/мл
14	28	13-47
15	31	17-70
16	35	19-62
17	38	22-69
18	45	25-60
19	48	28-92
20	54	29-104

Диапазон ожидаемых значений, медианы и их толерантные пределы зависят от многих факторов: специфичности метода, особенностей исследуемой популяции, точности метода в конкретной лаборатории. По этой причине каждой лаборатории рекомендуется использовать предоставленные изготовителем значения только до тех пор, пока специалистами лаборатории не будут определены диапазоны ожидаемых значений, характерных для конкретной популяции в месте расположения лаборатории.

Примечание: в наборе «ИФА-АФП» значения концентраций калибровочных проб выражены в МЕ/мл. Для пересчета концентраций АФП в нг/мл необходимо значение концентрации в МЕ/мл умножить на 1,21.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора — класс 2б.

4.2. Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

4.3. При работе с набором следует соблюдать ГОСТ Р 52905-2007 «Лаборатории медицинские. Требования безопасности».

4.4. Стоп-реагент представляет собой 1 Н раствор соляной кислоты. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания стоп-реагента на кожу и слизистые необходимо промыть пораженный участок большим количеством проточной воды.

4.5. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, т.к. производные крови, входящие в состав набора, и исследуемые образцы являются потенциально инфицированным материалом, способным длительное время сохранять и передавать возбудителей различных вирусных инфекций.

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

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

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

— Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках при длине волны 450 нм;

— прибор для встряхивания рамки со стрипами (термостатируемый шейкер), позволяющий производить встряхивание со скоростью 400–800 об/мин при температуре +37°C;

— пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками с изменяемым объемом отбора жидкостей: на 5–50 мкл; 40–200 мкл; 200–1000 мкл; 1000–5000 мкл;

— пипетка полуавтоматическая восьмиканальная со сменными наконечниками, позволяющая отбирать объемы жидкости до 300 мкл;

— цилиндр мерный, позволяющий отмерять 50-500 мл;

— стакан стеклянный подходящего объема;

— вода дистиллированная;

— бумага фильтровальная;

— перчатки резиновые или пластиковые;

- 1% раствор гипохлорита натрия или 6% раствор перекиси водорода;
- контейнер для дезинфекции;
- ванночки для внесения реагентов восьмиканальной пипеткой.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Забор крови из вены осуществляют с соблюдением правил асептики. После формирования сгустка сыворотку отделяют путем центрифугирования. После центрифугирования сыворотку переносят в отдельную пробирку.

6.2. Для проведения анализа не разрешается использовать плазму крови, гемолизированную или мутную сыворотку, а также образцы сыворотки, содержащие азид натрия.

6.3. Образцы сыворотки крови разрешается хранить при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$ не более 2-х суток; при необходимости более длительного хранения (до 3-х месяцев) рекомендуется аликвотировать образец и хранить в замороженном виде при температуре -20°C и ниже. Не допускается повторное замораживание образца.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Подготовка реагентов

7.1.1. Стрипы. Перед вскрытием пакет со стрипами необходимо выдержать при комнатной температуре ($+18...25^{\circ}\text{C}$) не менее 30 минут. Вскрыть пакет и переставить на свободную рамку необходимое количество стрипов.

7.1.2. Жидкие калибровочные пробы и контрольная сыворотка готовы к использованию.

Для восстановления лиофилизированных калибровочных проб и контрольной сыворотки перед вскрытием флаконов легким постукиванием стряхнуть частицы, прилипшие к стенкам флаконов или к крышкам. Открыть флаконы и положить крышки перевернутыми на сухую поверхность. В каждый флакон с калибровочной пробой и контрольной сывороткой внести по 0,5 мл дистиллированной воды и закрыть крышками. Выдержать флаконы в течение 10 минут при комнатной температуре без перемешивания. Затем, аккуратно наклоняя и вращая флаконы, перемешать их содержимое до полного растворения, избегая пенообразования. В течение следующих 10 минут выдержать флаконы при комнатной температуре, периодически перемешивая.

7.1.3. Конъюгат готов к использованию. Расход конъюгата на один стрип составляет 1,15 мл.

7.1.4. Буфер Д готов к использованию.

7.1.5. Промывочный раствор. Необходимое количество буфера Р развести дистиллированной водой в 20 раз.

Например:

5 мл буфера Р + 95 мл дистиллированной воды.

Тщательно перемешать, избегая пенообразования.

7.1.6. Раствор тетраметилбензидина (ТМБ) готов к использованию. Расход ТМБ на один стрип составляет 1,15 мл.

7.1.7. Стоп-реагент готов к использованию. Расход стоп-реагента на один стрип составляет 1,15 мл.

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

В приложении 1 приведена схема проведения анализа.

7.1.9. Разведение исследуемых образцов сывороток крови. Если по предварительным данным или по результатам анализа (см. п 9.3.) значения концентрации

АФП в исследуемых образцах выше КП №6, образцы следует развести буфером Д в 100 и 5000 раз. Пример подготовки образца к анализу:

Образец № 1 (разведение в 100 раз):

990 мкл буфера Д + 10 мкл исследуемого образца.

Образец № 2 (разведение в 5000 раз):

490 мкл буфера Д + 10 мкл образца № 1.

При каждом разведении необходимо тщательное перемешивание.

7.2. Постановка анализа

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

A1, A2 — № 1 — для измерения величины оптической плотности раствора ТМБ;

B1, B2 — № 2 — для измерения величины оптической плотности КП №1;

C1, C2 — № 3 — для измерения величины оптической плотности КП №2;

D1, D2 — № 4 — для измерения величины оптической плотности КП №3;

E1, E2 — № 5 — для измерения величины оптической плотности КП №4;

F1, F2 — № 6 — для измерения величины оптической плотности КП №5;

G1, G2 — № 7 — для измерения величины оптической плотности КП №6;

H1, H2 — № 8 — для измерения величины оптической плотности контрольной сыворотки.

7.2.2. Во все лунки, кроме лунок A1 и A2, внести по 100 мкл конъюгата.

7.2.3. Внести в соответствующие лунки по 20 мкл калибровочных проб и контрольной сыворотки, в оставшиеся лунки - по 20 мкл исследуемой сыворотки крови в дубликатах.

Примечание: общее время внесения калибровочных проб, контрольной сыворотки и исследуемых сывороток крови не должно превышать 15 минут, иначе время инкубации разных образцов будет значительно различаться, что приведет к неправильным результатам.

7.2.4. Инкубировать стрипы в течение 60 минут при встряхивании в термостатируемом шейкере при температуре +37°C со скоростью 500–800 об/мин.

7.2.5. По окончании инкубации удалить содержимое лунок в контейнер с дезинфицирующим раствором (1% раствором гипохлорита натрия или 6% раствором перекиси водорода) и промыть лунки пять раз. При каждой промывке во все лунки добавлять по 300 мкл промывочного раствора, приготовленного по п. 7.1.5, встряхнуть рамку на шейкере в течение 5–10 секунд с последующим декантированием. После последнего декантирования тщательно удалить остатки жидкости из лунок постукиванием рамки со стрипами в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

Допускается промывка лунок при помощи автоматического промывочного устройства.

7.2.6. Немедленно 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.

Примечание: максимальная оптическая плотность не должна превышать пределов линейного измерения спектрофотометра. Рабочий диапазон спектрофотометра необходимо уточнять в паспорте прибора. Рекомендуемая максимальная оптическая плотность не более 2,5 ед. ОП.

7.2.7. Добавить во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор ТМБ, по 100 мкл стоп-реагента для остановки ферментной реакции, встряхивать на шейкере в течение 1–2 минут при комнатной температуре (+18...25°C).

7.2.8. Если невозможно измерить оптическую плотность в лунках планшета непосредственно после выполнения п. 7.2.7., то следует иметь в виду, что окраска в лунках планшета стабильна не более 20 минут при температуре +18...25°C.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Измерить на фотометре вертикального сканирования оптическую плотность в лунках при длине волны 450 нм.

При регистрации результатов необходимо вычитать величину оптической плотности в лунках А1 и А2 из значений оптических плотностей всех остальных лунок.

Примечание: среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках А1 и А2 не должно превышать 0,09 ед.ОП.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Построить калибровочный график зависимости оптических плотностей от концентрации АФП (МЕ/мл) в калибровочных пробах (Рисунок 2). Внешний вид графика зависит от способа преобразования осей.

Примечание 1: для построения калибровочных графиков рекомендуется использовать Программное обеспечение «ИФА Мастер».

Примечание 2: для построения калибровочного графика на масштабной бумаге необходимо использовать данные оптических плотностей после вычитания из них средней величины оптической плотности лунок с ТМБ.

Если программа фотометра не позволяет вычитать величину оптической плотности лунок А1 и А2, то необходимо пользоваться формулой:

$$B - B_T,$$

где B — среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках, содержащих калибровочные или исследуемые пробы,

B_T — среднее арифметическое значение оптической плотности лунок А1 и А2.

9.2. Определить содержание АФП в пробах по калибровочному графику. В случае дополнительного разведения образцов необходимо измеренную концентрацию АФП умножить на фактор разведения.

9.3. Экстраполяция калибровочного графика для значений концентрации АФП, превышающих номинал КП №6, не допускается. Для точного определения концентрации в таких образцах необходимо выполнить их разведение в соответствии с п. 7.1.9.

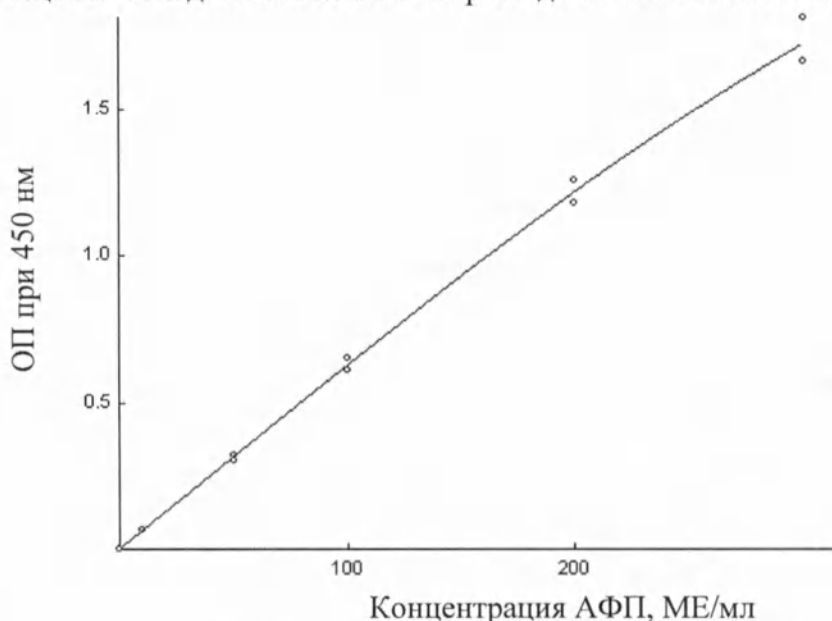


Рисунок 2. Типичный калибровочный график

Запрещается использовать для оценки реальных экспериментальных данных!

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1. Набор «ИФА-АФП» должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности. Допускается хранение набора при температуре до $+25^{\circ}\text{C}$ не более 5 суток.

Срок годности набора — 12 месяцев.

10.2. Набор следует вынимать из холодильника не более чем за 1 час до начала анализа, но не позже, чем за 30 минут до проведения анализа.

10.3. В случае дробного использования компоненты набора необходимо хранить следующим образом:

- стрипы поместить сначала в пакет с этикеткой, затем в пластиковый пакет с замком и герметично закрыть. Хранить в герметично закрытом пакете при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности;

- жидкие, готовые к использованию, калибровочные пробы и контрольную сыворотку после вскрытия флаконов хранить при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$ не более 1 месяца;

- восстановленные (растворенные) из лиофилизированных препаратов калибровочные пробы и контрольную сыворотку хранить при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$ не более 1 месяца;

- конъюгат, буфер Д и раствор ТМБ после вскрытия флаконов хранить при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$ не более 1 месяца;

- промывочный раствор, подготовленный к использованию, хранить закрытым при комнатной температуре ($+18...25^{\circ}\text{C}$) не более 5 суток;

- буфер Р и стоп-реагент после вскрытия флаконов хранить при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности.

10.4. При использовании набора для проведения нескольких независимых анализов необходимо иметь в виду следующее:

- для каждого независимого эксперимента необходимо построение нового калибровочного графика и рекомендуется определение концентрации АФП в контрольной сыворотке;

- запрещается возвращать избыток конъюгата, ТМБ и стоп-реагента из ванночек во флаконы;

- из флаконов с открытыми крышками происходит испарение, которое может привести к получению некорректных результатов при повторном использовании реагентов. После окончания внесения реагентов в лунки планшета на каждой стадии анализа необходимо плотно закрывать крышки флаконов и помещать в рекомендуемые условия хранения.

10.5. Не допускается смешивание или одновременное использование реагентов из разных партий, за исключением ТМБ, стоп-реагента и концентрированного промывочного раствора, входящего в состав данного набора реагентов.

10.6. Запрещается использовать концентрированный промывочный раствор, стоп-реагент и ТМБ из наборов реагентов других фирм-производителей.

10.7. К работе с набором допускается только специально обученный персонал.

10.8. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции.