

УТВЕРЖДЕНА

«УТВЕРЖДАЮ»

Приказом Росздравнадзора
от _____ 2011 г. № _____

Генеральный директор
ООО РИКО-мед

_____  Пискунов М.В.

« 17 » _____ 2011 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению Набора реагентов для количественного определения
фенилаланина в сухих пятнах крови флуоресцентным методом

"ФАВР (универсальный)"

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов ФАВР (универсальный) предназначен для количественного определения фенилаланина в высушенных пятнах крови человека флуоресцентным методом. Набор предназначен только для определения *in vitro*.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип действия.

Принцип действия основан на образовании флуоресцирующего комплекса фенилаланина с нингидрином в присутствии L-лейцил-L-аланина. Интенсивность флуоресценции комплекса пропорциональна количеству исходного фенилаланина. Интенсивность флуоресцентного сигнала измеряется на приборе для измерения флуоресцентного сигнала в лунках планшета при длине волны возбуждения в диапазоне 330-430 нм и длине волны испускания в диапазоне 440-620 нм.

2.2. Состав набора:

Набор состоит из двух комплектов, один из которых – комплект калибровочных и контрольных проб, другой комплект – реагенты для проведения химической реакции.

Комплект калибровочных и контрольных проб содержит:

- калибровочные пробы, содержащие известные количества фенилаланина - 0; 90,8; 151,3; 272,4; 635,6; 1240,9 мкмоль/л (концентрации фенилаланина в каждой партии калибровочных проб определяются количеством фенилаланина в исходной донорской крови и могут несколько отличаться от указанных величин, точные величины указаны на этикетках полосок); калибровочные пробы представляют собой высушенные пятна крови диаметром приблизительно 1 см на фильтровальной бумаге - 6 полосок по 3 или 4 пятна каждой концентрации (12 пакетов);

- контрольные пробы, представляющие собой высушенные пятна крови диаметром приблизительно 1 см на фильтровальной бумаге, с низким [в диапазоне 90,8 - 272,3 мкмоль/л (контрольная проба А)] и с высоким [в диапазоне 302,5 - 907,5 мкмоль/л (контрольная проба В)] содержанием фенилаланина - 2 полоски по 3 или 4 пятна каждой концентрации (4 пакета);

Комплект реагентов содержит:

- L-лейцил - L-аланин, порошок - 2 флакона;
- нингидрин, порошок - 2 флакона;
- буферный раствор, pH 5,8, 40 мл - 1 флакон;
- медный реагент, 200 мл - 1 флакон;
- воду бидистиллированную, 50 мл - 1 флакон.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ

ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

3.1. Область определения содержания фенилаланина в сухих пятнах крови человека находится в диапазоне 0 - 1240,9 мкмоль/л крови.

3.2. Воспроизводимость результатов.

Коэффициент вариации результатов определения фенилаланина в сухих пятнах крови человека, полученных с помощью набора ФАВР (универсальный), не превышает 15,0 %.

3.3. Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая набором концентрация фенилаланина в сухих пятнах крови человека не превышает 15 мкмоль/л крови.

3.4. Ожидаемые показатели. Общепринятое cut-off значение равно 120 мкмоль/л крови.

3.5. Рекомендуется в каждой лаборатории при использовании набора уточнить cut-off значение у обследуемого контингента.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

4.2. При попадании нингидрина на кожу и слизистые оболочки следует смыть его большим количеством проточной воды.

4.3. При работе с набором и анализируемыми образцами крови следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы крови человека являются потенциально инфицированным материалом, способным длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусных инфекций.

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

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

5.ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

Вариант 1:

- флуориметр планшетный (типа Fluoroskan II или VICTOR 1420) с использованием длины волны возбуждения 390 нм и длины волны испускания 485 нм;

-планшеты 96-луночные **непрозрачные** (кат. № 9502817, фирма Labsystems, Финляндия);

Вариант 2:

- флуорометр планшетный (типа DELFIA Plate Fluorometer 1232 или VICTOR 1420 с использованием длины волны возбуждения в диапазоне 330-430 нм и длины волны испускания в диапазоне 440-620 нм (с использованием 1-й пары фильтров - 340/613 нм, время задержки после вспышки света 20 мкс, окно измерения сигнала 20 мкс);

- планшеты 96-луночные **прозрачные** (типа Microstrip 1x12, Cat.No 9502037 или Microstrip 1x8, Cat.No 9502027 фирмы Labsystems);

(Тип планшетов и условия измерения флуоресцентного сигнала, соответствующие типу используемого оборудования представлены в табл.1)

Таблица 1

Оборудование	Тип планшета	Условия измерения флуоресцентного сигнала
<u>Вариант 1:</u> Флуориметр планшетный (типа Fluoroskan II или VICTOR 1420)	Планшеты 96-луночные непрозрачные (кат. № 9502817, фирма Labsystems, Финляндия)	Длина волны возбуждения 390 нм и длина волны испускания 485 нм
<u>Вариант 2:</u> Флуорометр планшетный (типа DELFIA Plate Fluorometer 1232 или VICTOR 1420)	Планшеты 96-луночные прозрачные (типа Microstrip 1x12, Cat.No 9502037 или Microstrip 1x8, Cat.No 9502027 фирмы Labsystems);	Длина волны возбуждения в диапазоне 330-430 нм и длина волны испускания в диапазоне 440-620 нм (с использованием 1-й пары фильтров - 340/613 нм, время задержки после вспышки света 20 мкс, окно измерения сигнала 20 мкс)

- полуавтоматические одноканальные пипетки со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости 50,75,150, 1000 и 5000 мкл;

-многоканальная полуавтоматическая пипетка со сменными наконечниками, позволяющая отбирать объемы жидкости 50, 75, 150 мкл;

- устройство для приготовления дисков из пятен крови с диаметром 3мм или 6 мм (панчер);

- термостат суховоздушный, обеспечивающий поддержание температуры +60°C с точностью не менее 1°C;

- прибор для встряхивания планшетов (шейкер), позволяющий производить встряхивание с амплитудой колебаний 3-4 мм и частотой 4-20 Гц при комнатной температуре (+18-25°C);

- холодильник с морозильной камерой на температуру -20°C;
- спирт этиловый медицинский перегнанный 80°;
- колбы конические стеклянные вместимостью 100 мл и 500 мл;
- цилиндр мерный вместимостью 100 мл;
- пленка самоклеющаяся для заклеивания планшетов;
- вода дистиллированная;
- иглы инъекционные;
- перчатки резиновые хирургические.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Анализируемыми образцами при работе с Набором реагентов ФАВР (универсальный) являются высушенные пятна крови человека, нанесенные на полоски фильтровальной бумаги.

Набор ФАВР (универсальный) рассчитан на проведение анализа 960 образцов (из них 6 калибровочных проб и 2 контрольных пробы в дубликатах и 40 анализируемых проб в дубликатах в каждом планшете).

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Приготовление калибровочных и контрольных проб.

Вскрыть пакет из фольги, извлечь калибровочные и контрольные пробы. Калибровочные и контрольные пробы готовы к использованию. Вскрытые пакеты с калибровочными и контрольными пробами вместе с осушителем хранить в герметично закрытом полиэтиленовом пакете при температуре +2 - 8° С не более 1 мес.

7.2. Приготовление спирта этилового медицинского 80°.

В колбу вместимостью 100 мл внести 50 мл спирта этилового медицинского ректифицированного перегнанного 96°, добавить 10 мл дистиллированной воды и тщательно перемешать. Спирт этиловый медицинский 80° можно хранить при комнатной температуре (+18-+25°C) не более 14 сут.

7.3. Приготовление раствора L-лейцил-L-аланина.

В один флакон с L-лейцил-L-аланином внести 3,0 мл бидистиллированной воды и тщательно перемешать до полного растворения содержимого. Раствор L-лейцил-L-аланина можно хранить при температуре -18 - -20° С не более 10 сут. Один флакон раствора L-лейцил-L-аланина рассчитан для проведения анализов в 5 планшетах.

7.4. Приготовление раствора нингидрина.

В один флакон с нингидрином внести 8,0 мл бидистиллированной воды и тщательно перемешать до полного растворения содержимого. Раствор нингидрина можно хранить при комнатной температуре в темном месте не более 30 сут. Один флакон раствора нингидрина рассчитан для проведения анализов в 5 планшетах.

7.5. Буферный раствор готов к использованию. Буферный раствор рассчитан для проведения анализов в 10 планшетах.

7.6. Медный реагент готов к использованию. Медный реагент рассчитан для проведения анализов в 10 планшетах.

7.7. Инкубационная смесь готовится непосредственно перед использованием. В таблице 2 указан необходимый объем инкубационной смеси и

приведен расход реагентов в зависимости от количества используемых планшетов. В коническую колбу вместимостью 100 мл внести необходимый объем раствора L-лейцил-L-аланина (п.6.3.), добавить соответствующие объемы раствора нингидрина (п.6.4.) и буферного раствора (п.6.5.) и тщательно перемешать.

Таблица 2

Состав инкубационной смеси в зависимости от количества используемых планшетов				
Количество планшетов	Раствор L-лейцил-L-аланина, мл	Раствор нингидрина, мл	Буферный раствор, рН= 5,8 мл	Общий объем инкубационной смеси, мл
1	0,5	1,5	3,5	5,5
2	1,0	3,0	7,0	11,0
3	1,5	4,5	10,5	16,5
4	2,0	6,0	14,0	22,0
5	2,5	7,5	17,5	27,5
6	3,0	9,0	21,0	33,0
7	3,5	10,5	24,5	38,5
8	4,0	12,0	28,0	44,0
9	4,5	13,5	31,5	49,5
10	5,0	15,0	35,0	55,0

Примечание. Все расходуемые реагенты даны с небольшим избытком.

7.8. В зависимости от количества определяемых образцов подготовить соответствующий объем инкубационной смеси (см. таблицу 2). Инкубационная смесь перед проведением анализа должна быть тщательно перемешана и доведена до комнатной температуры (+18 - +25°C). На странице 6 приведена схема проведения анализа.

7.9. Выбрать планшет, соответствующий Вашему измерительному прибору (см. таблицу 1). Составить протокол маркировки лунок. Лунки промаркировать следующим образом:

- A1, A2 - для калибровочной пробы 0 мкмоль/л;
- A3, A4 - для калибровочной пробы 90,8 мкмоль/л;
- A5, A6 - для калибровочной пробы 151,3 мкмоль/л;
- A7, A8 - для калибровочной пробы 272,4 мкмоль/л;
- A9, A10 - для калибровочной пробы 635,6 мкмоль/л;
- A11, A12 - для калибровочной пробы 1240,9 мкмоль/л;
- B1, B2 - для контрольной пробы А с низкой концентрацией;
- B3, B4 - для контрольной пробы В с высокой концентрацией.

Если Ваш прибор оснащен программным обеспечением для обсчета результатов, то размещение калибровочных и контрольных проб в лунках планшета провести согласно программе Вашего прибора.

СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

№	Стадия анализа	Реагенты, их количества и условия проведения реакции
1	Внесение в лунки образцов калибровочных, контрольных и анализируемых проб	по 1 диску в каждую лунку
2	Добавление спирта этилового медицинского 80°	Спирт этиловый медицинский 80°, 75 мкл на лунку
3	Инкубация № 1 (экстракция фенилаланина)	45 мин для дисков диаметром 3 мм, 1ч 30 мин для дисков диаметром 6 мм 4-8 Гц , шейкер
4	Удаление дисков из лунок	Инъекционная игла
5	Добавление инкубационной смеси	Инкубационная смесь, 50 мкл на лунку
6	Перемешивание	1-2 мин, 4-8 Гц , шейкер
7	Инкубация № 2	1 ч 20 мин, суховоздушный термостат при температуре +60°C
8	Охлаждение планшета	5 мин при температуре -20°C в морозильной камере холодильника (открытый планшет)
9	Добавление медного реагента	Медный реагент, по 200 мкл на лунку
10	Перемешивание	15 мин, 4-8 Гц, шейкер
11а	Вариант 1 Измерение сигналов флуоресценции растворов в лунках планшета	Флуориметр планшетный (длина волны возбуждения 390нм, длина волны испускания 485 нм)
11б	Вариант 2 Измерение сигналов флуоресценции растворов в лунках планшета	Флуорометр планшетный (длина волны возбуждения в диапазоне 330-430 нм, длина волны испускания 613 нм, время задержки после вспышки света 20 мкс, окно измерения сигнала 20 мкс)
12	Расчет результатов	Компьютерная программа

7.10. При помощи панчера из пятен крови с калибровочными и контрольными пробами выбить диски и внести в соответствующие лунки по одному диску на лунку. В оставшиеся лунки внести исследуемые образцы пятен крови, по одному диску на лунку.

При выбивании дисков из пятен крови обратить особое внимание на то, чтобы выбиваемые диски были полностью пропитаны кровью с обеих сторон. В противном случае будут получены ложные результаты.

7.11. Во все лунки планшета внести по 75 мкл спирта этилового медицинского 80° и заклеить специальной пленкой.

7.12. Инкубировать планшет при комнатной температуре (+18 - +25°C) со встряхиванием на шейкере с частотой 4-8 Гц в течение 45 мин для дисков диаметром 3 мм и 1 ч 30 мин для дисков диаметром 6мм.

7.13. По окончании инкубации аккуратно удалить самоклеющуюся пленку и удалить диски из лунок планшета инъекционной иглой.

7.14. Во все лунки планшета внести по 50 мкл инкубационной смеси (см. п.7.7. и таблицу 2).

7.15. Планшет заклеить самоклеющейся пленкой, поместить на шейкер и встряхивать с частотой 4-8 Гц в течение 1-2 мин при комнатной температуре.

7.16. Планшет поместить в суховоздушный термостат и инкубировать при температуре +60°C в течение 1 ч 20 мин.

7.17. Планшет вынуть из термостата, удалить самоклею пленку и поместить планшет в морозильную камеру холодильника при температур -20°C на 5 мин.

7.18. Планшет вынуть из морозильной камеры.

7.19. Во все лунки планшета внести по 200 мкл раствора медного реагента (см. п. 7.6.).

7.20. Планшет закрыть крышкой и встряхивать при комнатной температуре на шейкере с частотой 4-8 Гц в течение 15 мин.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Измерить величину сигнала флуоресценции во всех лунках планшета:

вариант 1 - на планшетном флуориметре, позволяющем проводить измерения при длине волны возбуждения 390 нм и длине волны испускания 485 нм,

вариант 2 - на планшетном флуорометре при длине волны возбуждения в диапазоне 330-430 нм и длине волны испускания в диапазоне 440-620 нм, время задержки после вспышки света 20 мкс, окно измерения сигнала 20 мкс (для DELFIA Plate Fluorometer 1232 использовать 1-ю пару фильтров - 340/613 нм).

Содержание фенилаланина в исследуемых пробах (мкмоль/мл) рассчитать при помощи встроенного программного обеспечения прибора.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ.

Результаты измерения содержания фенилаланина в сухих пятнах крови используются для выявления больных фенилкетонурией при массовом скрининге новорожденных, а также для текущего контроля состояния выявленных больных

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1. Набор ФАВР (универсальный) состоит из двух комплектов - комплекта калибровочных и контрольных проб и комплекта реагентов.

10.2. Комплект реагентов необходимо хранить при температуре +2 - +8°C не более 12 мес. Допускается хранение комплекта реагентов при комнатной температуре (+18 -+25°C) не более 5 сут.

10.3. Комплект калибровочных и контрольных проб должен храниться при температуре $+2 - 8^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности (12 мес). Допускается хранение комплекта калибровочных и контрольных проб при комнатной температуре ($+18 - +25^{\circ}\text{C}$) не более 5 сут. Абсолютно исключается воздействие влаги непосредственно на полоски с высушенными пятнами крови.

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

- раствор L-лейцил-L-аланина хранить при температуре $-18 - -20^{\circ}\text{C}$. Срок годности раствора L-лейцил-L-аланина не более 10 сут;

- раствор нингидрина хранить в темном месте при комнатной температуре ($+18 - +25^{\circ}\text{C}$). Срок годности раствора нингидрина не более 30 сут;

- вскрытый флакон буферного раствора хранить при температуре $+2 - 8^{\circ}\text{C}$. Срок годности буферного раствора после вскрытия флакона не более 2 мес;

- вскрытый флакон медного реагента хранить при температуре $+2 - 8^{\circ}\text{C}$. Срок годности медного реагента после вскрытия флакона 6 мес;

- инкубационная смесь хранению не подлежит;

- срок годности спирта этилового медицинского перегнанного 80° при комнатной температуре ($+18 - 25^{\circ}\text{C}$) не более 14 сут;

- вскрытые сухие пятна крови калибровочных и контрольных проб необходимо хранить вместе с осушителем в герметично закрытом полиэтиленовом пакете при температуре $+2 - 8^{\circ}\text{C}$. Срок годности вскрытых калибровочных и контрольных проб не более 1 мес.

10.5. Срок годности набора реагентов для количественного определения фенилаланина в сухих пятнах крови флуоресцентным методом "ФАВР (универсальный)" 12 мес.

10.6. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции.

Зав. производством

ООО «РИКО-мед»

Савицкая

А. В. Савицкая