

"УТВЕРЖДАЮ"

Генеральный директор

ЗАО "ЭКОлаб"



В.Ю.Борисов

2020 г.

ИНСТРУКЦИЯ
по применению набора реагентов
«Тест-система иммуноферментная
для количественного определения
альфа-фетопротеина в сыворотке крови человека»
"ИФА-АФП"

Регистрационное удостоверение №РЗН 2017/5430 от 27.02.2017г.

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «Тест-система иммуноферментная для количественного определения альфа-фетопротеина в сыворотке крови человека» "ИФА-АФП" предназначен для количественного определения альфа-фетопротеина (АФП) в сыворотке крови человека с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) на твердофазном носителе.

Для однократного применения набора по назначению.

Для клинической лабораторной диагностики in vitro.

Показания и противопоказания к применению изделия

Изделие предназначено для обследования при подозрении на онкологические заболевания, (анализ показан при подозрении на первичную гепатоцеллюлярную карциному, тератобластому яичка, распространение метастазов опухолей других органов в печень) и последующего мониторинга лечения.

Противопоказаний не существует.

Потенциальные потребители изделия

Лабораторные подразделения лечебно-профилактических учреждений.

Профессиональный уровень потенциальных пользователей

Врач клинической лабораторной диагностики, медицинский лабораторный техник.

Описание целевого анализа, сведения о его научной обоснованности.

Альфа-фетопротеин (АФП) представляет собой эмбриональный гликопротеин, с молекулярной массой от 68 до 73 КДа. Этот белок в больших количествах продуцируется клетками желточного мешка, печени и желудочно-кишечного тракта во время эмбрионального периода развития организма. После рождения уровень АФП в крови быстро снижается, и к 8-12 месяцам достигает низких показателей, характерных для взрослых людей. Основная функция АФП в эмбриональных клетках заключается в связывании гормона эстрадиола.

Количественное определение уровня альфа-фетопротеина входит в состав «Тройного теста», проводящегося для женщин на 16-18 неделе беременности, и предназначенного для раннего скрининга пороков развития плода. Повышенный уровень АФП ассоциируется с нарушениями развития нервной трубки и такими патологиями, как анэнцефалия и расщепление позвоночника. Пониженный уровень АФП может свидетельствовать о наличии у плода синдрома Эдвардса или синдрома Дауна.

Альфа-фетопротеин также известен, как «золотой стандарт» опухолеспецифичных молекулярных биомаркеров. Значительное повышение уровня этого белка в крови взрослого человека может быть обусловлено различными злокачественными образованиями, среди которых особое положение занимают гепатоцеллюлярная карцинома (ГЦК) и герминогенные опухоли.

СОСТАВ И КОМПЛЕКТАЦИЯ НАБОРА

Иммуносорбент	моноклональные антитела к АФП, сорбированные в лунках стрипов 96-луночного разборного полистиролового планшета для иммунологических реакций с плоским дном.	12 стрипов
<i>допускается раздельная упаковка стрипов (по 1-4 стрипа в пакете)</i>		
Калибровочные пробы (КП₁₋₆)	буферные растворы ¹ , содержащие известную концентрацию АФП (ориентировочные значения концентрации АФП в КП1 – 0 нг/мл, в КП2 – 5 нг/мл; в КП3 – 20 нг/мл; в КП4 – 50 нг/мл; в КП5 – 150 нг/мл; в КП6 – 300 нг/мл; точные значения концентраций указываются на этикетках флаконов для каждой серии набора); прозрачная жидкость красного цвета.	КП ₁ – 1,0 мл в 1 фл. КП ₂ – 0,4 мл в 1 фл. КП ₃ – 0,4 мл в 1 фл. КП ₄ – 0,4 мл в 1 фл. КП ₅ – 0,4 мл в 1 фл. КП ₆ – 0,4 мл в 1 фл.
Контрольный положительный образец (К+)	сыворотка крови человека ¹ , содержащая АФП в известном диапазоне концентраций (указывается на этикетке флакона для каждой серии набора); прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость красного цвета.	0,4 мл в 1 фл.
Конъюгат	мышинные моноклональные антитела к АФП, меченные пероксидазой хрена; суспензия синего цвета, возможно наличие белого или светло-желтого осадка.	15 мл в 1 фл.
Концентрат 40-кратный отмывающего раствора [ОР-(x40)]	прозрачная или слегка опалесцирующая бесцветная пенящаяся жидкость, возможно выпадение осадка солей белого цвета, растворяющегося при температуре 37 °С в течение 30 мин	25 мл в 1 фл.
Раствор индикаторный (РИ)	субстратный раствор, содержащий тетраметилбензидин (ТМБ) и перекись водорода; прозрачная бесцветная жидкость.	15 мл в 1 фл.
Стоп-реагент	Прозрачная бесцветная жидкость.	15 мл в 1 фл.
Одноразовыми наконечниками для автоматических пипеток		16 шт.

Примечания.

1. Набор включает все реагенты, необходимые для постановки ИФА, кроме очищенной (дистиллированной или деионизированной) воды.
2. Допускается использование неспецифических реагентов из разных серий.
3. В составе изделия отсутствуют материалы, вступающие в непосредственный или опосредованный контакт с организмом пациента и персонала, использующего изделие, при выполнении требований эксплуатационной документации (инструкции по применению).
4. В составе изделия отсутствуют лекарственные средства и фармацевтические субстанции.

Набор укомплектован принадлежностями:

- вспомогательными пластиковыми емкостями - (4 шт.),
- клейкой пленкой для планшетов - (4 шт.)

Компоненты набора упакованы в коробку, в коробку вложена инструкция по применению и бланк калибровочного графика.

ОСНОВНЫЕ ПОТРЕБИТЕЛЬСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Базовый вариант комплектации позволяет одномоментное дублированное исследование 48 образцов, включая калибровочные и контрольные (на каждый образец используется 2 лунки, при этом на калибровочные и контрольные образцы используется 14 лунок). Предусмотрена возможность проведения раздельных исследований с использованием необходимого количества стрипов:

¹ аттестованны относительно значений Первого международного стандарта ВОЗ 72/225 (NIBSC code: AFP)

Число стрипов	2	4	6	8	10	12
Число иссл. обр.	1	2-9	10-17	18-25	26-33	34-41

Функциональное назначение

Диагностика онкологических заболеваний.

Применение изделия не имеет популяционных и демографических аспектов.

Методы стерилизации изделия

Изделие не требует стерилизации.

Программное обеспечение работы изделия

Отсутствует.

Техническое обслуживание и ремонт изделия

Изделие не требует технического обслуживания и не подлежит ремонту.

ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

Используется «сэндвич» вариант ИФА с двумя видами моноклональных антител, полученных к разным эпитопам альфа-фетопротейна. Моноклональные антитела к одному из эпитопов антигена нанесены на поверхность лунок иммуносорбента, антитела к другому эпитопу связаны с ферментом (пероксидазой) и входят в состав конъюгата. При внесении в лунки иммуносорбента исследуемого образца сыворотки и конъюгата происходит образование комплекса /антитело иммуносорбента/-АФП/-антитело конъюгата/. Наличие этого комплекса выявляется по цветной реакции с ТМБ. Интенсивность окрашивания реакционной смеси пропорциональна концентрации АФП в образце.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Чувствительность (минимальная определяемая концентрация АФП) – не более 1,0 нг/мл.

Коэффициент вариации составляет менее 8 %.

Процент открытия составляет 90-110%.

Зависимость ОП от концентрации АФП сохраняет линейный характер в диапазоне от 5 нг/мл до 300 нг/мл; отклонение от линейности в указанном диапазоне составляет менее 10%.

Интерсепт, 20%: 31,00-43,00

50%: 90,00-120,00

80%: 180,00-227,00

"Hook-эффект" (обратно пропорциональная зависимость ОП от концентрации аналита, возникающая при высоких его концентрациях) не наблюдается до концентрации АФП 5 мкг/мл.

Коэффициент корреляции : 0,998250514.

Коэффициент регрессии : 1,011.

Воспроизводимость результатов: 100%.

ИССЛЕДУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Сыворотка крови человека, объемом не менее 20 мкл.

Образцы до исследования можно хранить не более 3 сут при температуре от 2 до 8°C и 3 мес при температуре минус 20°C или более низкой. Допускается только однократное замораживание-размораживание образцов. Размороженные образцы перед исследованием тщательно перемешать. Не допускается использование для исследования образцов с повышенным содержанием липидов или с признаками гемолиза, и с видимым микробным проростом.

Образцы, содержащие осадок, перед анализом центрифугировать в течение 10-15 мин при 2500-3000 об/мин.

Сбор биологического материала должен производиться в соответствии с ГОСТ Р 53079.4-2008 «Обеспечение качества клинических лабораторных исследований».

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Набор биологически безопасен, однако с исследуемыми образцами необходимо обращаться как с потенциально инфицированным материалом.

Потенциальный риск применения набора – класс 2б (Приказ №4н от 06.06.12.).

Контрольный положительный образец (К+) содержит проклин в концентрации 1%, данная концентрация является безопасной.

Стоп-реагент при попадании на незащищенную кожу и слизистые может вызывать химические ожоги. В случае попадания на кожу – немедленно промойте пораженный участок водой.

Утилизацию или уничтожение, дезинфекцию наборов реагентов следует проводить в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 "Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами" и МУ 287-113 "Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения".

Набор реагентов, в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» относится к классу А - отходы, не имеющие контакта с биологическими жидкостями пациентов, инфекционными больными. Класс А – эпидемиологически безопасные отходы, приближенные по составу к твердым бытовым отходам (ТБО).

СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ

Достоверность результатов анализа зависит от строгого соблюдения следующих правил:

- Не используйте набор с истекшим сроком годности.
- Не проводите ИФА в присутствии паров кислот, щелочей, альдегидов или пыли, которые могут менять ферментативную активность конъюгата.
- Стеклянную посуду тщательно мойте и ополаскивайте водой очищенной или используйте одноразовую посуду.
- Аккуратно разводите реагенты, избегая любого загрязнения.
- Ферментативная реакция очень чувствительна к присутствию ионов металла. Поэтому не допускайте контактов каких-либо металлических предметов с конъюгатом и растворами субстратов.
- Используйте для внесения каждой пробы сменный одноразовый наконечник.
- Никогда не используйте одну и ту же емкость, для приготовления конъюгата и раствора ТМБ.
- Проверяйте пипетки и другое оборудование на точность и правильность работы.

Оборудование и материалы

Дозаторы пипеточные (пипетки полуавтоматические одно- и многоканальные переменного объема) для внесения реагентов в лунки планшета с погрешностью дозирования не более 5 % с наконечниками полипропиленовыми одноразовыми.

Ручные, или автоматические промыватели, или восьми- и двенадцатиканальные пипеточные дозаторы для промывания лунок планшета.

Цилиндр мерный вместимостью 1000 мл.

Спектрофотометр вертикального сканирования для измерения оптической плотности в лунках планшета при 450 нм и/или в двухволновом режиме при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620-650 нм.

Центрифуга лабораторная на 2,5-3,0 тыс. об/мин, термостат на 37 °С, холодильник бытовой, фильтровальная бумага.

Анализатор иммуноферментный автоматический.

Вода очищенная (дистиллированная или деионизированная).

70 %-ный раствор спирта этилового и 6 %-ный раствор перекиси водорода или растворы иных дезинфектантов, разрешенных к применению СП 1.32322-08, кроме хлорсодержащих.

Приготовление рабочего отмывающего раствора

При выпадении осадка солей в [ОР-(x40)] прогреть его при температуре 37°C до полного растворения осадка.

Конъюгат перед использованием тщательно перемешать в течение 2-3 мин.

При постановке на полном планшете с использованием ИФА-анализаторов 25мл [ОР-(x40)] довести водой очищенной до 1 л.

При дробной "ручной" постановке использовать соотношения объемов [ОР-(x40)] и воды, указанные в табл. 1 для разного числа используемых стрипов.

Таблица 1.

Число стрипов	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
[ОР-(x40)] , мл	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	25
Вода очищенная,	до 160	до 240	до 320	до 400	до 480	до 560	до 640	до 720	до 800	до 880	до 1000

Готовый рабочий отмывающий раствор хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 30 суток, при комнатной температуре - не более 15 суток.

Примечание: Все реагенты, кроме отмывающего раствора, готовы к применению.

Проведение анализа ("ручная" постановка)

Перед работой извлечь набор из холодильника, вскрыть упаковку и выдержать все реагенты перед проведением анализа не менее 30 мин при температуре от 18 до 25°C (пакет с иммуносорбентом выдерживать при указанной температуре **до вскрытия!**). Жидкие реагенты тщательно перемешать. Извлечь из пакета планшет, вскрыв выше замка «zip-lock», и установить на рамку необходимое для проведения ИФА количество стрипов. Неиспользованные стрипы немедленно поместить обратно в пакет с влагопоглотителем, удалить из него воздух, плотно закрыть «zip-lock» и поместить в холодильник.

Отобранные стрипы вставить в рамку-держатель.

Исследуемые образцы, в которых ранее была определена концентрация АФП более 300 нг/мл, предварительно развести в КП1 (концентрация АФП должна попадать в диапазон от 5 нг/мл до 300 нг/мл)

Внимание! Соблюдение указанных ниже температуры и времени инкубации планшетов на каждой стадии постановки крайне важно для получения достоверных результатов.

Таблица 2. Рекомендуемая схема внесения образцов при использовании 12 стрипов

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	КП1	КП1	ИО2	ИО2	ИО10	ИО10	ИО18	ИО18	ИО26	ИО26	ИО34	ИО34
B	КП2	КП2	ИО3	ИО3	ИО11	ИО11	ИО19	ИО19	ИО27	ИО27	ИО35	ИО35
C	КП3	КП3	ИО4	ИО4	ИО12	ИО12	ИО20	ИО20	ИО28	ИО28	ИО36	ИО36
D	КП4	КП4	ИО5	ИО5	ИО13	ИО13	ИО21	ИО21	ИО29	ИО29	ИО37	ИО37
E	КП5	КП5	ИО6	ИО6	ИО14	ИО14	ИО22	ИО22	ИО30	ИО30	ИО38	ИО38
F	КП6	КП6	ИО7	ИО7	ИО15	ИО15	ИО23	ИО23	ИО31	ИО31	ИО39	ИО39
G	К+	К+	ИО8	ИО8	ИО16	ИО16	ИО24	ИО24	ИО32	ИО32	ИО40	ИО40
H	ИО1	ИО1	ИО9	ИО9	ИО17	ИО17	ИО25	ИО25	ИО33	ИО33	ИО41	ИО41

1. Внести в лунки планшета (как можно ближе ко дну каждой лунки) по 10 мкл контрольных проб и исследуемых образцов в соответствии со схемой их внесения.

2. Добавить в каждую лунку по 100 мкл конъюгата.

Внимание! Максимальная воспроизводимость результатов обеспечивается соблюдением одного и того же порядка внесения реагентов. Общее время внесения образцов и конъюгата не должно превышать 15 мин. В противном случае калибраторы следует вносить в отведенные для них лунки после пипетирования первой половины проб. Если для анализа используется больше одного планшета, калибровку следует выполнять для каждого планшета.

3. Инкубировать планшет при температуре от 18 до 25°C в течение 60 мин.

4. По окончании инкубации удалить содержимое лунок в контейнер для сбора жидких отходов и промыть лунки 5 раз отмывающим буферным раствором, заполняя лунки до краев и выдерживая их с водой каждый раз по 30 с. По окончании промывки остатки раствора удалить из лунок, постукивая перевернутым планшетом по сложенной в несколько слоев фильтровальной бумаге.

5. Внести во все лунки по 100 мкл РИ и выдержать стрипы 15 мин в защищенном от света месте при температуре от 18 до 25°C.

6. Добавить по 100 мкл стоп-реагента в каждую лунку, соблюдая последовательность и скорость внесения в них РИ и не более чем через 15 мин приступить к учету результатов.

Регистрация и учет результатов

Результаты ИФА регистрировать спектрофотометрически, измеряя оптическую плотность (ОП) при двух длинах волн – 450 нм и 620-650 нм. При отсутствии референс-фильтра на 620-650 нм оптическую плотность измерять при длине волны 450 нм, а выведение спектрофотометра на нулевой уровень ("бланк") осуществлять по воздуху.

Результаты ИФА учитывать при следующих условиях:

ОП_{450нм} КП6 – более 0,500

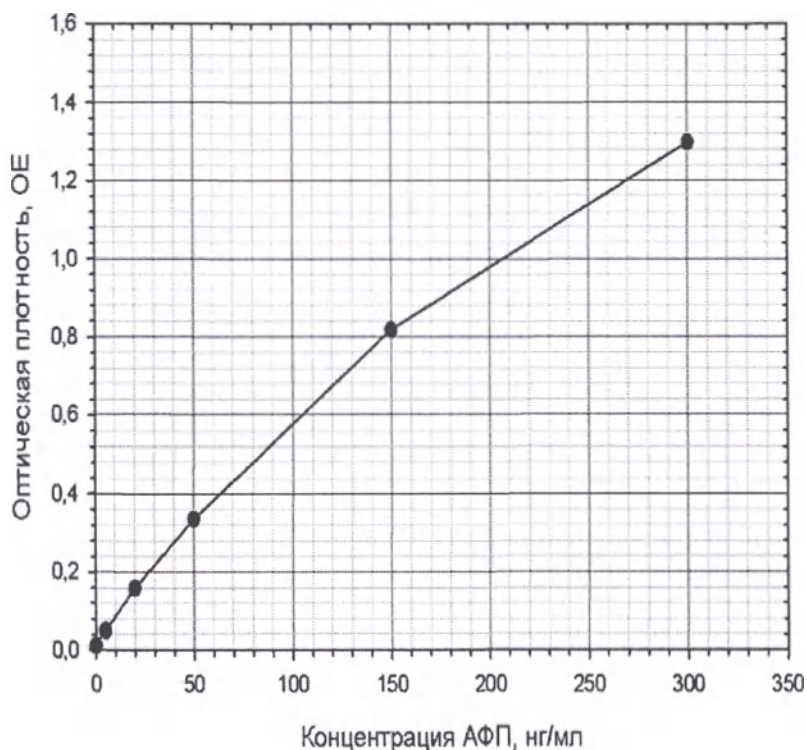
ОП_{450нм} КП1 – менее 0,100.

В противном случае исследование необходимо повторить.

Построить калибровочную кривую по точкам, ординатами которых являются полученные в ИФА значения ОП КП, а абсциссами – концентрации АФП в этих пробах, указанные на этикетках флаконов, и определить по данной кривой концентрации АФП в К⁺ и исследованных образцах (для разведенных образцов полученную по графику концентрацию АФП необходимо умножить на степень разведения образца). При использовании для расчетов концентраций компьютерного или встроенного в спектрофотометр программного обеспечения в настройках выбрать подходящий метод аппроксимации (кусочно-линейная интерполяция, нелинейные четырехфакторные регрессионные модели).

Полученные значения концентраций АФП в исследуемых образцах учитывать только при условии попадания полученного значения концентрации АФП в К⁺ в диапазон, концентраций, указанный на этикетке флакона.

Пример калибровочного графика



Интерпретация результатов

Содержание АФП в сыворотке крови здорового взрослого человека не превышает 12 нг/мл.

При нормальном течении беременности концентрация альфа-фетопротеина в сыворотке крови матери изменяется следующим образом:

Срок беременности, недели:	Медиана концентрации, нг/мл:	Толерантные пределы, нг/мл:
15	35	17-70
16	40	19-80
17	46	23-92
18	52	25-105
19	58	29-116
20	64	33-128

Примечание. Указанные выше значения нормальных концентраций АФП приводятся в ознакомительных целях! Каждой лаборатории следует самостоятельно определить диапазон нормальных концентраций АФП с учетом используемого оборудования, способа взятия крови и методики анализа.

ПОСТАНОВКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИФА-АНАЛИЗАТОРОВ

Подготовить прибор в соответствии с инструкцией по его эксплуатации, ввести программу анализа, соответствующую используемому набору, и провести анализ.

СРОК ГОДНОСТИ

Срок годности набора – 18 месяцев. Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит.

ХРАНЕНИЕ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ

Замораживание не допускается.

Хранение

Хранение наборов должно осуществляться в холодильных камерах или холодильниках, обеспечивающих регламентируемый температурный режим, в упаковке предприятия-изготовителя при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности.

После вскрытия упаковок неиспользованные реагенты допускается хранить в плотно закрытых упаковках в холодильных камерах или холодильниках, обеспечивающих регламентируемый температурный режим, при температуре от 2 до 8 °С до 3 мес.

Транспортирование

Транспортирование наборов – при температуре от 2 до 8°С транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида. Допускается транспортирование при температуре от 9 до 25°С в течение 15 суток.

УСЛОВИЯ ОТПУСКА

Для учреждений здравоохранения.

ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

Набор реагентов «Тест-система иммуноферментная для количественного определения альфа-фетопротеина в сыворотке крови человека» "ИФА-АФП" соответствует ТУ 9398-218-70423725-2016 с изм. № 1, № 2, № 3, национальным стандартам РФ и нормативным документам в части требований безопасности и эффективности (см. Сведения о нормативной документации).

По вопросам, касающимся качества и обращения набора реагентов «ИФА-АФП» следует обращаться по адресу: 142530 Московская обл., г. Электрогорск, ул. Буденного, д. 1-1а, Закрытое Акционерное Общество «ЭКОлаб» (ЗАО "ЭКОлаб"); тел. (49643) 3-23-11, факс (49643) 3-30-93 – отдел сбыта, (49643) 3-37-30 – ОБТК, ekolab-sekretar@mail.ru.

При предъявлении рекламации по поводу несоответствия физических и специфических характеристик набора реагентов заявленным для проведения объективного расследования производителем причин несоответствия потребитель должен предоставить:

1. набор реагентов той серии, на которую предъявляется рекламация;
2. все спорные исследуемые образцы пациентов;
3. протоколы анализа с указанием наименования, серии и сроков годности использованного набора реагентов.
4. протоколы исследования с использованием других методов/наборов реагентов с указанием серии, сроков годности, производителя примененных наборов реагентов.

Директор ЗАО "ЭКОлаб" по научной работе

С.Г. Марданлы

"СОГЛАСОВАНО"

Генеральный директор ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»

П.К. Варнавичус

«25» 12 2020 г.

КРАТКАЯ СХЕМА ПОСТАНОВКИ ИФА (ИФА-АФП)

Использовать только после тщательного ознакомления с инструкцией!

Внести	в соответствии со схемой постановки по 10 мкл КП1-6, K ⁺ , исследуемых образцов
Внести	по 100 мкл конъюгата в каждую лунку
Инкубация	60 мин, при температуре от 18 до 25°C
Промыть	5 раз отмывающим буферным раствором
Внести	по 100 мкл РИ в каждую лунку
Инкубация	15 мин, 18-25°C в защищенном от света месте
Внести	по 100 мкл стоп-реагента в каждую лунку
Измерить	ОП при 450 нм (референс 620-650 нм), «бланк» - по воздуху

ПРОШИТО
В КОЛИЧЕСТВЕ 8 ЛИСТОВ

«25» 12 2020 год

Ген. Директор
ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»
Варнавичус И.К.



Пронумеровано, пронумеровано
и скреплено печатью

81 Восьмидесяти 06 лист

Ген. Директор ЗАО «ЭКОлаб»
Борисов В.Ю.
«25» 12 2020 г.



ПОРЯДОК ПРИГОТОВЛЕНИЯ КАЛИБРОВОЧНЫХ ПРОБ ДЛЯ НАБОРА РЕАГЕНТОВ «ИФА-АФП»

Стр. 1 из 6

Дата введения: 11.01.16

СОП-ПО-15-05

Копия №

Версия № 1, вводится впервые

Действительно до: 11.01.26

1. Назначение.

Настоящая инструкция описывает порядок приготовления калибровочных проб для набора реагентов «ИФА-АФП» и предназначена для микробиолога и лаборантов НПО «Гормоны. Онкомаркеры»

2. Персонал.

Исполнители: лаборанты НПО «Гормоны. Онкомаркеры», микробиологи НПО «Гормоны. Онкомаркеры»

Ответственный: начальник НПО «Гормоны. Онкомаркеры»

3. Оборудование и инвентарь.

№ позиции	Наименование оборудования*	Число единиц	Материал	Технические характеристики
1	Холодильник бытовой «Атлант», Беларусь	1		
2	Электронные аналитические весы Ohaus Adventurer AR2140, Канада	1		Класс точности ДСТУ – I, дискретность взвешивания 0,0001
3	Вошер автоматический Bio Rad PW40, США	1		
4	Многоканальный спектрофотометр Tecan Sunrise, Швейцария	1		Стандартные фильтры 450 нм и 620 нм
5	Магнитная мешалка MR-3000, Германия	1		
*Допускается использования аналогов оборудования при соответствии технических характеристик.				

4. Сырье и материалы.

№ позиции	Наименование*	НД/Фирма-производитель	Квалификация, каталожный №
Основное сырье			

Составил (изменил)	Согласовали	Утвердил
Долж.: Микробиолог ОПР	Долж.: Начальник ОПР	Долж.: Генеральный директор
ФИО: Пронина А.С.	ФИО: Амелина Е.А.	ФИО: Борисов В.Ю.
Подпись: <i>Пронина А.С.</i>	Подпись: <i>Амелина Е.А.</i>	Подпись: <i>Борисов В.Ю.</i>
Дата: 11.01.16	Дата: 11.01.16	Дата: 11.01.16
	Долж.: Начальник ООК	
	ФИО: Овинникова С.С.	
	Подпись: <i>Овинникова С.С.</i>	
	Дата: 11.01.16	
	Дата: <i>Сору</i>	

ПОРЯДОК ПРИГОТОВЛЕНИЯ КАЛИБРОВОЧНЫХ ПРОБ ДЛЯ НАБОРА РЕАГЕНТОВ «ИФА-АФП»		Стр. 2 из 9
Дата введения:	СОП-ПО-15-05	Копия №
Версия № 1, вводится впервые	Действительно до:	

1	Очищенный человеческий альфа-фетопроtein	MyBioSource, США	MBS230298
2	Раствор для разведения образцов для набора реагентов «ИФА-АФП»	СОП-ПО-15-07	
3	Сухое молоко обезжиренное	PanReac AppliChem, Германия	A-0830,0500
Вспомогательные материалы			
4	Международный стандарт WHO AFP	NIBSC, Великобритания	AFP
5	Микропробирки объемом 1 мл	Sarstedt, Германия	
6	Мерные стаканы объемом 20 мл и 50 мл	Химлаборприбор, Россия	
7	Флаконы пластиковые объемом 1 мл	Химлаборприбор, Россия	
8	Пипетки автоматические объемом от 1 мкл до 5 мл	Ленпипет, Россия	
9	Спирт этиловый 70%-ный	ФС-42-3071-00	
10	Вата медицинская	ГОСТ 5556-81	
11	Марля медицинская	ГОСТ 9412-77	
12	Этикетки самоклеящиеся	Lomond, Россия	
13	Пленка Parafilm M®	Диа М, Россия	PM996
*Допускается использование стеклянной посуды и флаконов другого объема, а также реагентов и вспомогательных материалов от других фирм- производителей.			

5. Процедура.

5.1. Подготовка рабочего места.

- 5.1.1. Лаборанту НПО «Гормоны. Онкомаркеры» получить у микробиолога сменное задание.
- 5.1.2. Убедится в наличии средств по технике безопасности и средств первой медицинской помощи.
- 5.1.3. Получить у кладовщика реактивы, необходимые для приготовления калибровочных проб.
- 5.1.4. Подготовить оборудование в соответствии с инструкцией по эксплуатации.
- 5.1.5. Подготовить лабораторную посуду и посуду для розлива в соответствии с инструкциями по подготовке лабораторной посуды и посуды для розлива.
- 5.1.6. Визуально проверить на целостность стеклянную посуду.

Составил (изменил)	Согласовали	Утвердил
Пронина А.С.		

ПОРЯДОК ПРИГОТОВЛЕНИЯ КАЛИБРОВОЧНЫХ ПРОБ ДЛЯ НАБОРА РЕАГЕНТОВ «ИФА-АФП»		Стр. 3 из 9
Дата введения:	СОП-ПО-15-05	Копия №
Версия № 1, вводится впервые	Действительно до:	

- 5.1.7. Проверить наличие дезинфицирующего раствора, при отсутствии – приготовить дезинфицирующий раствор согласно СОП-ВП-12-02.
- 5.1.8. Проверить наличие разведенного концентрата альфа-фетопротейна, при отсутствии – приготовить концентрат альфа-фетопротейна (пункт 5.6).
- 5.1.9. О замеченных недостатках сообщить микробиологу и принять меры для их устранения.

5.2. Ход технологического процесса.

- 5.2.1. Подготовить 5 мерных стаканов объемом 20 мл. На каждый наклеить этикетку с указанием даты, номера серии, номера калибровочной пробы и концентрации альфа-фетопротейна в калибровочной пробе: КП2 - 5 нг/мл, КП3 - 20 нг/мл, КП4 - 50 нг/мл, КП5 - 150 нг/мл, КП6 - 300 нг/мл.
- 5.2.2. В каждый из мерных стаканов объемом 20 мл в зависимости от концентрации альфа-фетопротейна в калибровочной пробе добавить концентрат альфа-фетопротейна, сухое молоко и раствор для разведения образцов:

Номер пробы	Получаемая концентрация альфа-фетопротейна в калибровочной пробе	Объем концентрата альфа-фетопротейна*	Масса сухого молока**	Объем раствора для разведения образцов
КП2	5 нг/мл	75 мкл	0,015 г	14,925 мл
КП3	20 нг/мл	300 мкл	0,015 г	14,700 мл
КП4	50 нг/мл	750 мкл	0,015 г	14,250 мл
КП5	150 нг/мл	2,250 мл	0,015 г	12,750 мл
КП6	300 нг/мл	4,500 мл	0,015 г	10,500 мл

*Данные приведены в расчете на приготовление 15 мл калибровочных проб для 30 наборов «ИФА-АФП». В случае, если необходимо приготовить другой объем калибровочных проб, необходимо сделать перерасчет объемов и масс компонентов калибровочных проб, исходя из требуемого объема и концентрации.

**Получаемая концентрация сухого молока в калибровочных пробах – 0,1%.

- 5.2.3. Каждый из полученных растворов поместить на магнитную мешалку и перемешать до полного растворения компонентов. Закрыть мерные стаканы пленкой Parafilm M®.
- 5.2.4. Подготовить мерный стакан объемом 50 мл. Наклеить на него этикетку с указанием даты, номера калибровочной пробы и концентрации альфа-фетопротейна в калибровочной пробе: КП1 - 0 нг/мл.
- 5.2.5. В мерный стакан объемом 50 мл с номером КП1 добавить 0,035 г сухого молока и 35 мл раствора для разведения образцов.
- 5.2.6. Полученный раствор поместить на магнитную мешалку и перемешать до полного растворения компонентов. Закрыть мерный стакан пленкой Parafilm M®.
- 5.2.7. Данные о всех внесенных в растворы количествах компонентов занести в маршрутную карту.
- 5.2.8. Подготовить 6 микропробирок объемом 1 мл. Наклеить на каждую этикетку с указанием даты, номера калибровочной пробы: КП1, КП2, КП3, КП4, КП5, КП6, и концентрации альфа-фетопротейна в калибровочной пробе.

Составил (изменил)	Согласовали	Утвердил
Пронина А.С.		

ПОРЯДОК ПРИГОТОВЛЕНИЯ КАЛИБРОВОЧНЫХ ПРОБ ДЛЯ НАБОРА РЕАГЕНТОВ «ИФА-АФП»		Стр. 4 из 9
Дата введения:	СОП-ПО-15-05	Копия
Версия № 1, вводится впервые	Действительно до:	№

- 5.2.9. В каждую из 6 микропробирок отобрать по 100 мкл калибровочной пробы соответствующего номера и передать для контроля микробиологу.
- 5.2.10. Получить у микробиолога разрешение на розлив.
- 5.2.11. В исключительных случаях калибровочные пробы допускается разливать до получения разрешения от микробиолога. В этом случае разлитые во флаконы калибровочные пробы следует хранить в маркированном контейнере в холодильнике до получения разрешения. На контейнер необходимо наклеить этикетку «КАРАНТИН». В маршрутной карте в графе «отметка о хранении» наклеить этикетку «КАРАНТИН».

5.3. Контроль методом ИФА.

- 5.3.1. Контроль калибровочных проб проводить путем их сравнения с международным стандартом альфа-фетопротейна ВОЗ в соответствии с инструкцией по применению набора реагентов «ИФА-АФП».
- 5.3.2. В качестве источника данных для построения калибровочной кривой при проведении контроля методом ИФА использовать международный стандарт альфа-фетопротейна ВОЗ, разведенный до концентраций 0 нг/мл, 5 нг/мл, 20 нг/мл, 50 нг/мл, 150 нг/мл, 300 нг/мл.
- 5.3.3. При нанесении международного стандарта альфа-фетопротейна ВОЗ и калибровочных проб на иммуносорбент пользоваться приведенной ниже схемой. В лунки А1 – F2 вносится международный стандарт альфа-фетопротейна ВОЗ; в лунки А3 – F4 вносятся образцы контролируемых калибровочных проб.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0 нг/мл	0 нг/мл	КП1	КП1								
B	5 нг/мл	5 нг/мл	КП2	КП2								
C	20 нг/мл	20 нг/мл	КП3	КП3								
D	50 нг/мл	50 нг/мл	КП4	КП4								
E	150 нг/мл	150 нг/мл	КП5	КП5								
F	300 нг/мл	300 нг/мл	КП6	КП6								
G												
H												

- 5.3.4. После проведения контроля методом ИФА построить калибровочный график, отмечая по оси абсцисс концентрации стандарта ВОЗ, а по оси ординат – значения оптической плотности в лунках А1-F2. Для получения функциональной зависимости концентрации альфа-фетопротейна от оптической плотности использовать методы кусочно-линейной интерполяции или нелинейной регрессии.
- 5.3.5. С помощью калибровочного графика рассчитать концентрации альфа-фетопротейна, соответствующие пробам КП1-КП6. Коэффициент вариации рассчитанных значений относительно фактических (указанных на этикетках) не должен превышать 8%.
- 5.3.6. Результат контроля зафиксировать в маршрутной карте.
- 5.4. Розлив.

- 5.4.1. Передать калибровочные пробы на участок розлива с маршрутной картой, подписанной ответственным микробиологом

Составил (изменил)	Согласовали	Утвердил
Пронина А.С.		

ПОРЯДОК ПРИГОТОВЛЕНИЯ КАЛИБРОВОЧНЫХ ПРОБ ДЛЯ НАБОРА РЕАГЕНТОВ «ИФА-АФП»		Стр. 5 из 9
Дата введения:	СОП-ПО-15-05	Копия №
Версия № 1, вводится впервые	Действительно до:	

5.4.2. Розлив калибровочных проб производить с помощью пипеток объемом 50-1000 мкл в пластиковые флаконы объемом 1 мл. Доза розлива должна составлять: $1 \pm 0,020$ мл для КП1 и $0,400 \pm 0,020$ мл для КП2, КП3, КП4, КП5 и КП6. Для контроля погрешности дозировки розлива отбирать не менее 3 флаконов из серии: в начале, в середине, и в конце розлива

5.4.3. Занести данные в маршрутную карту. Хранить разлитые калибровочные пробы при температуре $2 \div 8^{\circ}\text{C}$ в течение 1 месяца.

5.5. Маркировка.

5.5.1. На каждый флакон необходимо наклеить этикетку в соответствии с комплектацией набора.

МЕСТО ДЛЯ
ОБРАЗЦА
ЭТИКЕТКИ

5.6. Приготовление концентрата альфа-фетопротейна.

5.6.1. Используя чистую сухую колбу, растворить содержимое ампулы с лиофилизированным альфа-фетопротейном в растворе для разведения образцов. Объем раствора для разведения образцов рассчитать, учитывая массу, указанную в паспорте на ампулу с лиофилизированным альфа-фетопротейном. Конечная концентрация альфа-фетопротейна должна составлять 1 мкг/мл.

5.6.2. Оставшееся количество концентрата разлить порционно в микропробирки и хранить при -20°C .

5.7. Заключительные работы.

5.7.1. Убрать рабочее место.

5.7.2. Убрать, сдать кладовщику все остатки реактивов и материалов.

5.7.3. Все рабочие поверхности и оборудование обработать дезинфицирующим раствором.

5.7.4. Используемую лабораторную посуду помыть и подготовить, согласно инструкции по подготовке лабораторной посуды.

5.7.5. Выключить приточно-вытяжную вентиляцию, освещение и электрические приборы.

5.7.6. Сообщить микробиологу (в его отсутствие – начальнику отделения) о выполнении сменного задания.

6. Документация.

6.1. Документирование процесса «Порядок приготовления калибровочных проб для набора реагентов «ИФА-АФП» следует осуществлять в маршрутной карте ЗФ01-ПО-15-05. Форма маршрутной карты представлена в Приложении №1.

6.2. Документирование процесса калибровки оборудования следует осуществлять в журнале калибровки оборудования.

6.3. Документирование подготовки производственного помещения следует осуществлять в графике уборки помещения.

7. Ответственность.

Составил (изменил)	Согласовали	Утвердил
Пронина А.С.		

ПОРЯДОК ПРИГОТОВЛЕНИЯ КАЛИБРОВОЧНЫХ ПРОБ ДЛЯ НАБОРА РЕАГЕНТОВ «ИФА-АФП»		Стр. 5 из 9
Дата введения:	СОП-ПО-15-05	Копия №
Версия № 1, вводится впервые	Действительно до:	

5.4.2. Розлив калибровочных проб производить с помощью пипеток объемом 50-1000 мкл в пластиковые флаконы объемом 1 мл. Доза розлива должна составлять: $1 \pm 0,020$ мл для КП1 и $0,400 \pm 0,020$ мл для КП2, КП3, КП4, КП5 и КП6. Для контроля погрешности дозировки розлива отбирать не менее 3 флаконов из серии: в начале, в середине, и в конце розлива

5.4.3. Занести данные в маршрутную карту. Хранить разлитые калибровочные пробы при температуре $2 \div 8^\circ \text{C}$ в течение 1 месяца.

5.5. Маркировка.

5.5.1. На каждый флакон необходимо наклеить этикетку в соответствии с комплектацией набора.

МЕСТО ДЛЯ
ОБРАЗЦА
ЭТИКЕТКИ

5.6. Приготовление концентрата альфа-фетопroteина.

5.6.1. Используя чистую сухую колбу, растворить содержимое ампулы с лиофилизированным альфа-фетопroteином в растворе для разведения образцов. Объем раствора для разведения образцов рассчитать, учитывая массу, указанную в паспорте на ампулу с лиофилизированным альфа-фетопroteином. Конечная концентрация альфа-фетопroteина должна составлять 1 мкг/мл.

5.6.2. Оставшееся количество концентрата разлить порционно в микропробирки и хранить при -20°C .

5.7. Заключительные работы.

5.7.1. Убрать рабочее место.

5.7.2. Убрать, сдать кладовщику все остатки реактивов и материалов.

5.7.3. Все рабочие поверхности и оборудование обработать дезинфицирующим раствором.

5.7.4. Используемую лабораторную посуду помыть и подготовить, согласно инструкции по подготовке лабораторной посуды.

5.7.5. Выключить приточно-вытяжную вентиляцию, освещение и электрические приборы.

5.7.6. Сообщить микробиологу (в его отсутствие – начальнику отделения) о выполнении сменного задания.

6. Документация.

6.1. Документирование процесса «Порядок приготовления калибровочных проб для набора реагентов «ИФА-АФП» следует осуществлять в маршрутной карте ЗФ01-ПО-15-05. Форма маршрутной карты представлена в Приложении №1.

6.2. Документирование процесса калибровки оборудования следует осуществлять в журнале калибровки оборудования.

6.3. Документирование подготовки производственного помещения следует осуществлять в графике уборки помещения.

7. Ответственность.

Составил (изменил)	Согласовали	Утвердил
Пронина А.С.		

ПОРЯДОК ПРИГОТОВЛЕНИЯ КАЛИБРОВОЧНЫХ ПРОБ ДЛЯ НАБОРА РЕАГЕНТОВ «ИФА-АФП»		Стр. 6 из 9
Дата введения:	СОП-ПО-15-05	Копия №
Версия № 1, вводится впервые	Действительно до:	

За несоблюдение требований данной инструкции персонал несет должностную ответственность в установленном порядке

8. Литература.

8.1. СОП-ВП-11-01 «Правила подготовки производственных помещений».

8.2. СОП-ВП-11-07 «Правила подготовки персонала для работы в производственных помещениях».

8.3. СОП-ТБ-11-09 «Инструкция по охране труда с опасными отходами производства».

8.4. СОП-ИО-12-21 «Эксплуатация весов лабораторных Adventurer».

8.5. СОП-ИО-11-23 «Порядок эксплуатации дозаторов пипеточных с переменным объемом «Ленпипет»».

8.6. СОП-АД-01-04 «Порядок составления и оформления инструкций».

9. Распределение инструкции.

Подразделение	Экземпляр	Число
ООК	Оригинал	1
НПО «Гормоны. Онкомаркеры»	Копия 1	1
ОПР	Копия 2	1

Составил (изменил)	Согласовали	Утвердил
Пронина А.С.		

ПОРЯДОК ПРИГОТОВЛЕНИЯ КАЛИБРОВОЧНЫХ ПРОБ ДЛЯ НАБОРА РЕАГЕНТОВ «ИФА-АФП»		Стр. 7 из 9
Дата введения:	СОП-ПО-15-05	Копия
Версия № 1, вводится впервые	Действительно до:	№

Приложение №1
ЗФ 01-ПО-15-05

ЗАО «ЭКОлаб»

**Маршрутная карта
калибровочных проб для набора реагентов «ИФА-АФП»**

1. Приготовление калибровочных проб КП2 – КП6.

Дата: Серия:

Наименование компонентов	Характеристика компонентов	Расчетное количество компонентов	Вносимое в раствор количество компонентов
Калибровочная проба КП2			
Альфа-фетопроtein			
Сухое молоко			
Раствор для разведения образцов			
Общий объем			
Калибровочная проба КП3			
Альфа-фетопроtein			
Сухое молоко			
Раствор для разведения образцов			
Общий объем			
Калибровочная проба КП4			
Альфа-фетопроtein			
Сухое молоко			
Раствор для разведения образцов			
Общий объем			
Калибровочная проба КП5			
Альфа-фетопроtein			
Сухое молоко			
Раствор для разведения образцов			
Общий объем			
Калибровочная проба КП6			
Альфа-фетопроtein			
Сухое молоко			
Раствор для разведения образцов			
Общий объем			
Составил (изменил)	Согласовали		Утвердил
Пронина А.С.			

ПОРЯДОК ПРИГОТОВЛЕНИЯ КАЛИБРОВОЧНЫХ ПРОБ ДЛЯ НАБОРА РЕАГЕНТОВ «ИФА-АФП»		Стр. 8 из 9
Дата введения:	СОП-ПО-15-05	Копия №
Версия № 1, вводится впервые	Действительно до:	

2. Приготовление калибровочной пробы КП1.

Наименование компонентов	Характеристика компонентов	Расчетное количество компонентов	Вносимое в раствор количество компонентов
Сухое молоко			
Раствор для разведения образцов			
Общий объем			

3. Контроль калибровочных проб в ИФА.

Дата:

Протокол №

Концентрация альфа-фетопротейна в калибровочной пробе КП1:

Концентрация альфа-фетопротейна в калибровочной пробе КП2:

Концентрация альфа-фетопротейна в калибровочной пробе КП3:

Концентрация альфа-фетопротейна в калибровочной пробе КП4:

Концентрация альфа-фетопротейна в калибровочной пробе КП5:

Концентрация альфа-фетопротейна в калибровочной пробе КП6:

Заключение:

пригодны	не пригодны
----------	----------------

Годеи до:

Ответственный микробиолог:

Подпись:

4. Розлив калибровочных проб.

Номер калибровочной пробы	№ серии	Объем, мл	Тип флакона	Доза, мл	Количество флаконов
КП1					
КП2					
КП3					
КП4					
КП5					
КП6					

Составил (изменил)	Согласовали	Утвердил
Пронина А.С.		

ПОРЯДОК ПРИГОТОВЛЕНИЯ КАЛИБРОВОЧНЫХ ПРОБ ДЛЯ НАБОРА РЕАГЕНТОВ «ИФА-АФП»		Стр. 9 из 9
Дата введения:	СОП-ПО-15-05	Копия
Версия № 1, вводится впервые	Действительно до:	№

Номер калибровочной пробы	Тип дозатора	Норма дозирования, мл	Доза		
			I	II	III
КП1		1±0,020 мл			
КП2		0,400±0,020 мл			
КП3		0,400±0,020 мл			
КП4		0,400±0,020 мл			
КП5		0,400±0,020 мл			
КП6		0,400±0,020 мл			

Ответственный:

Подпись:

5. Маркировка.

Дата:

Рабочее место подготовлено, этикетки предыдущих серий удалены.

Ответственный:

Подпись

Номер калибровочной пробы	№ серии	Количество флаконов до этикетирования	Количество полученных этикеток	Количество этикетированных флаконов	Количество уничтоженных этикеток
КП1					
КП2					
КП3					
КП4					
КП5					
КП6					

Хранение производится при температуре 2÷8° С:

ДА	НЕТ
----	-----

Ответственный:

Подпись:

Место для этикеток.

Маршрутная карта заполнена верно.

Ответственный:

Подпись:

Составил (изменил)	Согласовали	Утвердил
Пронина А.С.		

Пронумеровано, пронумеровано
и скреплено печатью

9966376 лист 06

Зам. Ген. директора ЗАО "ЭКОлаб"

Гашенко Т.Ю.

31 03 2021 г.

