«УТВЕРЖДЕНА»
Приказом Росздравнадзора
от «18» апреля 2012 г. № 1821-Пр/12

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ **альфа-ФЕТОПРОТЕИНА** В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА («**ИФА-АФП**»)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «ИФА-АФП» предназначен для количественного определения альфа-фетопротеина (АФП) в сыворотке крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. АФП является гликопротеином с молекулярной массой около 70 000 Да. В процессе развития человека АФП образуется главным образом в желточном мешке и эмбриональной печени и в меньшей степени в желудочно-кишечном тракте. Своей максимальной концентрации (до 240 000 МЕ/мл) в сыворотке крови плода АФП достигает в период 12–15 недель внутриутробного развития, после чего

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

его уровень снижается и достигает нормы (0–16 МЕ/мл) к концу второго года жизни. В таких пределах в норме этот показатель сохраняется на протяжении всей жизни.

АФП, являясь главным белком сыворотки крови раннего плода, выделяется почками плода в амниотическую жидкость и оттуда через плаценту и пупочный канатик проникает в систему кровообращения матери. Уровень АФП в крови беременных женщин постоянно возрастает и достигает максимума (до 400 МЕ/мл) к середине третьего триместра беременности.

Изменение концентрации АФП в сыворотке крови беременных женщин является важным показателем пренатальной диагностики некоторых врожденных заболеваний (открытые пороки медуллярной трубы, синдром Дауна). Кроме того, этот метод широко применяется в акушерстве при диагностике множественной беременности, внутриутробной смерти плода и угрозе выкидыша. Определение уровня АФП также может быть использовано при диагностике и мониторинге различных видов рака. Так, например, высокий и удерживающийся уровень АФП (800–80 000 МЕ/мл и выше) очень часто сопутствует первичной гепатоме, тератомам семенников и опухолям эндодермального синуса яичников.

1.3. Набор «ИФА-АФП» рассчитан на проведение анализа в дубликатах 40 неизвестных, 6 калибровочных проб, одной пробы контрольной сыворотки и одной пробы для определения оптической плотности раствора ТМБ при использовании всех стрипов одновременно (всего 96 определений).

Примечание: *в случае дробного применения набор может быть использован только в течение месяца после вскрытия компонентов набора.*

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип действия

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

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

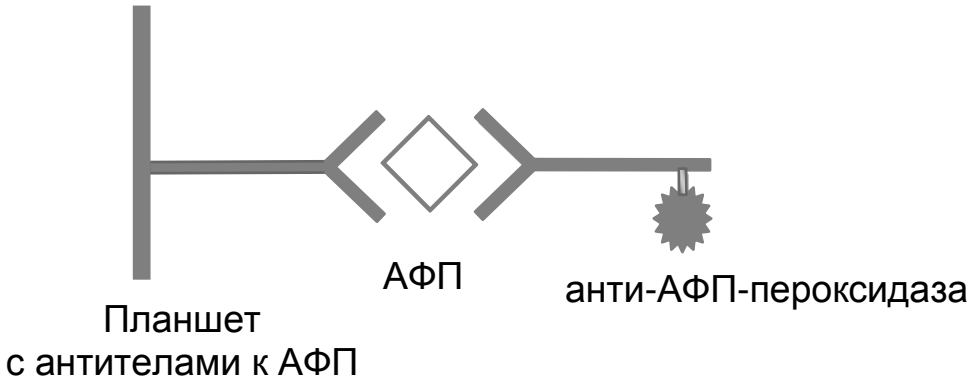


Рисунок 1. Схема анализа

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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

2.2. Состав набора

- комплект из двенадцати восьмилуночных стрипов в рамке с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок моноклональными антителами к АФП, маркирован «Стрипы с моноклональными антителами к АФП» — 1 упаковка;
- калибровочные пробы (КП), аттестованные по Первому международному стандарту WHO на АФП 72/225, содержащие известные количества АФП. Флаконы маркированы «Калибровочная проба №1», «Калибровочная проба №2», «Калибровочная проба №3», «Калибровочная проба №4», «Калибровочная проба №5», «Калибровочная проба №6»; точные значения концентраций АФП в калибровочных пробах указаны на этикетках флаконов, ориентировочные – 0; 10; 50; 100; 200; 300 МЕ/мл – 6 флаконов (лиофилизованные препараты или жидкости по 0,5 мл);
- конъюгат анти-АФП-пероксидаза, маркирован «Конъюгат Е» — 1 флакон (14 мл);
- водно-солевой раствор для разведения образцов сыворотки крови, маркирован «Буфер Д» — 1 флакон (10 мл);
- концентрированный водно-солевой раствор для промывки лунок, маркирован «Буфер Р» — 1 флакон (14 мл);

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

• раствор тетраметилбензидина, маркирован «Раствор ТМБ» — 1 флакон (14 мл);

• стоп-реагент (1 Н соляная кислота), маркирован «Стоп-реагент» — 1 флакон (14 мл);

• контрольная сыворотка с известным содержанием АФП, маркирована «Контрольная сыворотка» — 1 флакон (лиофилизованный препарат или жидкость 0,5 мл);

• прозрачный пластиковый пакет с замком (при упаковке стрипов в пакет из 2-слойного полиэтилена).

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность. Не обнаружено перекрестной реакции обоих моноклональных антител к АФП с сывороточным альбумином, хорионическим гонадотропином, плацентарным лактогеном и иммуноглобулинами человека.

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

3.3. Линейность. Зависимость концентрации АФП в образцах сыворотки крови при разведении их буфером Д имеет линейный характер в диапазоне концентраций калибровочных проб №2 - №6 и составляет 90–110%.

3.4. Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» АФП — проверка соответствия значения определяемой концентрации АФП расчетной величине, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы №6. Процент открытия составляет 90–110%.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

3.5. Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая набором концентрация АФП в сыворотке крови человека не превышает 0,9 МЕ/мл.

3.6. Хук-эффект высоких концентраций. В наборах реагентов, основанных на «сэндвич»-принципе анализа, при высоких концентрациях аналита зависимость величины оптической плотности от концентрации становится обратно пропорциональной (так называемый хук-эффект высоких концентраций). При использовании набора «ИФА-АФП» хук-эффект не обнаружен вплоть до концентрации АФП 12 500 МЕ/мл.

3.7. Диапазон ожидаемых значений. Концентрация АФП в сыворотке крови у 200 здоровых доноров обоих полов составила 0–14,4 МЕ/мл. В Таблице 1 приведены значения ожидаемых показателей АФП у женщин на различных сроках нормально протекающей беременности. Значения медиан получены в Федеральном медико-генетическом центре при ГУНИИАГ им. Д.О. Отта РАМН, г. Санкт-Петербург. Всего исследовано 22 058 образцов крови беременных женщин Северо-Западного региона.

Таблица 1

Срок беременности (полных недель)	Медиана АФП, МЕ/мл	Толерантные пределы, МЕ/мл
14	28	13-47
15	31	17-70
16	35	19-62
17	38	22-69
18	45	25-60
19	48	28-92
20	54	29-104

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Диапазон ожидаемых значений, медианы и их толерантные пределы зависят от многих факторов: специфичности метода, особенностей исследуемой популяции, точности метода в конкретной лаборатории. По этой причине каждой лаборатории рекомендуется использовать предоставленные изготовителем значения только до тех пор, пока специалистами лаборатории не будут определены диапазоны ожидаемых значений, характерных для конкретной популяции в месте расположения лаборатории.

Примечание: *в наборе «ИФА-АФП» значения концентраций калибровочных проб выражены в МЕ/мл. Для пересчета концентраций в нг/мл необходимо значение концентрации в МЕ/мл умножить на 1,21.*

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора — класс 2б.

4.2. Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

4.3. При работе с набором следует соблюдать ГОСТ Р 52905-2007 «Лаборатории медицинские. Требования безопасности».

4.4. Стоп-реагент представляет собой 1 Н раствор соляной кислоты. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания стоп-реагента на кожу и слизистые необходимо промыть пораженный участок большим количеством проточной воды.

4.5. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, т.к. производные крови, входящие в состав набора, и исследуемые образцы являются потенциально

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

инфицированным материалом, способным длительное время сохранять и передавать возбудителей различных вирусных инфекций.

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

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

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках при длине волны 450 нм;
- прибор для встряхивания рамки со стрипами (термостатируемый шейкер), позволяющий производить встряхивание со скоростью 400–800 об/мин при температуре +37°С;
- пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками с изменяемым объемом отбора жидкостей: на 5–50 мкл; 40–200 мкл; 200–1000 мкл; 1000–5000 мкл;
- пипетка полуавтоматическая восьмиканальная со сменными наконечниками, позволяющая отбирать объемы жидкости до 300 мкл;
- цилиндр мерный, позволяющий отмерять 50-500 мл;
- стакан стеклянный подходящего объема;
- вода дистиллированная;
- бумага фильтровальная;

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- перчатки резиновые или пластиковые;
- 1% раствор гипохлорита натрия или 6% раствор перекиси водорода;
- контейнер для дезинфекции;
- ванночки для внесения реагентов восьмиканальной пипеткой.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Забор крови из вены осуществляют с соблюдением правил асептики. После формирования сгустка сыворотку отделяют путем центрифугирования. После центрифугирования сыворотку переносят в отдельную пробирку.

6.2. Для проведения анализа не следует использовать плазму крови, гемолизированную или мутную сыворотку, а также образцы сыворотки, содержащие азид натрия.

6.3. Образцы сыворотки крови разрешается хранить при температуре +2…8°С не более 2-х суток; при необходимости более длительного хранения (до 3-х месяцев) рекомендуется аликвотировать образец и хранить в замороженном виде при температуре –20°С и ниже. Не допускается повторное замораживание образца.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Подготовка реагентов

7.1.1. Стрипы. Перед вскрытием пакет со стрипами необходимо выдержать при комнатной температуре (+18...25°С) не менее 30 минут. Вскрыть пакет и переставить на свободную рамку необходимое количество стрипов.

7.1.2. Жидкие калибровочные пробы и контрольная сыворотка готовы к использованию.

Для восстановления лиофилизованных калибровочных проб и контрольной сыворотки перед вскрытием флаконов легким постукиванием стряхнуть частицы, прилипшие к стенкам флаконов или к крышкам. Открыть флаконы и положить крышки перевернутыми на сухую поверхность. В каждый флакон с калибровочной пробой и контрольной сывороткой внести по 0,5 мл дистиллированной воды и закрыть крышками. Выдержать флаконы в течение 10 минут при комнатной температуре без перемешивания. Затем, аккуратно наклоняя и вращая флаконы, перемешать их содержимое до полного растворения, избегая пенообразования. В течение следующих 10 минут выдержать флаконы при комнатной температуре, периодически перемешивая.

7.1.3. Конъюгат готов к использованию. Расход конъюгата на один стрип составляет 1,15 мл.

7.1.4. Буфер Д готов к использованию.

7.1.5. Промывочный раствор. Необходимое количество буфера Р развести дистиллированной водой в 20 раз.

Например:

5 мл буфера Р + 95 мл дистиллированной воды.

Тщательно перемешать, избегая пенообразования.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

7.1.6. Раствор тетраметилбензидина (ТМБ) готов к использованию. Расход ТМБ на один стрип составляет 1,15 мл.

7.1.7. Стоп-реагент готов к использованию. Расход стоп-реагента на один стрип составляет 1,15 мл.

7.1.8. Все реагенты перед проведением анализа должны быть тщательно перемешаны и доведены до комнатной температуры (+18...25°С).

7.1.9. Разведение исследуемых образцов сывороток крови. Если по предварительным данным или по результатам анализа (см. **п. 9.3.**) значения концентрации АФП в исследуемых образцах выше КП №6, образцы следует последовательно развести буфером Д в 20 и 400 раз:

Образец № 1 (разведение в 20 раз):

380 мкл буфера Д + 20 мкл исследуемого образца.

Образец № 2 (разведение в 400 раз):

380 мкл буфера Д + 20 мкл Образца № 1.

При каждом разведении необходимо тщательное перемешивание.

На странице 18 приведена схема проведения анализа.

7.2. Постановка анализа

7.2.1. Составить протокол маркировки лунок. Лунки промаркировать следующим образом:

A1, A2 — № 1 — для измерения величины оптической плотности раствора ТМБ;

B1, B2 — № 2 — для измерения величины оптической плотности КП №1;

C1, C2 — № 3 — для измерения величины оптической плотности КП №2;

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

D1, D2 — № 4 — для измерения величины оптической плотности КП №3;

E1, E2 — № 5 — для измерения величины оптической плотности КП №4;

F1, F2 — № 6 — для измерения величины оптической плотности КП №5;

G1, G2 — № 7 — для измерения величины оптической плотности КП №6;

H1, H2 — № 8 — для измерения величины оптической плотности контрольной сыворотки.

7.2.2. Во все лунки, кроме лунок A1 и A2, внести по 100 мкл конъюгата.

7.2.3. Внести в соответствующие лунки по 20 мкл калибровочных проб и контрольной сыворотки, в оставшиеся лунки - по 20 мкл исследуемой сыворотки крови в дубликатах.

Примечание 1: *общее время внесения калибровочных проб, контрольной сыворотки и исследуемых сывороток крови не должно превышать 15 минут, иначе время инкубации разных образцов будет значительно различаться, что приведет к неправильным результатам.*

Примечание 2: *при разведении образцов необходимо ставить в анализ оба разведенных образца (в 20 и 400 раз).*

7.2.4. Инкубировать стрипы в течение 60 минут при встряхивании **в термостатируемом шейкере при температуре +37°С со скоростью 500–800 об/мин**.

7.2.5. По окончании инкубации удалить содержимое лунок в контейнер с дезинфицирующим раствором (1% раствором гипохлорита натрия или 6% раствором перекиси водорода) и промыть лунки пять раз. При каждой промывке во все лунки добавлять по 300 мкл промывочного раствора, приготовленного по **п. 7.1.5**, встряхнуть рамку на

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

шейкере в течение 5–10 секунд с последующим декантированием. После последнего декантирования тщательно удалить остатки жидкости из лунок постукиванием рамки со стрипами в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

Допускается промывка лунок при помощи автоматического промывочного устройства.

7.2.6. Немедленно внести во все лунки по 100 мкл раствора ТМБ. Инкубировать стрипы в темноте при комнатной температуре (+18...25°С) в течение 15–30 минут в зависимости от степени развития окраски.

7.2.7. Добавить во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор ТМБ, по 100 мкл стоп-реагента для остановки ферментной реакции, перемешать на шейкере в течение 1–2 минут при комнатной температуре.

7.2.8. Если невозможно измерить оптическую плотность в лунках планшета непосредственно после выполнения **п. 7.2.7.**, то следует иметь в виду, что окраска в лунках планшета стабильна не более 20 минут при комнатной температуре.

Примечание: *максимальная оптическая плотность не должна превышать пределов линейного измерения спектрофотометра. Рабочий диапазон спектрофотометра необходимо уточнять в паспорте прибора. Рекомендуемая максимальная оптическая плотность не более 2,5 ед.ОП.*

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

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

При регистрации результатов **необходимо вычитать** величину оптической плотности в лунках А1 и А2 из значений оптических плотностей всех остальных лунок.

Примечание: *среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках А1 и А2 не должно превышать 0,09 ед.ОП.*

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Построить калибровочный график зависимости оптических плотностей от концентрации АФП (МЕ/мл) в калибровочных пробах (Рисунок 2). Внешний вид графика зависит от способа преобразования осей.

Примечание 1: *для построения калибровочных графиков рекомендуется использовать Программное обеспечение «ИФА Мастер».*

Примечание 2: *для построения калибровочного графика на масштабной бумаге необходимо использовать данные оптических плотностей после вычитания из них средней величины оптической плотности лунок с ТМБ.*

Если программа фотометра не позволяет вычитать величину оптической плотности лунок А1 и А2, то необходимо пользоваться формулой:

$$B–B_T,$$

где B *— среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках, содержащих калибровочные или исследуемые пробы,*

B_T *— среднее арифметическое значение оптической плотности лунок А1 и А2.*

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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

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

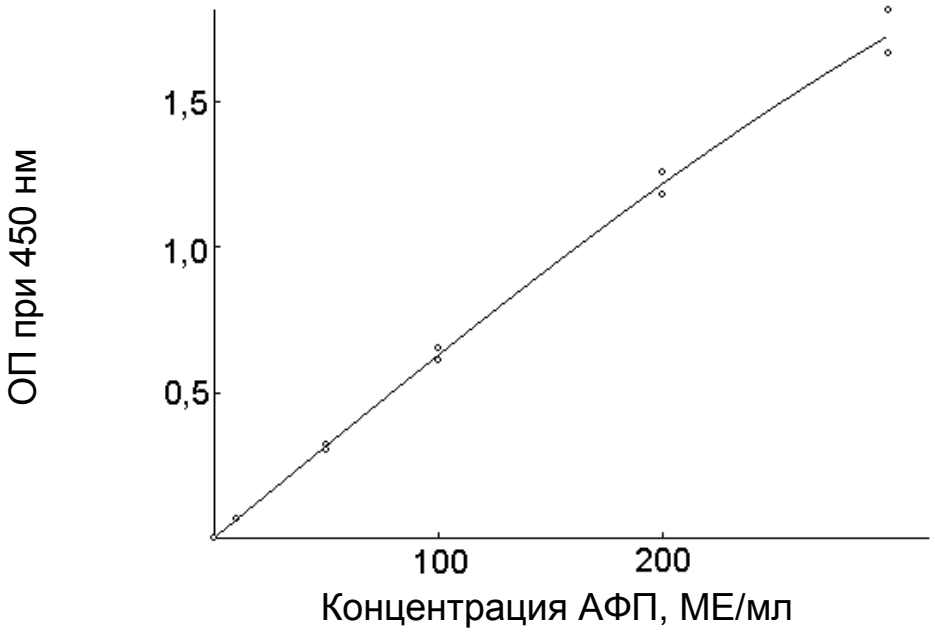


Рисунок 2. Типичный калибровочный график

Запрещается использовать для оценки реальных экспериментальных данных!

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1. Набор «ИФА-АФП» должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре +2...8°С в течение всего срока годности. Допускается хранение набора при температуре до +25°С не более 5 суток.

Срок годности набора — 12 месяцев.

10.2. Набор следует вынимать из холодильника не более чем за 1 час до начала анализа, но не позже, чем за 30 минут до проведения анализа.

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

- стрипы поместить сначала в пакет с этикеткой, затем в пластиковый пакет с замком и герметично закрыть. Хранить в герметично закрытом пакете при температуре +2...8°С в течение всего срока годности;
- жидкие, готовые к использованию, калибровочные пробы и контрольную сыворотку после вскрытия флаконов хранить при температуре +2...8°С не более 1 месяца;
- восстановленные (растворенные) из лиофилизованных препаратов калибровочные пробы и контрольную сыворотку хранить при температуре +2...8°С не более 1 месяца;
- конъюгат, буфер Д и раствор ТМБ после вскрытия флаконов хранить при температуре +2...8°С не более 1 месяца;
- промывочный раствор, подготовленный к использованию, хранить закрытым при комнатной температуре (+18...25°С) не более 5 суток;
- буфер Р и стоп-реагент после вскрытия флаконов хранить при температуре +2...8°С в течение всего срока годности.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

10.4. При использовании набора для проведения нескольких независимых анализов необходимо иметь в виду следующее:

- для каждого независимого эксперимента необходимо построение нового калибровочного графика и рекомендуется определение концентрации АФП в контрольной сыворотке;
- запрещается возвращать избыток конъюгата, ТМБ и стоп-реагента из ванночек во флаконы;
- из флаконов с открытыми крышками происходит испарение, которое может привести к получению некорректных результатов при повторном использовании реагентов. После окончания внесения реагентов в лунки планшета на каждой стадии анализа необходимо плотно закрывать крышки флаконов и помещать в рекомендуемые условия хранения.

10.5. Не допускается смешивание или одновременное использование реагентов из разных партий, за исключением ТМБ, стоп-реагента и концентрированного промывочного раствора, входящих в состав данного набора реагентов.

10.6. Запрещается использовать промывочный раствор, стоп-реагент и ТМБ из наборов реагентов других фирм-производителей.

10.7. Запрещается использовать промывочные растворы производства Алкор Био с буквенными обозначениями, отличными от указанного в инструкции к набору.

10.8. К работе с набором допускается только специально обученный персонал.

10.9. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

№	Стадия (операция)	Реагенты	Температура	Время	Примечания
1	Внесение реагентов	**100 мкл** конъюгата	**КТ**	Внесение КП, КС и исследуемых образцов не более 15’	В лунки для определения ОП ТМБ ничего не вносить
2		**20 мкл** КП и КС			
3		**20 мкл** исследуемых образцов			
4	**Инкубация**	—	**+37°С**	60’	Термостатируемый **шейкер**, 500 – 800 об/мин
5	Промывка	**300 мкл** в лунку 1*промывочного раствора (5 раз)			1*промывочный раствор = = 14 мл буфера Р + 266 мл H_2O
6	Внесение хромогена	**100 мкл** ТМБ			
7	**Инкубация с ТМБ**	—	**КТ**	15 – 30’	В темноте
8	Остановка ферментной реакции	**100 мкл** стоп-реагента			
9	Перемешивание	—	**КТ**	1 – 2’	**Шейкер**
10	Регистрация результатов	—		В течение 20’ после остановки ферментной реакции	**Фотометр**, 450 нм
11	Обработка результатов	—			Калькулятор и масштабная бумага/ соответствующее ПО

Примечания:

КП — калибровочная проба;

КС — контрольная сыворотка;

ОП — оптическая плотность;

КТ — комнатная температура (+18...25°С);

ПО – программное обеспечение.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

По вопросам качества набора «ИФА-АФП» следует обращаться в ООО «Компания Алкор Био» по адресу: 192148, г. Санкт-Петербург, Железнодорожный пр., д. 40, лит. А, тел/факс: (812) 677-87-79.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru