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

Instruction for use

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АЛЬФА-ФЕТОПРОТЕИНА В СЫВОРОТКЕ И ПЛАЗМЕ КРОВИ

«АФП-ИФА»

A SOLID-PHASE ENZYME IMMUNOASSAY FOR THE QUANTITATIVE DETERMINATION OF ALPHA-FETOPROTEIN IN HUMAN SERUM OR PLASMA

AFP EIA

НОМЕР ПО КАТАЛОГУ REF **K225**

ТУ № 9398-028-18619450-2007

РЕГИСТРАЦИОННОЕ УДОСТОВЕРЕНИЕ
№ ФСР 2007/00738 от 10 октября 2013 года

Антитела к ВИЧ 1,2, вирусу гепатита С и HBsAg отсутствуют
Контрольные сыворотки, входящие в состав набора, инактивированы.

For 96 determinations/На 96 определений

IVD Для *ин витро* диагностики

XEMA Co., Ltd.
The 9th Parkovaya str., 48
105264 Moscow, Russia
Tel./fax: +7(495) 510-57-07
e-mail: redkin@xema-medica.com
internet: www.xema-medica.com

CE EC REP

Authorized Representative in EU:
Polmed.de
Steinacker 20, D-73773
Aichwald, Germany
e-mail: info@polmed.de

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

«УТВЕРЖДЕНА»
Приказ Росздравнадзора № 2786-Пр/07 от 18 сентября 2007 г.
КРД 14353 от 07.05.2007

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АЛЬФА-ФЕТОПРОТЕИНА В СЫВОРОТКЕ И ПЛАЗМЕ КРОВИ «АФП-ИФА»

Рекомендована к утверждению Научно-экспертным Советом по медицинским изделиям

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «АФП-ИФА» предназначен для количественного определения концентрации альфа-фетопротеина в сыворотке и плазме крови методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Альфа-фетопротеин (АФП) – гликопротеин с молекулярной массой около 65 кДа, секретирующийся плодной печенью и желточным мешком. АФП является основным белком плодной сыворотки, у взрослых содержание АФП в сыворотке крови незначительно. Определение АФП в сыворотке крови используется для первичной диагностики и мониторинга гепатоцеллюлярного рака печени, эмбриональноклеточных опухолей яичников и яичек, тератом и тератокарцином любой локализации. Определение АФП в сыворотке крови беременных женщин или в амниотической жидкости в период с 15 до 20 недели служит одним из лабораторных методов выявления тяжелой врожденной патологии плода – синдрома Дауна и дефектов нервной трубки.

2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

Определение альфа-фетопротеина основано на использовании «сэндвич»-варианта твердофазного иммуноферментного анализа. На внутренней поверхности лунок планшета иммобилизованы мышиные моноклональные антитела к АФП человека. В лунках планшета, при добавлении исследуемого образца, происходит связывание АФП, содержащегося в исследуемом образце, с антителами на твердой фазе. Образовавшийся комплекс выявляют с помощью конъюгата мышиных моноклональных антител к АФП человека с пероксидазой хрена. В результате образуется связанный с пластиком «сэндвич», содержащий пероксидазу. Во время инкубации с раствором субстрата тетраметилбензидина (ТМБ) происходит окрашивание растворов в лунках. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации альфа-фетопротеина в исследуемом образце. Концентрацию альфа-фетопротеина в исследуемых образцах определяют по калибровочному графику зависимости оптической плотности от содержания альфа-фетопротеина в калибровочных пробах.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность. Перекрестная реакция мышиных моноклональных антител к АФП человека с другими аналитами приведена в таблице:

Аналит	Перекрестная реакция, %
Сывороточный альбумин	<0.1
ХГ	<0.1
Плацентарный лактоген	<0.1

3.2. Воспроизводимость.

Коэффициент вариации результатов определения содержания АФП в одном и том же образце сыворотки (плазмы) крови с использованием Набора «АФП-ИФА» не превышает 8.0%.

3.3. Линейность.

Зависимость концентрации АФП в образцах сыворотки (плазмы) крови при разведении их сывороткой (плазмой) крови, не содержащей АФП, имеет линейный характер в диапазоне концентраций 5–500 МЕ/мл и составляет ±10.0%.

3.4. Точность.

Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» – соответствие измеренной концентрации АФП предписанной, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы 15.0 МЕ/мл. Процент «открытия» составляет 90–110%.

3.5. Чувствительность.

Минимальная достоверно определяемая Набором «АФП-ИФА» концентрация АФП в сыворотке (плазме) крови не превышает 0.9 МЕ/мл.

3.6. Хук-эффект (hook-effect) высоких концентраций.

При использовании Набора «АФП-ИФА» хук-эффект не обнаружен до концентрации АФП 12000 МЕ/мл.

4. СОСТАВ НАБОРА

	Код компонента	Цвикон	Наименование	Кол-во	Ед.	Описание
1	P225Z	SORB MTP	**Планшет** 96-луночный полистироловый, стрипированный, готов к использованию	1	шт.	-
2	C225Z	CAL 1–6	**Калибровочные пробы** на основе трис-буфера (pH 7.2-7.4), содержащие известные количества альфа-фетопротеина – **0; 5; 15; 50; 150; 500 МЕ/мл**, готовы к использованию (калибровочная проба 0 МЕ/мл – 6 мл, остальные – по 0.8 мл каждая)	6	шт.	прозрачные жидкости красного цвета (калибровочная проба 0 – прозрачная бесцветная жидкость)
3	Q225Z	CONTROL	**Контрольная сыворотка** на основе сыворотки крови человека с известным содержанием альфа-фетопротеина, готова к использованию (0.8 мл)	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
4	T225Z	CONJ HRP	**Конъюгат**, готов к использованию (14 мл)	1	шт.	прозрачная жидкость красного цвета
5	S0112Z	DIL SPE	**ИФА-буфер**, готов к использованию (14 мл)	1	шт	прозрачная жидкость синего цвета
6	R055Z	SUBS TMB	**Раствор субстрата тетраметилбензидина** (ТМБ), готов к использованию (14 мл)	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
7	S008Z	BUF WASH 26X	**Концентрат отмывочного раствора** (солевой раствор с твин-20 и бензоиной кислотой), 26х-кратный (22 мл)	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
8	R050Z	STOP	**Стоп-реагент**, готов к использованию (14 мл)	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
9	N003		Бумага для заклеивания планшета	2	шт.	-
10	K225I		Инструкция по применению Набора реагентов «АФП-ИФА»	1	шт.	-
11	K225Q		Паспорт контроля качества Набора реагентов «АФП-ИФА»	1	шт.	-

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

5.1. Потенциальный риск применения Набора – класс 2б (ГОСТ Р 51609-2000).

5.2. Все компоненты Набора, за исключением стоп-реагента (5.0% раствор серной кислоты), в используемых концентрациях являются нетоксичными.

Раствор серной кислоты обладает раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. При попадании на кожу и слизистые пораженный участок следует промыть большим количеством проточной воды.

5.3. При работе с Набором следует соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

5.4. При работе с Набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированный материал, способный длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

6. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

- фотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность содержимого лунок планшета при длине волны 450 нм;
- термостат, поддерживающий температуру +37 °С ±0.1 °С;
- дозаторы со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы в диапазоне 25–250 мкл;
- цилиндр мерный вместимостью 1000 мл;
- вода дистиллированная;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- бумага фильтровальная.

7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

7.1. Перед проведением анализа компоненты Набора и исследуемые образцы сыворотки (плазмы) крови следует выдержать при комнатной температуре (+18...+25 °С) не менее 30 мин.

7.2. Приготовление планшета.

Вскрыть пакет с планшетом и установить на рамку необходимое количество стрипов. Оставшиеся неиспользованными стрипы, чтобы предотвратить воздействие на них влаги, тщательно заклеить бумагой для заклеивания планшета и хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора.

7.3. Приготовление отмывочного раствора.

Содержимое флакона с концентратом отмывочного раствора (22 мл), перенести в мерный цилиндр вместимостью 1000 мл, добавить 550 мл дистиллированной воды и тщательно перемешать. В случае дробного использования Набора следует отобрать необходимое количество концентрата отмывочного раствора и развести дистиллированной водой в 26 раз (1 мл концентрата отмывочного раствора + 25 мл дистиллированной воды).

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

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

8. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

8.1. Набор реагентов «АФП-ИФА» должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности, указанного на упаковке Набора.

Допускается хранение (транспортировка) Набора при температуре до +25 °С не более 15 суток. Не допускается замораживание целого набора.

Допускается однократное замораживание (-20 °С) калибровочных проб и контрольной сыворотки в аликвотах.

8.2. Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 41 исследуемых образцов, 6 калибровочных проб и 1 пробы контрольной сыворотки (всего 96 определений).

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

- оставшиеся неиспользованными стрипы необходимо тщательно заклеить бумагой для заклеивания планшета и хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора;
- конъюгат, субстрат, стоп-реагент после вскрытия флаконов следует хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора;
- калибровочные пробы и контрольную сыворотку после вскрытия флаконов следует хранить при температуре +2...+8 °С не более 2 месяцев;
- оставшийся неиспользованным концентрат отмывочного раствора следует хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора. Приготовленный отмывочный раствор следует хранить при комнатной температуре (+18...+25 °С) не более 15 суток или при температуре +2...+8 °С не более 45 суток.

Примечание. После использования реагента немедленно закрывайте крышку флакона. Закрывайте каждый флакон своей крышкой.

8.4. Для проведения анализа не следует использовать гемолизированную, мутную сыворотку (плазму) крови, а также сыворотку (плазму) крови, содержащую азид натрия. Если анализ производится не в день взятия крови, сыворотку (плазму) следует хранить при температуре -20 °С. Повторное замораживание-оттаивание образцов сыворотки (плазмы) крови не допускается. Допускается исследование сывороток, хранение которых с момента забора крови осуществлялось при температуре от +2 °С до +8 °С не более 7 суток.

8.5. Исключается использование для анализа образцов сыворотки (плазмы) крови людей, получавших в целях диагностики или терапии препараты, в состав которых входят мышиные антитела.

8.6. При использовании Набора для проведения нескольких независимых серий анализов следует иметь в виду, что для каждого независимого определения необходимо построение нового калибровочного графика; кроме этого, рекомендуется определение концентрации альфа-фетопротеина в контрольной сыворотке.

8.7. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение Инструкции по применению Набора.

8.8. Не используйте компоненты из других наборов или из аналогичных наборов других серий.

8.9. Срок годности Набора 18 месяцев.

9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

1	Поместите в рамку необходимое количество стрипов – исследуемые образцы в 2 повторах и 14 лунок для калибровочных проб и контрольной сыворотки.
2	Если предполагаемая концентрация АФП в исследуемом образце превышает 500 МЕ/мл, его следует дополнительно развести, используя калибровочную пробу 0. Использование других буферов и реагентов для разбавления образцов может искажать результаты определения! Примечание. Для получения надежных результатов рекомендуется использовать несколько последовательных разведений исследуемого образца сыворотки (плазмы) крови.
3	**Внесите во все лунки по 100 мкл конъюгата**.
4	**Внесите в соответствующие лунки в дубликатах по 50 мкл калибровочной пробы и контрольной сыворотки. В остальные лунки внесите в дубликатах по 50 мкл исследуемых образцов сыворотки (плазмы) крови**. Внесение калибровочных проб, контрольной сыворотки и исследуемых образцов необходимо произвести в течение 15 минут.
5	Заклейте планшет бумагой для заклеивания планшета и **инкубируйте** его **в течение 60 минут при температуре +37 °С**.
6	По окончании инкубации удалите содержимое лунок и **отмойте лунки 5 раз**. При каждой отмывке добавьте во все лунки по 250 мкл отмывочного раствора (см. п.7.3), встряхните планшет круговыми движениями по горизонтальной поверхности с последующей аспирацией или декантированием. Задержка при отмывке (замачивание лунок) не требуется. При каждом декантировании необходимо тщательно удалять остатки жидкости из лунок постукиванием планшета в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.
7	**Внесите во все лунки по 100 мкл раствора субстрата тетраметилбензидина**. Внесение раствора субстрата тетраметилбензидина в лунки необходимо произвести в течение 2–3 мин. **Инкубируйте планшет в темноте при комнатной температуре (+18...+25 °С) в течение 10–20 минут** в зависимости от степени развития синего окрашивания.
8	**Внесите во все лунки** с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор субстрата тетраметилбензидина, **по 100 мкл стоп-реагента**, при этом содержимое лунок окрашивается в ярко-желтый цвет.
9	**Измерьте величину оптической плотности (ОП) содержимого лунок планшета на фотометре** вертикального сканирования **при длине волны 450 нм**. Измерение ОП содержимого лунок планшета необходимо произвести в течение 15 мин после внесения стоп-реагента. Бланк фотометра выставляйте по калибровочной пробе С1.
10	Постройте в линейных координатах калибровочный график: ось абсцисс (х) – концентрация АФП в калибровочных пробах (МЕ/мл), ось ординат (у) – оптическая плотность калибровочных проб (ОП 450 нм). Для алгоритма обсчета (аппроксимации) калибровочного графика используйте интервальный (кусочно-линейный, «от точки к точке») метод.
11	Определите по калибровочному графику содержание АФП в исследуемых образцах. Если исследуемый образец предразводили (см. п.2), умножьте полученный результат на фактор разведения.

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

10. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ И НОРМЫ

10.1. Основываясь на результатах исследований, проведенных ООО «ХЕМА», рекомендуем пользоваться нормами, приведенными ниже. Вместе с тем, в соответствии с правилами *GLP* (Хорошей лабораторной практики), каждая лаборатория должна сама определить параметры нормы, характерные для обследуемой популяции.

Примечание. Значения концентраций АФП в исследуемых образцах, находящиеся ниже границы чувствительности Набора (0.9 МЕ/мл), а также превышающие значение верхней калибровочной пробы (500 МЕ/мл) следует приводить в следующей форме: в исследуемом образце X концентрация АФП ниже 0.9 МЕ/мл или выше 500 МЕ/мл.

В Наборе «АФП-ИФА» значения концентраций калибровочных проб выражены в МЕ/мл. Для пересчета концентраций в нг/мл, полученное значение концентрации в МЕ/мл следует умножить на 1.25.

1 МЕ/мл = 1.25 нг/мл

Исследуемая группа	Единицы, МЕ/мл		Единицы доп., нг/мл	
	Нижний предел	Верхний предел	Нижний предел	Верхний предел
Здоровые доноры	-	10.0	-	12.5

Медианы и СКО (рекомендуемый диапазон норм 0.5-2.0 MOM)

Беременные, неделя	Медиана, МЕ/мл	СКО
14	21.7	0.43
15	28.3	0.47
16	30.0	0.51
17	36.3	0.49
18	43.8	0.52
19	53.3	0.50
20	60.0	0.55
21	63.3	0.57

11. ЛИТЕРАТУРА

1. Johnson, P.J, (2002) Tumor Markers in Primary Malignancies of the liver. In «Tumor Markers: Physiology, pathobiology, technology and clinical applications», ed. Dimandis E.P. AACC Press, Washingon pp 269-276.
2. Stenman, U-H and Alfthan, H. (2002) Markers for Testicular Cancer. In «Tumor Markers: Physiology, pathobiology, technology and clinical applications», ed. Dimandis E.P. AACC Press, Washingon, pp 351-359.
3. Christiansen, M. et al. Alpha-fetoprotein in plasma and serum of healthy adults: preanalytical, analytical and biological sources of variation and construction of age-dependent reference intervals. Scand J Invest 2001 61: 205-216.
4. Trape, J. et al. Reference change value for a-Fetoprotein and its application in early detection of hepatocellular carcinoma in patients with hepatic disease. Clin Chem 2003 49(7): 1209-1211.

По вопросам, касающимся качества Набора **«АФП-ИФА»**,
следует обращаться в ООО «ХЕМА» по адресу:
105043, г. Москва, а/я 58
105264, г. Москва, ул. 9-я Парковая, д. 48, 1-й под., 5 этаж,
тел/факс (495) 737-39-36, 737-00-40, 510-57-07 (многоканальный)

электронная почта: info@xema.ru; rqc@xema.ru
интернет: www.xema.ru; www.xema-medica.com

Руководитель службы клиентского сервиса ООО «ХЕМА»,
к. б. н. Д. С. Кострикин