

«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 АССОЦИИРОВАННОГО С БЕРЕМЕННОСТЬЮ
ПРОТЕИНА А ПЛАЗМЫ
В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА
(«ИФА-РАРР-А»)**

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «ИФА-РАРР-А» предназначен для количественного определения РАРР-А (ассоциированного с беременностью протеина А плазмы) в сыворотке крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Определяемый анализ является гетеротетрамером, состоящим из двух субъединиц РАРР-А с молекулярной массой 250 кДа и двух субъединиц proMBP (основной белок эозинофилов) с молекулярной массой 50-90 кДа. В первом триместре беременности при синдроме Дауна у плода наблюдается снижение уровня РАРР-А в сыворотке крови матери. После 14-й недели беременности различия между уровнем РАРР-А в сыворотке крови матери при синдроме Дауна и нормой исчезают.

Установлено, что комбинация данного теста с определением свободной бета-субъединицы ХГЧ, данными УЗИ (толщина воротникового пространства), оценкой возрастных факторов риска является оптимальным методом для пренатального скрининга синдрома Дауна в первом триместре беременности.

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

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

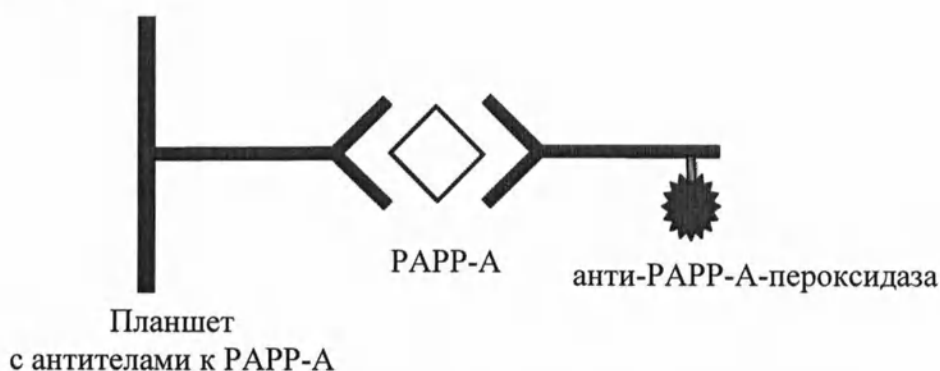


Рисунок 1. Схема анализа

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

2.2. Состав набора:

- комплект из двенадцати восьмилуночных стрипов в рамке с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок моноклональными антителами к РАРР-А, маркирован «Стрипы с моноклональными антителами к РАРР-А» — 1 упаковка;
- калибровочные пробы (КП), содержащие известные количества РАРР-А. Флаконы маркированы «Калибровочная проба №1», «Калибровочная проба №2», «Калибровочная проба №3», «Калибровочная проба №4», «Калибровочная проба №5», «Калибровочная проба №6»; точные значения концентраций РАРР-А в калибровочных пробах указаны на этикетках флаконов, ориентировочные — 0; 0.175; 0.7; 1.75; 3.5 и 7.0 мЕд/мл — 6 флаконов (лиофилизированные препараты или жидкости, по 0,5 мл);
- конъюгат анти-РАРР-А-пероксидаза, маркирован «Конъюгат Е» — 1 флакон (25 мл);
- водно-солевой раствор для разведения образцов сыворотки крови, маркирован «Буфер Д» — 1 флакон (3 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 РАРР-А, 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. Используемые в наборе антитела обладают специфичностью только к гетеротетрамеру RAPP-A/proMBP.

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

3.3. Линейность. Зависимость концентрации RAPP-A 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» RAPP-A — проверка соответствия значения определяемой концентрации RAPP-A расчетной величине, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы №3. Процент открытия составляет 90–110 %.

3.5. Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая набором концентрация RAPP-A в сыворотке крови человека не превышает 0,02 мЕд/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-RAPP-A» хук-эффект не обнаружен вплоть до концентрации RAPP-A 412 мЕд/мл.

3.7. Диапазон ожидаемых значений. Концентрацию RAPP-A измеряли в сыворотках крови 971 беременных женщин с 9 по 13 неделю беременности. Значения медиан по срокам беременности приведены в Таблице 1.

Таблица 1

Срок беременности (недели)	Медиана RAPP-A (мЕд/мл)	Минимальное/максимальное значение концентрации RAPP-A в группе (мЕд/мл)	Число образцов в группе
9	0,65	0,09 / 5,4	112
10	1,2	0,04 / 8,0	202
11	1,7	0,19 / 17,1	256
12	2,8	0,27 / 16,8	308
13	3,9	1,02 / 17,8	93

Значение медианы, рассчитанное для каждого срока беременности, зависит от многих факторов: специфичности метода, особенностей исследуемой популяции, точности метода в конкретной лаборатории. По этой причине каждой лаборатории рекомендуется использовать предоставленные изготовителем значения медиан только до тех пор, пока специалистами лаборатории не будут определены медианы, характерные для конкретной популяции в месте расположения лаборатории.

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 требования 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 раствора 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; на 40–200 мкл; на 200–1000 мкл; на 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. Для проведения анализа не следует использовать плазму крови, гемолизированную или мутную сыворотку, а также образцы сыворотки, содержащие азид натрия.

6.2. Образцы сыворотки крови разрешается хранить при температуре +2...8°C не более 6 дней; при необходимости более длительного хранения 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°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 Е готов к использованию. Расход конъюгата Е на один стрип составляет 2,08 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°C).

В Приложении 1 приведена схема проведения анализа.

7.1.9. Разведение исследуемых образцов сывороток крови. Если по результатам анализа (см. п 9.3.) значения концентрации РАРР-А в исследуемых образцах выше КП №6, образцы следует развести буфером Д в 5 раз. Пример подготовки образца к анализу:

120 мкл буфера Д + 30 мкл исследуемого образца

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 200 мкл Конъюгата Е.

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 различных образцов будет значительно отличаться, что приведет к неправильным результатам.

7.2.4. Инкубировать стрипы в течение 90 минут при встряхивании в термостатируемом шейкере при температуре $+37^{\circ}\text{C}$ со скоростью 500-700 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 5 раз. При каждой промывке во все лунки добавить 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 ($+18...25^{\circ}\text{C}$) 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, перемешать на шейкере в течение 1-2 минут при комнатной температуре ($+18...25^{\circ}\text{C}$).

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 $+18...25^{\circ}\text{C}$.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

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

При регистрации результатов необходимо вычитать величину оптической плотности в лунках A1 и A2 из значений оптических плотностей всех остальных лунок.

Примечание: среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках A1 и A2 не должно превышать 0,09 ед. ОП.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Построить калибровочный график зависимости оптических плотностей от концентрации PAPP-A (мЕд/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 A1 и A2, 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 $A1$ и $A2$.

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

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

9.4. Для расчета риска в пренатальном скрининге результаты измерения РАРР-А указываются в MOM (multiple of medians) и вычисляются по формуле:

$$\text{MOM} = \text{Измеренная концентрация (РАРР-А)} / \text{Медиана РАРР-А.}$$

9.5. Для автоматизированного расчета риска синдрома Дауна можно воспользоваться специальным программным обеспечением.

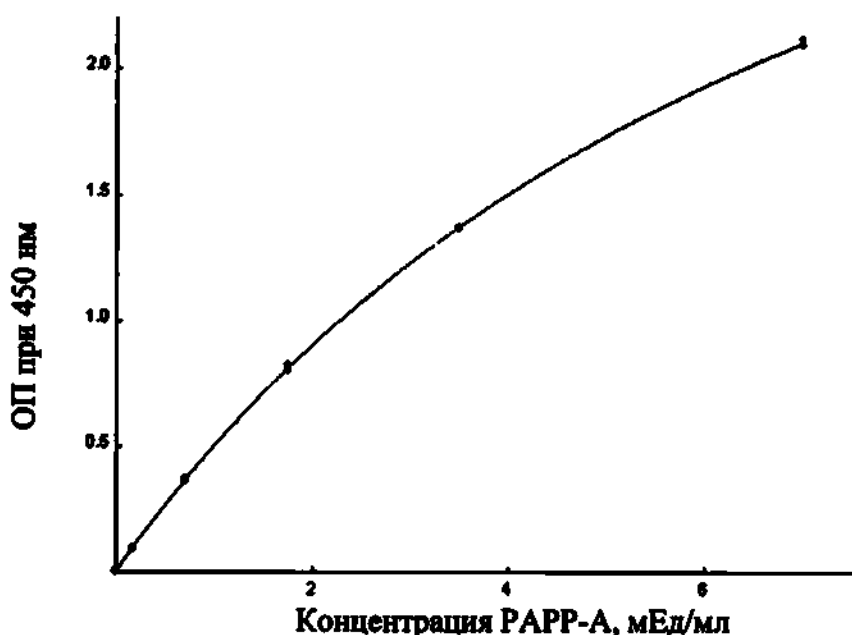


Рисунок 2. Типичный калибровочный график

Запрещается использовать для оценки реальных экспериментальных данных!

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1. Набор «ИФА-РАРР-А» 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°C не более 1 месяца;
- конъюгат Е, буфер Д и раствор ТМБ после вскрытия флаконов хранить при температуре +2...8°C не более 1 месяца;
- промывочный раствор, подготовленный к использованию, хранить закрытым при комнатной температуре (+18...25°C) не более 5 суток;
- буфер Р и стоп-реагент после вскрытия флаконов хранить при температуре +2...8°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 РАРР-А 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-реагенты 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.

По вопросам качества набора «ИФА-РАРР-А» следует обращаться в ООО «Компания Алкор Био» по адресу: 197758, г. Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, д. 70, телефон/факс: (812) 677-87-79.

Генеральный директор
ООО «Компания АлкорБио»



Швырев М.В.

Руководитель лаборатории разработки ИФА-систем
ООО «Компания АлкорБио»

Сусорова А.С.

«СОГЛАСОВАНО»

Главный врач НИИАГ им. Д.О. Отта СЗО РАМН



СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

Приложение 1

№	Стадия (операция)	Реагенты	Температура	Время	Примечания
1	Внесение реагентов	200 мкл конъюгата анти-РАРР-А-пероксидазы	КТ +18 ...25°C	Внесение КП, КС и исследуемых образцов не более 15'	В лунки для определения ОП ТМБ ничего не вносить
2		20 мкл КП и КС			
3		20 мкл исследуемых образцов			
4	Инкубация	—	+37°C	90'	Термостатируемый шейкер, 500-700об/мин
5	Промывка	300 мкл в лунку 1*промывочного раствора (5 раз)			1*промывочный раствор = 14 мл буфера Р+266 мл Н ₂ О
6	Внесение хромогена	100 мкл ТМБ			
7	Инкубация с ТМБ	—	КТ	15' - 30'	В темноте
8	Остановка ферментной реакции	100 мкл стоп-реагента			
9	Перемешивание		КТ	1 - 2'	Шейкер
10	Регистрация результатов	—		В течение 20' после остановки ферментной реакции	Фотометр, 450 нм
11	Обработка результатов				Калькулятор и масштабная бумага/ соответствующее ПО

Примечания: КП — калибровочная проба; КС — контрольная сыворотка; ОП — оптическая плотность;
КТ — комнатная температура (+18...25°C); ПО — программное обеспечение.

Прошито, пронумеровано, скреплено
печатью 9 (девять) листов
Генеральный директор
ООО «Компания Алкор Био»

М.В.Швырев



«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 АССОЦИИРОВАННОГО С БЕРЕМЕННОСТЬЮ
ПРОТЕИНА А ПЛАЗМЫ
В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА
(«ИФА-РАРР-А»)**

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «ИФА-РАРР-А» предназначен для количественного определения РАРР-А (ассоциированного с беременностью протеина А плазмы) в сыворотке крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Определяемый аналит является гетеротетрамером, состоящим из двух субъединиц РАРР-А с молекулярной массой 250 кДа и двух субъединиц proMBP (основной белок эозинофилов) с молекулярной массой 50-90 кДа. В первом триместре беременности при синдроме Дауна у плода наблюдается снижение уровня РАРР-А в сыворотке крови матери. После 14-й недели беременности различия между уровнем РАРР-А в сыворотке крови матери при синдроме Дауна и нормой исчезают.

Установлено, что комбинация данного теста с определением свободной бета-субъединицы ХГЧ, данными УЗИ (толщина воротникового пространства), оценкой возрастных факторов риска является оптимальным методом для пренатального скрининга синдрома Дауна в первом триместре беременности.

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

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

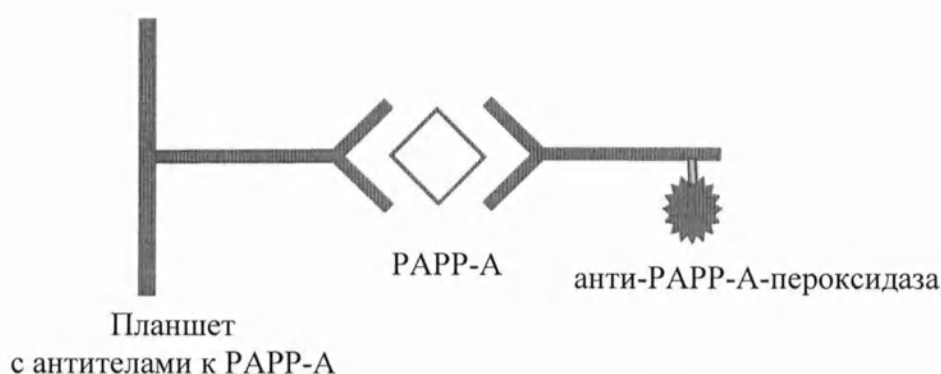


Рисунок 1. Схема анализа

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

2.2. Состав набора:

- комплект из двенадцати восьмилуночных стрипов в рамке с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок моноклональными антителами к РАРР-А, маркирован «Стрипы с моноклональными антителами к РАРР-А» — 1 упаковка;
- калибровочные пробы (КП), содержащие известные количества РАРР-А. Флаконы маркированы «Калибровочная проба №1», «Калибровочная проба №2», «Калибровочная проба №3», «Калибровочная проба №4», «Калибровочная проба №5», «Калибровочная проба №6»; точные значения концентраций РАРР-А в калибровочных пробах указаны на этикетках флаконов, ориентировочные — 0; 0.175; 0.7; 1.75; 3.5 и 7.0 мЕд/мл — 6 флаконов (лиофилизированные препараты или жидкости, по 0,5 мл);
- конъюгат анти-РАРР-А-пероксидаза, маркирован «Конъюгат Е» — 1 флакон (25 мл);
- водно-солевой раствор для разведения образцов сыворотки крови, маркирован «Буфер Д» — 1 флакон (3 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 РАРР-А, 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. Используемые в наборе антитела обладают специфичностью только к гетеротетрамеру RAPP-A/proMBP.

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

3.3. Линейность. Зависимость концентрации RAPP-A 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» RAPP-A — проверка соответствия значения определяемой концентрации RAPP-A расчетной величине, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы №3. Процент открытия составляет 90–110 %.

3.5. Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая набором концентрация RAPP-A в сыворотке крови человека не превышает 0,02 мЕд/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-RAPP-A» хук-эффект не обнаружен вплоть до концентрации RAPP-A 412 мЕд/мл.

3.7. Диапазон ожидаемых значений. Концентрацию RAPP-A измеряли в сыворотках крови 971 беременных женщин с 9 по 13 неделю беременности. Значения медиан по срокам беременности приведены в Таблице 1.

Таблица 1

Срок беременности (недели)	Медиана RAPP-A (мЕд/мл)	Минимальное/максимальное значение концентрации RAPP-A в группе (мЕд/мл)	Число образцов в группе
9	0,65	0,09 / 5,4	112
10	1,2	0,04 / 8,0	202
11	1,7	0,19 / 17,1	256
12	2,8	0,27 / 16,8	308
13	3,9	1,02 / 17,8	93

Значение медианы, рассчитанное для каждого срока беременности, зависит от многих факторов: специфичности метода, особенностей исследуемой популяции, точности метода в конкретной лаборатории. По этой причине каждой лаборатории рекомендуется использовать предоставленные изготовителем значения медиан только до тех пор, пока специалистами лаборатории не будут определены медианы, характерные для конкретной популяции в месте расположения лаборатории.

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 требования 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 раствора 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; на 40–200 мкл; на 200–1000 мкл; на 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. Для проведения анализа не следует использовать плазму крови, гемолизированную или мутную сыворотку, а также образцы сыворотки, содержащие азид натрия.

6.2. Образцы сыворотки крови разрешается хранить при температуре +2...8°C не более 6 дней; при необходимости более длительного хранения 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°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 Е готов к использованию. Расход конъюгата Е на один стрип составляет 2,08 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°C).

В Приложении 1 приведена схема проведения анализа.

7.1.9. Разведение исследуемых образцов сывороток крови. Если по результатам анализа (см. п 9.3.) значения концентрации PAPP-A в исследуемых образцах выше КП №6, образцы следует развести буфером Д в 5 раз. Пример подготовки образца к анализу:

120 мкл буфера Д + 30 мкл исследуемого образца

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 200 мкл Конъюгата Е.

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 различных образцов будет значительно отличаться, что приведет к неправильным результатам.

7.2.4. Инкубировать стрипы в течение 90 минут при встряхивании в термостатируемом шейкере при температуре $+37^{\circ}\text{C}$ со скоростью 500-700 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 5 раз. При каждой промывке во все лунки добавить 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 ($+18...25^{\circ}\text{C}$) 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, перемешать на шейкере в течение 1-2 минут при комнатной температуре ($+18...25^{\circ}\text{C}$).

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 $+18...25^{\circ}\text{C}$.

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 A1 и A2 из значений оптических плотностей всех остальных лунок.

Примечание: среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках A1 и A2 не должно превышать 0,09 ед. ОП.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Построить калибровочный график зависимости оптических плотностей от концентрации PAPP-A (мЕд/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 A1 и A2, 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 $A1$ и $A2$.

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

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

9.4. Для расчета риска в пренатальном скрининге результаты измерения РАРР-А указываются в MOM (multiple of medians) и вычисляются по формуле:

$$\text{MOM} = \text{Измеренная концентрация (РАРР-А)} / \text{Медиана РАРР-А.}$$

9.5. Для автоматизированного расчета риска синдрома Дауна можно воспользоваться специальным программным обеспечением.

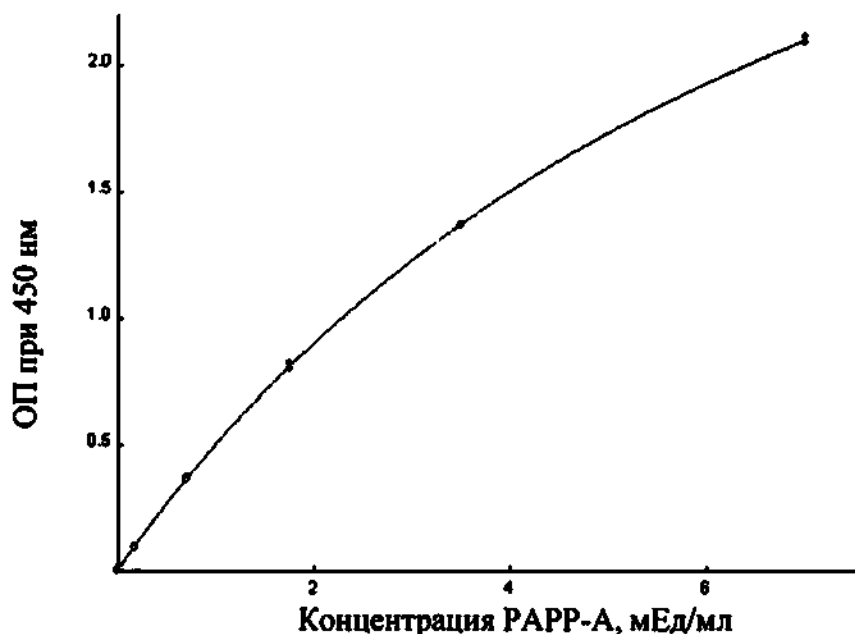


Рисунок 2. Типичный калибровочный график

Запрещается использовать для оценки реальных экспериментальных данных!

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1. Набор «ИФА-РАРР-А» 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 Е, 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 PAPP-A 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-реагенты 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.

По вопросам качества набора «ИФА-PAPP-A» следует обращаться в ООО «Компания Алкор Био» по адресу: 197758, г. Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, д. 70, телефон/факс: (812) 677-87-79.

Генеральный директор
ООО «Компания АлкорБио»



Швырев М.В.

Руководитель лаборатории разработки ИФА-систем
ООО «Компания АлкорБио»

Сусорова А.С.

«СОГЛАСОВАНО»
Главный врач ГУЗ «Диагностический центр
(медико-генетический)»



Романенко О.П.

СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

Приложение 1

№	Стадия (операция)	Реагенты	Температура	Время	Примечания
1	Внесение реагентов	200 мкл конъюгата анти-РАРР-А-пероксидазы	КТ +18 ...25°C	Внесение КП, КС и исследуемых образцов не более 15'	В лунки для определения ОП ТМБ ничего не вносить
2		20 мкл КП и КС			
3		20 мкл исследуемых образцов			
4	Инкубация	—	+37°C	90'	Термостатируемый шейкер, 500-700об/мин
5	Промывка	300 мкл в лунку 1*промывочного раствора (5 раз)			1*промывочный раствор = 14 мл буфера Р+266 мл Н ₂ О
6	Внесение хромогена	100 мкл ТМБ			
7	Инкубация с ТМБ	—	КТ	15' - 30'	В темноте
8	Остановка ферментной реакции	100 мкл стоп-реагента			
9	Перемешивание		КТ	1 - 2'	Шейкер
10	Регистрация результатов	—		В течение 20' после остановки ферментной реакции	Фотометр, 450 нм
11	Обработка результатов				Калькулятор и масштабная бумага/ соответствующее ПО

Примечания: КП — калибровочная проба; КС — контрольная сыворотка; ОП — оптическая плотность;

КТ — комнатная температура (+18...25°C); ПО — программное обеспечение.

Прошито, пронумеровано, скреплено
печатью 9 (девятка) лист 1

Генеральный директор
ООО «Компания Алкор Био»
В. Швырев

