

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

АО «Вектор-Бест»

М.Д. Хусаинов



2022 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для иммуноферментного определения концентрации альфа-фетопротеина
в сыворотке крови человека
(АФП – ИФА – БЕСТ)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов для иммуноферментного определения концентрации альфа-фетопротеина в сыворотке крови человека «АФП – ИФА – БЕСТ» (далее по тексту – набор) предназначен для определения концентрации альфа-фетопротеина (АФП) в сыворотке крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Альфа-фетопротеин – гликопротеин с молекулярной массой около 70 000 Да. В период внутриутробного развития АФП образуется преимущественно в желточном мешке и печени плода, и в незначительном количестве в желудочно-кишечном тракте. Затем он поступает в кровь плода, амниотическую жидкость и из них в кровь матери.

1.3. Количественное определение содержания АФП в сыворотке крови имеет диагностическое значение для пренатальной диагностики аномалий развития плода, мониторинга плода в течение беременности (синдром Дауна, дефекты нервной трубки); для диагностики некоторых форм раковых заболеваний (первичная гепатокарцинома, рак яичка, рак яичника).

1.4. Набор рассчитан на проведение анализа в дублях 41 исследуемых, 6 калибровочных образцов и 1 контрольного образца (всего 96 определений при использовании всех стрипов планшета).

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода

Метод определения основан на твердофазном иммуноферментном анализе с применением двух типов антител. В лунках планшета, при добавлении исследуемого образца и раствора для разведения сывороток, во время первой инкубации происходит связывание молекулы АФП с поликлональными антителами, иммобилизованными на внутренней поверхности лунок. Во время второй инкубации конъюгат моноклональных антител к АФП с пероксидазой связывается с АФП, иммобилизованным в ходе первой инкубации. Во время инкубации с раствором тетраметилбензидина плюс происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски пропорциональна концентрации АФП в анализируемых образцах. После измерения оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочного графика рассчитывается концентрация АФП в анализируемых образцах.

2.2. Состав набора

В состав набора входят:

- планшет разборный (12 восьмилуночных стрипов, «ломающихся» по 1 лунке) с иммобилизованными на внутренней поверхности поликлональными антителами к АФП человека, готовый для использования – 1 шт.;
- калибровочные образцы, содержащие известные количества АФП – 0; 10; 50; 100; 200 и 400 МЕ/мл; аттестованные по Международному стандарту Alphafoetoprotein; Human, NIBSC code: AFP, концентрации АФП в калибровочных образцах могут несколько отличаться от указанных величин, точные величины указаны на этикетках пробирок, готовые для использования – 6 пробирок (по 0,25 мл);

- контрольный образец на основе инактивированной сыворотки крови человека с известным содержанием АФП, аттестованный по Международному стандарту Alphafoetoprotein; Human, NIBSC code: AFP; не содержащий антитела к ВИЧ-1, 2 и вирусу гепатита С, HBsAg, и антиген p24 ВИЧ-1; готовый для использования – 1 пробирка (0,25 мл);
- конъюгат моноклональных антител к АФП с пероксидазой хрена, готовый для использования – 1 флакон (13 мл);
- раствор для разведения сывороток (PPC) – 3 флакона (по 12 мл);
- концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25) – 1 флакон (28 мл);
- раствор тетраметилбензидина плюс (раствор ТМБ плюс), готовый для использования – 1 флакон (13 мл);
- стоп-реагент, готовый для использования – 1 флакон (12 мл).

Принадлежности:

- пленка для заклеивания планшета – 2 шт.;
- трафарет для построения калибровочного графика – 1 шт.;
- ванночка для реагента – 2 шт.;
- наконечники для дозатора на 5–200 мкл – 16 шт.;
- планшет для предварительного разведения исследуемых образцов – 1 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность. Не обнаружено перекрестной реакции антител к АФП с сывороточным альбумином, хорионическим гонадотропином, СА 125, общим простат-специфическим антигеном и иммуноглобулинами человека.

3.2.* Воспроизводимость. Коэффициент вариации результатов определений содержания АФП в лунках, содержащих контрольный образец, не превышает 8%.

3.3.* Линейность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «линейность» – отклонение от расчетной величины концентрации АФП при разведении калибровочных образцов, содержащих 400, 200, 100 МЕ/мл, в 2 раза, и 50 МЕ/мл, в 5 раз,%. Процент линейности составляет 90–110%.

3.4.* Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» – соответствие измеренной концентрации АФП предписанной в пробе, полученной путем смешивания равных объемов контрольного образца и калибровочного образца 50 МЕ/мл АФП. Процент «открытия» составляет 90–110%.

3.5.* Чувствительность. Минимально определяемая концентрация АФП, рассчитанная на основании среднего арифметического значения оптической плотности калибровочного образца B_0 плюс 2σ (σ – среднее квадратичное отклонение от среднего арифметического значения B_0), не превышает 2,5 МЕ/мл.

3.6. Клиническая проверка. Концентрация АФП, измеренная в сыворотке крови, взятой с 9 до 11 ч, у 190 условно здоровых мужчин и женщин в возрасте 20–55 лет не превышала 12 МЕ/мл.

3.7. Рекомендуются в каждой лаборатории при использовании набора уточнить значения концентрации АФП, соответствующие нормальным у обследуемого контингента людей.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2б (приказ МЗ РФ от 06.06.12 № 4н).

4.2. Все компоненты набора являются нетоксичными. Стоп-реагент обладает раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания стоп-реагента на кожу и слизистые необходимо пораженный участок промыть большим количеством проточной воды.

4.3. При работе с исследуемыми образцами следует соблюдать меры предосторожности, принятые при работе с потенциально инфекционным материалом. Основные правила работы изложены в «Инструкции по мерам профилактики распространения инфекционных заболеваний при работе в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений», утвержденной Минздравом СССР 17 января 1991 г и в методических указаниях МУ-287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

4.4. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы сыворотки крови человека следует рассматривать как потенциально инфекционные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирусы гепатита или возбудителей других инфекций.

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

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

4.7. Для дезинфекции посуды и материалов, контактировавших с исследуемыми и контрольными образцами, рекомендуем использовать дезинфицирующие средства, не оказывающие негативного воздействия на качество ИФА, не содержащие активный кислород и хлор, например, комбинированные средства на основе ЧАС, спиртов, третичных аминов. Использование дезинфицирующих средств, содержащих активный кислород и хлор (H_2O_2 , деохлор, хлорамин), приводит к серьезному искажению результатов.

4.8. При использовании набора образуются отходы классов А, Б и Г, которые классифицируются и уничтожаются (утилизируются) в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами». Дезинфекцию наборов реагентов следует проводить по МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

- спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках стрипов при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620–655 нм; допускается измерение только при длине волны 450 нм;
- шейкер термостатируемый орбитального типа, позволяющий производить встряхивание при температуре $37 \pm 1^\circ\text{C}$ и 400–800 об/мин;
- дозаторы полуавтоматические одноканальные с переменным или фиксированным объемом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости от 5 до 5000 мкл;
- дозаторы полуавтоматические многоканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкостей от 5 до 1000 мкл;
- микроцентрифуга, позволяющая центрифугировать при 1500–2000 об/мин;
- промывочное устройство для планшетов;
- холодильник бытовой;
- флаконы вместимостью 15 мл;
- цилиндры мерные вместимостью 100, 1000 мл;
- вода дистиллированная;
- перчатки медицинские диагностические одноразовые;
- бумага фильтровальная;
- дезинфицирующий раствор.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Для проведения анализа используют сыворотку крови.

6.2. Для проведения анализа не следует использовать гемолизированную, мутную сыворотку крови.

6.3. Образцы сыворотки крови можно хранить при температуре от 2 до 8°C не более 72 часов или при температуре минус 20°C (и ниже) не более 3 мес.

Не допускается повторное замораживание-размораживание образцов сыворотки крови.

После размораживания образцы следует тщательно перемешать, осадок отделить центрифугированием. Тепловая обработка образцов не рекомендуется, поскольку она может приводить к снижению концентрации АФП.

6.4. Образцы сывороток крови, содержащие взвешенные частицы, необходимо очистить центрифугированием при 1000–1500 об/мин в течение 5 мин при температуре от 18 до 25°C .

7. ПОДГОТОВКА КОМПОНЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

7.1. Перед проведением анализа компоненты набора и исследуемые образцы сыворотки крови следует выдерживать при температуре от 18 до 25° С не менее 30 мин.

7.2. Подготовка планшета

Вскрыть пакет выше замка и установить на рамку необходимое для проведения анализа количество стрипов. Оставшиеся неиспользованными стрипы немедленно поместить вновь в пакет с влагопоглотителем, удалить из него воздух, плотно закрыть замок.

Хранение: при температуре от 2 до 8°С в течение всего срока годности набора.

7.3. Приготовление промывочного раствора

Внести в мерный цилиндр необходимое количество концентрата фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25) и довести до соответствующего количества дистиллированной водой.

В таблице приведен расход реагента в зависимости от количества используемых стрипов.

При выпадении осадка солей в концентрате необходимо прогреть его при температуре от 30 до 40°С до полного растворения осадка.

Хранение: при температуре от 2 до 8°С не более 5 сут.

7.4. Приготовление калибровочных и контрольного образцов

Калибровочные и контрольный образцы готовы к использованию и не требуют дополнительных разведений. Перед использованием пробирки с образцами встряхнуть или центрифугировать на микроцентрифуге так, чтобы капли растворов со стенок и крышки опустились на дно. Затем содержимое пробирок тщательно перемешать на вортексе или пипетированием, избегая образования пены.

Хранение: После первого вскрытия в плотно закрытых пробирках при температуре от 2 до 8°С в течение всего срока годности набора.

7.5. Предварительное разведение исследуемых сывороток

Предварительное разведение требуется в тех случаях, когда известно или предполагается, что концентрация АФП в анализируемых образцах выше 400 МЕ/мл.

Готовится в лунках планшета для предварительного разведения исследуемых сывороток за 5–10 мин до начала постановки анализа, при этом исходные образцы разводят раствором для разведения сывороток (PPC) в 10, 100 и более раз, например, следующим образом:

50 мкл исследуемого образца + 450 мкл PPC – разведение в 10 раз (раствор А);

50 мкл раствора А + 450 мкл PPC – разведение в 100 раз (раствор Б),

50 мкл раствора Б + 450 мкл PPC – разведение в 1000 раз (раствор В), и т. д.

7.6. Подготовка конъюгата

Конъюгат готов к использованию.

Необходимое количество конъюгата отобрать в чистый флакон или в ванночку для реагента.

В таблице приведен расход реагента в зависимости от количества используемых стрипов.

Оставшийся после проведения ИФА конъюгат утилизировать (*не сливать во флакон с исходным конъюгатом*).

Хранение: после первого вскрытия в плотно закрытом флаконе при температуре от 2 до 8°С в течение всего срока годности набора.

7.7. Подготовка раствора тетраметилбензидина плюс

Раствор тетраметилбензидина плюс (раствор ТМБ плюс) готов к использованию.

Необходимое количество раствора ТМБ плюс отобрать в чистый флакон или в ванночку для реагента. Необходимо исключить воздействие прямого солнечного или яркого искусственного света на раствор ТМБ плюс.

В таблице приведен расход реагента в зависимости от количества используемых стрипов.

Оставшийся после проведения ИФА раствор ТМБ плюс утилизировать (*не сливать во флакон с исходным раствором ТМБ плюс*).

Внимание! Для работы с раствором ТМБ необходимо использовать только одноразовые наконечники. Посуду, предназначенную для раствора ТМБ, нельзя отмывать с применением синтетических

моющих средств, поскольку даже их следы ведут к неконтролируемому окислению ТМБ в ходе реакции. После работы посуду ополоснуть водой, промыть 70% этиловым спиртом и тщательно отмыть дистиллированной водой.

Хранение: после первого вскрытия в плотно закрытом флаконе при температуре от 2 до 8°C в течение всего срока годности набора.

7.8. Стоп-реагент готов к использованию.

Хранение: после первого вскрытия в плотно закрытом флаконе при температуре от 2 до 8°C в течение всего срока годности набора.

8. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

8.1. Внести во все лунки по 200 мкл раствора для разведения сывороток. Далее внести в соответствующие лунки в дублях по 25 мкл калибровочных образцов и контрольного образца. В остальные лунки внести в дублях по 25 мкл анализируемых образцов сыворотки крови. Сразу после внесения калибровочного, контрольного или анализируемого образца содержимое лунки следует перемешать 3–4-х кратным пипетированием с использованием того же наконечника дозатора, которым вносили образец.

Время внесения образцов не должно превышать 10 мин при использовании всех лунок планшета.

8.2. Планшет заклеить пленкой и инкубировать в течение 15 мин при встряхивании на термостатируемом шейкере при температуре $37 \pm 1^\circ\text{C}$ и 700 об/мин.

8.3. По окончании инкубации снять липкую пленку и поместить ее в сосуд с дезинфицирующим раствором. С помощью промывочного устройства промыть лунки планшета 5 раз промывочным раствором (см. п. 7.3), чередуя аспирацию и немедленное заполнение лунок каждого стрипа. В каждую лунку вносить не менее 350 мкл промывочного раствора в процессе промывки каждого стрипа. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек. *Необходимо добиваться полного опорожнения лунок после каждого их заполнения.* По окончании промывки удалить остатки жидкости из лунок, постукивая планшетом в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

8.4. Внести во все лунки по 100 мкл конъюгата (см. п. 7.6).

Для внесения конъюгата использовать ванночку для реагента и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.

8.5. Планшет заклеить пленкой и инкубировать в течение 15 мин при встряхивании на термостатируемом шейкере при температуре $37 \pm 1^\circ\text{C}$ и 700 об/мин.

8.6. По окончании второй инкубации содержимое лунок удалить и промыть лунки так, как указано в п. 8.3.

8.7. Внести во все лунки по 100 мкл раствора ТМБ плюс (см. п. 7.7) и инкубировать в защищенном от света месте в течение 15 мин при температуре от 18 до 25°C.

Для внесения раствора ТМБ плюс использовать ванночку для реагента и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.

8.8. Внести во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор ТМБ плюс, по 100 мкл стоп-реагента.

8.9. Измерить оптическую плотность с помощью спектрофотометра в двухволновом режиме: основной фильтр – 450 нм, референс-фильтр – в диапазоне 620–655 нм. Допускается измерение только с фильтром 450 нм. Измерение проводить через 2–3 мин после остановки реакции.

Время между остановкой реакции и измерением оптической плотности не должно превышать 10 мин.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Вычислить средние арифметические значения оптической плотности для каждой пары лунок, содержащих калибровочные, конт-рольный и анализируемые образцы.

9.2. Построить в линейных координатах калибровочный график зависимости среднего арифметического значения оптической плотности (ед. опт. плотн.) от концентрации АФП в калибровочных образцах (МЕ/мл).

9.3. Определить содержание АФП в конт-рольном образце и анализируемых образцах по калибровочному графику.

9.4. Если концентрация АФП в анализируемых образцах сыворотки крови превышает 400 МЕ/мл, образец следует развести раствором для разведения сывороток в 10 раз или более (как указано в п. 7.5), повторить анализ и полученный результат умножить на коэффициент разведения.

9.5. Результаты анализа исследуемых образцов учитывать, если вычисленное по калибровочному графику значение концентрации АФП в контрольном образце соответствует указанному диапазону концентраций на этикетке пробирки.

10. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1. Транспортирование наборов должно производиться всеми видами крытого транспорта с соблюдением условий и требований, установленных на данном виде транспорта, при температуре от 2 до 8°C. Допускается транспортирование при температуре до 25°C не более 10 суток.

10.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно осуществляться при температуре от 2 до 8°C в течение всего срока годности в холодильных камерах или холодильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим с ежедневной регистрацией температуры.

10.3. Срок годности набора – 12 месяцев со дня выпуска. Не допускается применение наборов по истечении срока их годности.

10.3. Дробное использование набора может быть реализовано в течение всего срока годности. В случае дробного использования набора:

- неиспользованные стрипы можно хранить в плотно закрытом пакете при температуре от 2 до 8°C в течение всего срока годности набора;
- конъюгат, раствор тетраметилбензидаина плюс, концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином, раствор для разведения сывороток и стоп-реагент после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8°C в течение всего срока годности набора;
- калибровочные образцы, контрольный образец после вскрытия пробирок можно хранить в плотно закрытых пробирках при температуре от 2 до 8°C в течение всего срока годности набора;
- промывочный раствор хранить при температуре от 2 до 8°C не более 5 суток.

10.4. Построение калибровочного графика необходимо проводить для каждого независимого эксперимента, а также рекомендуется определение концентрации АФП в контрольном образце.

10.5. Для представления результатов измерений концентрации АФП в нг/мл следует использовать коэффициент пересчета $1,25 (1 \text{ МЕ/мл АФП} = 1,25 \text{ нг/мл АФП})$.

10.6. При постановке ИФА нельзя использовать компоненты из наборов разных серий или смешивать их при приготовлении растворов, кроме неспецифических компонентов (ФСБ-Т×25, стоп-реагент, раствор ТМБ плюс), которые взаимозаменяемы в наборах АО «Вектор-Бест».

Запрещается использовать реагенты из наборов других фирм-производителей.

10.7. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

11. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

11.1. Производитель гарантирует соответствие выпускаемых изделий требованиям нормативной и технической документации.

Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.

11.2. Производитель отвечает за недостатки изделия, за исключением дефектов, возникших вследствие нарушения правил пользования, условий транспортирования и хранения, либо действия третьих лиц, либо непреодолимой силы.

11.3. Производитель обязуется за свой счет заменить изделие, технические и функциональные характеристики (потребительские свойства) которого не соответствуют нормативной и технической документации, если указанные недостатки явились следствием скрытого дефекта материалов или некачественного изготовления изделия производителем.

По вопросам, касающимся качества набора

«АФП – ИФА – БЕСТ»,
следует обращаться в АО «Вектор-Бест»
по адресу:

630559, Новосибирская область,
Новосибирский район,
п. Кольцово, а/я 121,
тел. (383) 227-67-64,
E-mail: vbobtk@vector-best.ru

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ

Набор предназначен для профессионального применения в клинической лабораторной диагностике обученным персоналом.

Требования безопасности к медицинским лабораториям приведены в ГОСТ Р 52905-2007.

Все реагенты наборов, содержащие в своем составе материалы человеческого происхождения, инактивированы.

При динамическом наблюдении пациента для получения результатов, адекватно отражающих изменение концентрации АФП в крови, необходимо использовать наборы реагентов одного наименования (одного предприятия-изготовителя).

1. Обеспечение безопасности персонала

Обращение с материалами, контактирующими с исследуемыми образцами

Материалы, контактирующие с исследуемыми образцами, следует дезинфицировать согласно МУ-287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения» (утв. департаментом госсанэпиднадзора Минздрава РФ от 30.12.1998).

2. Обеспечение получения правильных результатов анализа

Достоверность и воспроизводимость результатов анализа зависят от выполнения следующих основных правил:

- не проводите ИФА в присутствии паров кислот, щелочей, альдегидов или пыли, которые могут менять ферментативную активность конъюгатов;
- ферментативная реакция чувствительна к присутствию ионов металлов, поэтому не допускайте контактов каких-либо металлических предметов с конъюгатом и раствором ТМБ;
- избегайте загрязнения компонентов набора микроорганизмами и химическими примесями, для этого используйте в работе чистую посуду и чистые одноразовые наконечники для каждого реагента, контроля, образца;
- рабочие поверхности столов, оборудования следует обрабатывать 70% этиловым спиртом (не допускается использование перекиси водорода, хлорсодержащих растворов);
- никогда не используйте одну и ту же емкость для конъюгата и раствора ТМБ;
- перед отбором раствора ТМБ из флакона необходимо протереть конус пипетки (внутреннюю и внешнюю поверхности) сначала дистиллированной водой, а затем 70% этиловым спиртом, так как малейшее загрязнение пипеток конъюгатом может привести к контаминации всего содержимого флакона;
- если допущена ошибка при внесении анализируемых образцов, нельзя, опорожнив эту лунку, вносить в нее новый образец; такая лунка бракуется.

Качество промывки лунок планшета играет важную роль для получения правильных результатов анализа:

- Для аспирации анализируемых образцов и последующей промывки рекомендуется использовать автоматическое или ручное промывочное устройство.
- Не допускайте высыхания лунок планшета в перерыве между завершением промывки и внесением реагентов.

– Добивайтесь полного заполнения и опорожнения всех лунок планшета в процессе промывки. Недостаточная аспирация жидкости в процессе промывки может привести к понижению чувствительности и специфичности анализа.

– Следите за состоянием промывочного устройства – регулярно (1 раз в неделю) обрабатывайте шланги и емкости 70% этиловым спиртом.

– Для предотвращения засорения игл промывочного устройства в конце рабочего дня обязательно выполните процедуру ополаскивания системы подачи жидкости дистиллированной водой.

3. Условия правильности работы набора

Результаты анализа исследуемых образцов учитывать, если будут выполнены следующие условия:

– соотношение оптических плотностей калибровочных образцов: $ОП_0 < ОП_{10} < ОП_{50} < ОП_{100} < ОП_{200} < ОП_{400}$;

– $ОП_{400} \geq 1,0$ ед. опт. плотн. (о.е.);

– $ОП_0 \leq 0,25$ о.е.;

– вычисленное по калибровочному графику значение концентрации АФП в контрольном образце попадает в пределы, указанные на этикетке пробирики.

$ОП_0$, $ОП_{10}$, $ОП_{50}$, $ОП_{100}$, $ОП_{200}$ и $ОП_{400}$ – среднее значение оптической плотности калибровочных образцов 0, 10, 50, 100, 200 и 400 МЕ/мл соответственно.

4. Расчет результатов анализа

Для построения калибровочного графика на прилагаемом трафарете против концентрации каждого калибровочного образца отложить соответствующее ей среднее значение оптической плотности. Последовательно соединить полученные точки отрезками прямых линий.

Определить концентрацию АФП в контрольном образце и анализируемых образцах по калибровочному графику. Для этого на оси ординат отметить среднее значение ОП анализируемого образца. Провести прямую линию, параллельно оси абсцисс, до пересечения с калибровочным графиком. От точки пересечения опустить перпендикуляр на ось абсцисс. По полученной точке пересечения определить значение концентрации АФП в образце.

При использовании для расчетов концентраций компьютерного или встроенного в спектрофотометр программного обеспечения в настройках выбрать метод, соответствующий кусочно-линейной аппроксимации.

5. Диагностическая значимость

В крови практически здоровых людей АФП определяется в концентрациях от 0 до 15 МЕ/мл. Повышение его концентрации связано с беременностью и некоторыми онкологическими заболеваниями.

В крови здоровых беременных женщин с нормальным плодом повышение уровня АФП наблюдается с 11–14 недели беременности, далее медиальные значения концентраций АФП возрастают в среднем на 5 МЕ/мл в неделю, составляя к концу 15-й недели около 28 МЕ/мл, а к концу 20-й недели около 55 МЕ/мл (см. таблицу). Концентрация АФП продолжает повышаться до 31–32 недели беременности, а затем постепенно снижается. Через несколько недель после родов АФП в сыворотке крови матери определяется в очень малых количествах*.

АФП является важным онкологическим маркером. Повышенные уровни АФП в крови могут наблюдаться у больных с различными формами рака, однако наиболее характерны они при первичной карциноме печени и эмбрионально-клеточных опухолях яичек и яичников, а также при плоскоклеточном раке пищевода и раковом метастазировании в печень. Поскольку период полураспада циркулирующего в организме АФП составляет 5–10 дней, наблюдение концентрации АФП в сыворотке крови больных в течение нескольких недель после удаления опухоли, лучевой терапии или химиотерапии позволяет контролировать их эффективность. Возможности дифференциальной диагностики увеличиваются при определении АФП в комплексе с другими онкомаркерами и в сочетании с иными диагностическими методами.

Для пренатальной диагностики аномалий развития плода концентрацию АФП рекомендуется определять в период от 15-й до 20-й недели беременности. Повышенный уровень концентрации АФП в сыворотке крови матери наблюдаются при дефектах развития нервной трубки (spina bifida, анэнцефалия и др) и брюшной стенки плода, при врожденных заболеваниях почек плода, а также при многоплодной беременности. Пониженный или низкий уровень концентрации АФП отмечает-

ся при пузырьном заносе и неразвивающейся беременности, а также может свидетельствовать о наличии у плода синдрома Дауна. Определение АФП в более поздние сроки целесообразно для прогнозирования угрозы гибели плода у беременных с хроническим нарушением функций плаценты. Резкое повышение концентрации АФП наблюдается, как правило, за 10–14 дней до внутриутробной гибели плода.

Диагностическая значимость результата при мониторинге беременности существенно возрастает в случае комплексного определения АФП и хорионического гонадотропина и NSE.

При наблюдении за недоношенными новорожденными детьми определение АФП может быть использовано для прогнозирования и диагностики рецидивирующего апноэ.

Повышенные концентрации АФП в крови могут регистрироваться при различных онкологических заболеваниях. Чаще всего это происходит при первичном раке печени (более 80% случаев первичного рака печени) и при эмбрионально-клеточных опухолях яичек и яичников. Концентрация АФП при этих видах рака может достигать десятков тысяч МЕ/мл. Для других опухолей АФП как маркер недостаточно специфичен, а его уровень концентрации часто бывает повышенным лишь в определенных периоды развития заболевания. Если же опухоль продуцирует АФП, то мониторинг концентрации АФП после удаления опухоли или химиотерапии позволяет адекватно оценить эффективность лечения. Так, при условии полной элиминации опухоли концентрация АФП прогрессивно снижается до нормального, а при рецидиве заболевания она снова начинает расти.

Умеренно повышенные уровни концентрации АФП нередко отмечаются при заболеваниях печени нераковой природы с интенсивной регенерацией ее тканей (в том числе при вирусных гепатитах и циррозе).

6. Краткая схема проведения ИФА для набора реагентов «АФП – ИФА – БЕСТ»

Использовать только после тщательного ознакомления с инструкцией!

- Внести:** по 200 мкл РРС.
- Внести:** по 25 мкл калибровочных, контрольного и анализируемых образцов в дублях.
- Инкубировать:** 15 мин, 37°C, 700 об/мин.
- Промыть:** промывочным раствором,
350 мкл, 5 раз.
- Внести:** по 100 мкл конъюгата.
- Инкубировать:** 15 мин, 37°C, 700 об/мин.
- Промыть:** промывочным раствором,
350 мкл, 5 раз.
- Внести:** по 100 мкл раствора тетраметилбензидина.
- Инкубировать:** 15 мин, 18–25°C, в темноте.
- Внести:** по 100 мкл стоп-реагента.
- Измерить:** ОП при 450 нм / референсная длина волны 620–655 нм.

7. Графические символы

	Номер по каталогу		Медицинское изделие для диагностики <i>in vitro</i>
	Содержимого достаточно для проведения n-количества тестов		Не стерильно
	Код партии		Температурный диапазон
	Изготовитель		Дата изготовления
	Использовать до ...		Обратитесь к инструкции по применению
	Осторожно! Обратитесь к Инструкции по применению	YYYY-MM-DD YYYY-MM	Дата в формате Год-Месяц-День Год-Месяц

Консультацию специалиста по работе с набором можно получить по тел.: (383) 363-05-97.

**Медиальные значения концентраций АФП
при нормальной беременности**

Срок (недели)	Концентрация АФП	
	сыворотка крови, МЕ/мл	амниотическая жидкость, кЕ/мл
15	29 (14–58)	14,2
16	33 (16–66)	12,3
17	38 (19–76)	10,6
18	43 (21–86)	9,1
19	48 (24–96)	7,7
20	53 (27–106)	6,6

Примечание: в скобках – допустимые границы значений (0,5–2 МОМ*).

Таблица расхода компонентов набора реагентов

Кол-во используемых стрипов	Промывочный раствор		Конъюгат, мл	Раствор ТМБ плюс, мл
	ФСБ-Т×25, мл	Дистил. вода, мл		
2	4,0	до 100	2,0	2,0
3	6,0	до 150	3,0	3,0
4	8,0	до 200	4,0	4,0
5	10,0	до 250	5,0	5,0
6	12,0	до 300	6,0	6,0
7	14,0	до 350	7,0	7,0
8	16,0	до 400	8,0	8,0
9	18,0	до 450	9,0	9,0
10	20,0	до 500	10,0	10,0

Кол-во используемых стрипов	Промывочный раствор		Конъюгат, мл	Раствор ТМБ плюс, мл
	ФСБ-Т×25, мл	Дистил. вода, мл		
11	22,0	до 550	11,0	11,0
12	24,0	до 600	12,0	12,0

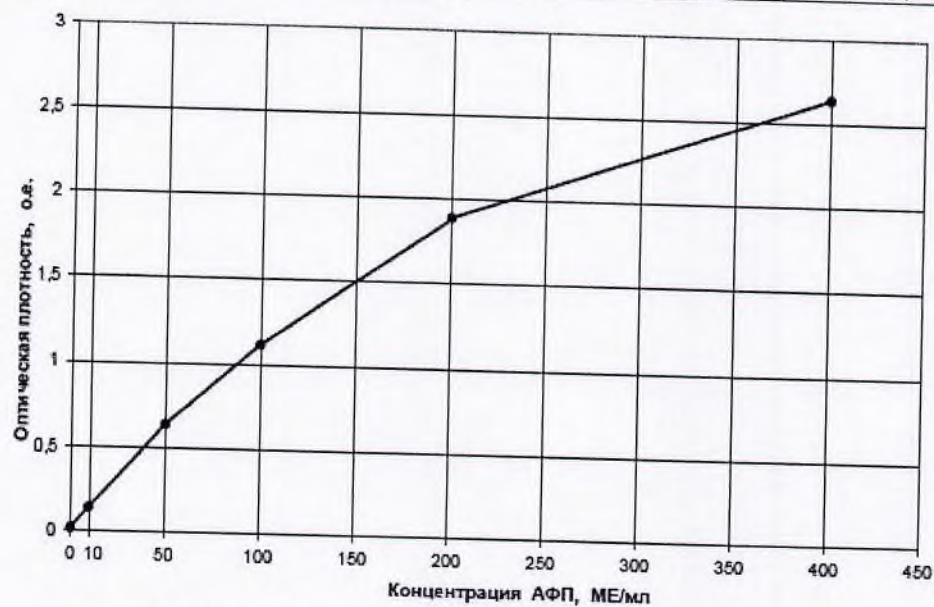


Рис. Пример зависимости оптической плотности от концентрации АФП в калибровочных образцах.

* Ткачева Г.А., Балаболкин М.И., Ларичева И.П. Радиоиммунохимические методы исследования. — М., Медицина, — 1983, — с. 6–8.

* по ГОСТ Р 51352-2013.

$$* \text{ MOM} = \frac{\text{индивидуальное значение концентрации}}{\text{среднее значение концентрации для данного срока беременности}}$$