

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от _____ 200__ г.

№ _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор ЗАО «Иммуноскрин»

Осин Н.С.



2009 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению Набора реагентов для количественного определения иммунореактивного трипсина (ИРТ) в сухих пятнах крови новорожденных методом лантанидного иммунофлуоресцентного анализа «ИРТ-НЕОСКРИН»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «ИРТ-НЕОСКРИН» предназначен для количественного определения иммунореактивного трипсина (ИРТ) в сухих пятнах крови новорожденных методом лантанидного иммунофлуоресцентного анализа.

1.2. Количественное определение ИРТ в сухих пятнах крови используется для скрининга новорожденных на кистозный фиброз (муковисцидоз).

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Диагностическая значимость определения ИРТ.

Муковисцидоз или кистозный фиброз поджелудочной железы - одно из наиболее распространенных наследственных заболеваний. Это заболевание характеризуется недостаточностью экзокринной функции поджелудочной железы, а также прогрессирующими бронхо-легочными нарушениями, которые являются наиболее опасными для жизни больных. Муковисцидоз наиболее распространен среди представителей белой расы, среди них заболевание встречается с частотой 1:2 000 новорожденных. Причиной возникновения болезни являются мутации в гене, контролирующем синтез мембранного белка - регулятора транспорта электролитов через мембрану эпителиальных клеток. Дефект трансмембранного белка вызывает нарушение транспорта электролитов и водного обмена в эпителиальных клетках легких и поджелудочной железы, приводящее к повышению вязкости секретов за счет гиперконцентрации в них высокомолекулярных соединений, что, в свою очередь, влечет за собой нарушение проходимости бронхов, выводных протоков и их закупорку.

Диагностика муковисцидоза основывается на совокупности клинических признаков болезни и результатах биохимических, иммунологических и молекулярно-генетических тестов. Диагноз клинический подтверждается потовой пробой. Патология выделительной функции поджелудочной железы на ранней стадии заболевания (до проявления клинических признаков болезни) приводит к увеличению проникновения трипсина в кровеносную систему, поэтому в

последнее время основным методом первичного неонатального скрининга на муковисцидоз стало обнаружение повышенных уровней иммунореактивного трипсина (ИРТ) в сухих пятнах крови новорожденных.

Набор «ИРТ-НЕОСКРИН» измеряет уровень секретируемого ацинарными клетками поджелудочной железы ферментативно неактивного трипсиногена, превращающегося в дальнейшем в ферментативно активный трипсин.

Ранняя диагностика муковисцидоза с помощью неонатального скрининга имеет большое значение для клинического прогноза пациента. Раннее начало лечения позволяет предотвратить задержку в развитии ребенка, снизить риск развития легочных инфекций и тяжелой гемолитической анемии, дефицита витамина Е и цинка, а также нарушений метаболизма линолеиновой кислоты.

2.2. Принцип работы Набора. Набор «ИРТ-НЕОСКРИН» основан на принципе лантанидного иммунофлуоресцентного анализа (ЛИФА), включающего использование сэндвича высокоспецифичных моноклональных мышиных антител к ИРТ.

Во время инкубации в лунках планшета, на внутренней поверхности которых сорбированы моноклональные анти-ИРТ-антитела, из кровяных дисков, приготовленных из сухих пятен крови новорожденных, калибровочных и контрольных проб, элюируется ИРТ и одновременно образует сэндвич между сорбированными антителами и вторыми антителами, конъюгированными с ионами европия.

После инкубации диски удаляются, а 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.

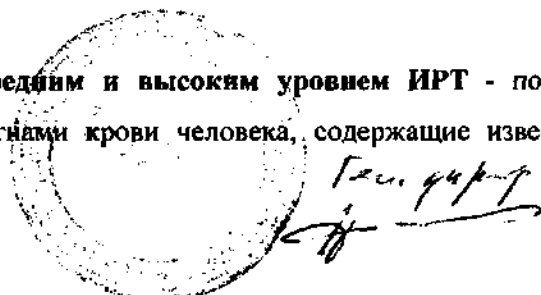
Интенсивность флуоресценции ионов европия прямо пропорциональна количеству ИРТ в исследуемом образце. Результаты анализа регистрируются с помощью флуориметра с временным разрешением на длине волны 615 нм при возбуждении светом с длиной волны 340-380 нм.

2.3. Состав Набора:

- **планшеты** 96-луночные полистироловые стрипированные, с сорбированными на внутренней поверхности лунок мышиными моноклональными анти-ИРТ антителами; готовы к использованию-10 шт.;

- **калибровочные пробы** - полоски фильтровальной бумаги с высушенными пятнами крови человека, содержащие ИРТ в концентрациях: 0 (А); 25 (В); 50 (С); 100 (D); 250 (Е); 500 (F) нг/мл крови; концентрации ИРТ в калибровочных пробах могут несколько отличаться от указанных величин, точные концентрации указаны в аналитическом паспорте и на этикетках флаконов; готовы к использованию - 1 пакет;

- **контрольные пробы с низким, средним и высоким уровнем ИРТ** - полоски фильтровальной бумаги с высушенными пятнами крови человека, содержащие известные



количества ИРТ, указанные в аналитическом паспорте и на этикетке флаконов; готовы к использованию – 1 комплект;

- конъюгат, 100-кратный концентрат - 1 пробирка или флакон (2,5 мл);
- усиливающий раствор, готов к использованию - 1 флакон (250 мл);
- ЛИФА-Буфер, готов к использованию - 1 флакон (250 мл);
- концентрат отмывочного раствора, 25-кратный концентрат - 1 флакон (250 мл).

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность. Использование моноклональных антител к ИРТ позволяет достичь высокой специфичности определения.

3.2. Диапазон определяемых концентраций ИРТ с помощью набора «ИРТ-НЕОСКРИН» составляет 25-500 нг/мл.

3.3. Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая набором «ИРТ-НЕОСКРИН» концентрация ИРТ не превышает 4,0 нг/мл.

3.4. Воспроизводимость результатов. Коэффициент вариации (К.В.) результатов определения ИРТ с помощью набора «ИРТ-НЕОСКРИН» не превышает 15%.

3.5. Клиническая проверка. Проведенные исследования показали, что концентрация ИРТ в крови у здоровых новорожденных не превышала 90 нг/мл.

3.6. Скрининг новорожденных на муковисцидоз с помощью набора «ИРТ-НЕОСКРИН» основан на использовании величины пороговой концентрации ИРТ, которую следует уточнять в каждой лаборатории. Для чего на первой стадии проводится массовое рутинное определение ИРТ у новорожденных, затем для новорожденных с повышенным уровнем ИРТ проводится либо ДНК-исследование, либо повторное измерение ИРТ с последующим подтверждением результатов потовой пробой.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения Набора - класс 2а (ГОСТ Р 51609-2000).

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

4.3. Все компоненты Набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

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

- флуориметр с временным разрешением, позволяющий измерять флуоресценцию раствора в лунках при длине волны 615 нм;
- дозаторы со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости в диапазоне 100-1500 мкл;
- устройство для встряхивания планшетов (шейкер);
- промывающее устройство для планшетов;

- устройство для внесения усиливающего раствора (диспенсер), позволяющее вносить в лунки планшета по 200 мкл усиливающего раствора;
- устройство для приготовления дисков из пятна (панчер);
- устройство для удаления дисков из лунок;
- холодильник бытовой;
- цилиндр мерный вместимостью 25 и 200 мл;
- колба мерная вместимостью 1 л;
- вода дистиллированная;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- бумага фильтровальная.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА.

6.1. Кровь отбирается обычным способом, стерильным скарификатором из пальца или пятки, падающей каплей, не касаясь бланка. Пятно крови на бумаге должно быть образовано пропитыванием от одной капли, а пропитывание бумаги достаточным (вид пятна одинаков с обеих сторон).

Размер насквозь пропитанного кровью диска должен быть в диаметре не менее 12 мм.

Таких дисков (пятен) у каждого пациента должно быть не меньше трех. Образцы крови, наносимые на фильтровальную бумагу, не должны содержать ЭДТА во избежание искажения результатов анализа. Полученные пятна крови высушивают в течение 2-3 часов в горизонтальном положении при комнатной температуре (+18-25 °C), избегая попадания прямых солнечных лучей.

Бланки с высушенными пятнами должны храниться в полиэтиленовом пакете при температуре +2-8 °C не более 1 месяца.

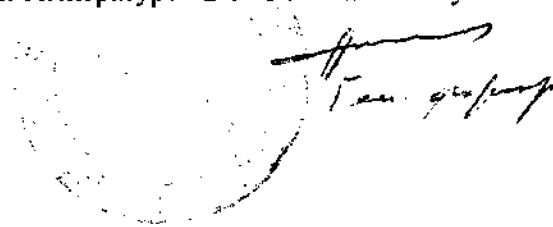
6.2. Перед проведением анализа компоненты Набора следует выдержать при комнатной температуре (+18-25 °C) не менее 30 мин. Перед использованием реагенты тщательно перемешать легким встряхиванием.

6.3. При использовании Набора для проведения нескольких независимых серий анализов необходимо построение нового калибровочного графика для каждого независимого определения.

6.4. Приготовление рабочего отмывочного раствора.

В мерную колбу вместимостью 1 л внести 40 мл концентрата отмывочного раствора, добавить дистиллированную воду до метки и тщательно перемешать. Приготовленного раствора достаточно для полного цикла отмывки 2 планшетов.

Приготовленный рабочий отмывочный раствор допускается хранить при комнатной температуре (+18-25 °C) не более 2 сут. или при температуре +2-8 °C не более 30 сут.



6.5. Приготовление конъюгата.

Развести концентрат конъюгата в 100 раз ЛИФА-Буфером (например, 100 мкл концентрата конъюгата смещать с 9,9 мл ЛИФА-Буфера).

Тщательно перемешать приготовленный раствор, избегая вспенивания.

Конъюгат необходимо использовать в течение 1 ч после приготовления.

Конъюгат длительному хранению не подлежит.

6.6. Подготовка планшета.

Вскрыть пакет с планшетом и установить на рамку необходимое количество стрипов.

Вскрытые стрипы следует использовать в течение 1 ч, длительному хранению не подлежат. Оставшиеся неиспользованными стрипы допускается хранить в тщательно закрытом полиэтиленовом пакете при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ не более 30 сут.

6.7. Подготовка калибровочных и контрольных проб.

Вскрыть пакеты и извлечь пробы из упаковки.

Калибровочные и контрольные пробы после вскрытия упаковки допускается хранить в тщательно закрытом полиэтиленовом пакете при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ не более 30 сут.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Калибровочные и контрольные пробы и исследуемые образцы внести с помощью палочек в лунки планшета по 1 диску в лунку, в соответствии со схемой:

	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	КСП1	КСП1	КСП2	КСП2	КСП3	КСП3	ИП1	ИП1	ИП2	ИП2	и т.д.	и т.д.

КПА-КПФ - лунки для калибровочных проб, КСП - лунки для контрольных проб, ИП - лунки для исследуемых проб

7.2. Внести во все лунки планшета по 200 мкл раствора конъюгата. Первый объем конъюгата следует отбросить. При внесении раствора конъюгата нельзя касаться наконечником пипетки края лунок и поверхности жидкости. Внесение конъюгата в лунки планшета необходимо произвести в течение 5-10 мин.

7.3. Инкубировать содержимое планшета при помощи планшет-шейкера при 1200 об/мин. в течение 10 мин. при комнатной температуре ($+18-25^{\circ}\text{C}$). Накрыть планшет крышкой и инкубировать при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ в течение 18 часов.

7.4. Сразу же после инкубации удалить раствор с бумажными дисками, не позволяя планшету долго находиться при комнатной температуре.

7.5. Провести 6-кратное промывание стрипов рабочим отмывочным раствором с помощью промывающего устройства в соответствии с программой, прилагаемой к промывающему устройству.

При промывании стрипов все лунки должны заполняться отмывочным раствором полностью. В конце каждого промывания отмывочный раствор должен полностью удаляться из лунок. Оставшуюся в лунках планшета жидкость удалить, постукивая перевернутым планшетом о ровную поверхность, покрытую чистой фильтровальной бумагой.

7.6. Внести во все лунки планшета по 200 мкл усиливающего раствора.

Внесение усиливающего раствора в лунки планшета должно производиться только с помощью специального устройства для внесения усиливающего раствора. Перед внесением усиливающего раствора необходимо отбросить 10-15 вносимых объемов. При внесении усиливающего раствора не допускается касаться наконечником дозатора краев лунок или их содержимого.

Инкубировать планшет в течение 10 минут при встряхивании в режиме «медленно» (700 об/мин) в течение 5 мин. при комнатной температуре (+18-25 °C).

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. Измерить интенсивность флуоресценции содержимого лунок планшета на флуориметре с временным разрешением при длине волны 615 нм.

Измерение интенсивности флуоресценции необходимо произвести в течение 60 мин. после внесения усиливающего раствора.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

9.1. Построение калибровочного графика возможно с применением программных средств флуориметра. Калибровочный график зависимости уровня флуоресценции калибровочных проб от концентрации ИРТ строится в логарифмических координатах с использованием точных значений концентраций, указанных в аналитическом паспорте.

9.2. Определить по калибровочному графику содержание ИРТ в исследуемых образцах.

9.3. Правильность проведения анализа проверяют по результатам определения концентрации ИРТ в контрольных пробах. Если полученные значения находятся в пределах, указанных в аналитическом паспорте, то результат анализа считать правильным.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1. Набор должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре +2-8 °C в течение всего срока годности (12 мес.). Допускается хранение (транспортирование) Наборов при температуре до +25 °C не более 3 суток.

10.2. Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 390 неизвестных образцов, 60 калибровочных и 30 контрольных проб (всего 960 определений).

10.3. В случае дробного использования Набора компоненты следует хранить следующим образом:

- вскрытые стрипы следует использовать в течение 1 ч, длительному хранению не подлежат;
- оставшиеся неиспользованными стрипы допускается хранить в оригинальной упаковке производителя Набора при температуре +2-8 °C в течение всего срока годности Набора;
- конъюгат, ЛИФА-Буфер и усиливающий раствор после вскрытия пробирок (флаконов) допускается хранить при температуре +2-8 °C в течение всего срока годности Набора;
- калибровочные и контрольные пробы после вскрытия упаковки допускается хранить в

