

ЗМІСТ

1. ПРИЗНАЧЕННЯ	2
2. ПРИНЦИП РОБОТИ НАБОРУ	3
3. АНАЛІТИЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ	3
4. СКЛАД НАБОРУ	4
5. ЗАПОБІЖНІ ЗАХОДИ	5
6. ОБЛАДНАННЯ ТА МАТЕРІАЛИ, ЯКІ НЕОБХІДНІ ПІД ЧАС РОБОТИ З НАБОРОМ	5
7. ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ ДЛЯ АНАЛІЗУ	5
8. УМОВИ ЗБЕРІГАННЯ ТА ЕКСПЛУАТАЦІЇ НАБОРУ	6
9. ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗУ	7
10. ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ ТА НОРМИ	8
11. ЛІТЕРАТУРА	8

ІНСТРУКЦІЯ З ВИКОРИСТАННЯ НАБОРУ РЕАГЕНТІВ ДЛЯ ІМУНОФЕРМЕНТНОГО ВИЗНАЧЕННЯ АЛЬФА- ФЕТОПРОТЕЇНУ У СИРОВАТЦІ (ПЛАЗМІ) КРОВІ «АФП-ІФА»

1. ПРИЗНАЧЕННЯ

Набір реагентів «АФП-ІФА» призначений для кількісного визначення концентрації альфа-фетопротеїну у сироватці (плазмі) крові методом твердофазного імуноферментного аналізу.

Альфа-фетопротеїн (АФП) – глікопротеїн з молекулярною масою близько 65 кДа, що секретується печінкою і жовтковим мішком. АФП є основним білком сироватки плода, у дорослих вміст АФП у сироватці крові незначний. Визначення АФП у сироватці крові використовується для первинної діагностики та моніторингу гепатоцелюлярного раку печінки, ембріональноклітинних пухлин яєчників і яєчок, тератом і тератокарцином будь-якої локалізації. Визначення АФП у сироватці крові вагітних жінок або у амніотичній рідині в період з 15 до 20 тижня є одним із лабораторних методів виявлення важкої вродженої патології плода - синдрому Дауна та дефектів нервової трубки.

2. ПРИНЦИП РОБОТИ НАБОРУ

Визначення альфа-фетопротеїну ґрунтується на використанні «сендвіч»-варіанта твердофазного імуноферментного аналізу. На внутрішній поверхні лунок планшета іммобілізовані мишачі моноклональні антитіла проти АФП людини. У лунках планшета, при додаванні досліджуваного зразка, відбувається зв'язування АФП, який міститься в досліджуваному зразку з антитілами на твердій фазі.

Комплекс, що утворився, виявляють за допомогою кон'югату мишачих моноклональних антитіл проти АФП людини з пероксидазою хрину. У результаті утворюється зв'язаний із твердою фазою «сендвіч», що містить пероксидазу. Під час інкубації з розчином субстрату тетраметилбензидину (ТМБ) рідина у лунках забарвлюється. Інтенсивність забарвлення прямо пропорційна концентрації альфа-фетопротеїну в досліджуваному зразку. Концентрацію альфа-фетопротеїну в досліджуваних зразках визначають за калібрувальним графіком залежності оптичної густини від вмісту альфа-фетопротеїну в калібрувальних пробах.

3. АНАЛІТИЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфічність. Перехресна реакція мишачих моноклональних антитіл проти АФП людини з іншими аналітами наведена в таблиці:

Аналіт	Перехресна реакція, %
Сироватковий альбумін	<0.1
ХГ	<0.1
Плацентарний лактоген	<0.1

3.2. Відтворюваність.

Коефіцієнт варіації результатів визначення вмісту АФП у тому самому зразку сироватки (плазми) крові з використанням Набору «АФП-ІФА» не перевищує 8%.

3.3. Лінійність.

Залежність концентрації АФП у зразках сироватки (плазми) крові при розведенні їх сироваткою (плазмою) крові, що не містить АФП, має лінійний характер в діапазоні концентрацій 5-500 МО/мл та складає $\pm 10.0\%$.

3.4. Точність.

Даний аналітичний параметр перевіряється тестом на «відкриття» – відповідність виміряної концентрації АФП підготовленої проби, отриманої шляхом змішування рівних об'ємів контрольної сироватки та калібрувальної проби 15 МО/мл. Відсоток «відкриття» складає 90–110%.

3.5. Чутливість.

Мінімальна достовірно визначувана Набором «АФП-ІФА» концентрація АФП у сироватці (плазмі) крові не перевищує 0.9 МО/мл.

3.6. Хук-ефект (hook-effect) високих концентрацій.

При використанні Набору «АФП-ІФА» хук-ефект не виявлений до концентрації АФП 12000 МО/мл.

4. СКЛАД НАБОРУ

Код компонента	Символ	Найменування	Кількість	Од.	Опис
1	R225Z SORB MTP	Планшет 96-лунковий полістироловий, стрипований, готовий до використання	1	шт	-
2	C225Z CAL 1-6	Калібрувальні проби на основі трис-буфера (рН 7.2-7.4), що містять відомі кількості альфа-фетопротеїну – 0; 5; 15; 50; 150; 500 МО/мл , готові до використання (калібрувальна проба С1 – 6 мл, інші – по 0.8 мл кожна)	6	шт	прозорі рідини червоного кольору (калібрувальна проба С1 – прозора безбарвна рідина)
3	Q225Z CONTROL	Контрольна сироватка на основі сироватки крові людини з відомим вмістом альфа-фетопротеїну, готова до використання (0.8 мл)	1	шт	прозора безбарвна рідина
4	T225Z CONJ HRP	Кон'югат , готовий до використання (14 мл)	1	шт	прозора рідина червоного кольору
5	R055Z SUBS TMB	Розчин субстрату тетраметилбензидину (ТМБ) , готовий до використання (14 мл)	1	шт	прозора безбарвна рідина
6	S008Z BUF WASH 26X	Концентрат розчину для відмивання , 26х-кратний (22 мл)	1	шт	прозора безбарвна рідина
7	R050Z STOP	Стоп-реагент , готовий до використання (14 мл)	1	шт	прозора безбарвна рідина
8	N003 -	Плівка для заклеювання планшета	2	шт	-
9	K225I -	Інструкція з використання Набору реагентів «АФП-ІФА»	1	шт	-
10	K225Q -	Паспорт контролю якості Набору реагентів «АФП-ІФА»	1	шт	-

5. ЗАПОБІЖНІ ЗАХОДИ

5.1. Всі компоненти Набору, за винятком стоп-реагенту (5.0% розчин сірчаної кислоти), у концентраціях, що використовуються, є нетоксичними.

Розчин сірчаної кислоти має подразнюючу дію; при роботі з ним потрібно уникати його розбризкування та потрапляння на шкіру і слизові оболонки. При потраплянні на шкіру і слизові оболонки уражену ділянку слід промити великою кількістю проточної води.

5.2. При роботі з Набором слід дотримуватись НПАОП 85.14-1.09-81. Правила влаштування, техніки безпеки, виробничої санітарії, протиепідемічного режиму і особистої гігієни при роботі в лабораторіях (відділеннях, відділах) санітарно-епідеміологічних установ системи Міністерства охорони здоров'я СРСР (НАОП 9.1.50-1.09-81).

5.3. При роботі з Набором необхідно користуватися одноразовими гумовими або пластиковими рукавичками, оскільки зразки крові людини слід розглядати як потенційно інфікований матеріал, здатний тривалий час зберігати і передавати віруси ВІЛ, гепатиту або будь-який інший збудник вірусної інфекції.

5.4. Не використовуйте Набір з ознаками пошкодження.

6. ОБЛАДНАННЯ ТА МАТЕРІАЛИ, ЯКІ НЕОБХІДНІ ПІД ЧАС РОБОТИ З НАБОРОМ

- фотометр вертикального сканування, що дозволяє вимірювати оптичну густина вмісту лунок планшета при довжині хвилі 450 нм;
- термостат, що підтримує температуру $+37^{\circ}\text{C} \pm 0.1^{\circ}\text{C}$;
- дозатори зі змінними наконечниками, що дозволяють відбирати об'єми в діапазоні 25–250 мкл;
- циліндр мірний об'ємом 1000 мл;
- вода дистильована;
- рукавички гумові або пластикові;
- папір фільтрувальний.

7. ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ ДЛЯ АНАЛІЗУ

7.1. Перед проведенням аналізу компоненти Набору та досліджувані зразки сироватки (плазми) крові слід витримати при кімнатній температурі ($+18...+25^{\circ}\text{C}$) не менше 30 хв.

7.2. Приготування планшета.

Відкрити пакет із планшетом і встановити в рамку необхідну кількість стрипів. Стрипи, що залишилися, ретельно заклеїти плівкою для заклеювання планшета з метою запобігання впливу вологи на лунки планшета. Планшет зберігати при температурі $+2...+8^{\circ}\text{C}$ протягом терміну придатності Набору.

7.3. Приготування розчину для відмивання.

Вміст флакона з концентратом розчину для відмивання (22 мл), перенести в мірний циліндр об'ємом 1000 мл, додати 550 мл дистильованої води та ретельно перемішати. У разі часткового використання Набору слід відібрати необхідну кількість концентрату розчину для відмивання і розвести дистильованою водою в 26 разів (до 1 мл концентрату розчину для відмивання додати 25 мл дистильованої води).

8. УМОВИ ЗБЕРІГАННЯ ТА ЕКСПЛУАТАЦІЇ НАБОРУ

8.1. Набір реагентів «АФП-ІФА» потрібно зберігати в упаковці підприємства-виробника при температурі +2...+8°C протягом терміну придатності, який вказаний на пакуванні Набору.

Допускається зберігання (транспортування) Набору при температурі до +25°C не довше 15 діб. Не допускається заморожування цілого Набору.

Допускається одноразове заморожування (-20°C) калібрувальних проб і контрольної сироватки в аліквотах.

8.2. Набір розрахований на проведення аналізу в двох повторях 41 досліджуваних зразків, 6 калібрувальних проб і 1 контрольної сироватки (всього 96 визначень).

8.3. У випадку часткового використання Набору, компоненти необхідно зберігати в такий спосіб:

- стрипи, що залишилися невикористаними, необхідно ретельно заклеїти плівкою для заклеювання планшета та зберігати при температурі +2...+8°C протягом всього терміну придатності Набору;

- кон'югат, субстрат, стоп-реагент після відкриття флаконів необхідно зберігати при температурі +2...+8°C протягом усього терміну придатності Набору;

- калібрувальні проби та контрольну сироватку, після відкриття флаконів, слід зберігати при температурі +2...+8°C не довше 2 місяців;

- концентрат розчину для відмивання, який залишився невикористаним, слід зберігати при температурі +2...+8°C протягом всього терміну придатності;

- готовий розчин для відмивання необхідно зберігати при кімнатній температурі (+18...+25°C) не довше 15 діб або при температурі +2...+8°C не довше 45 діб;

Важливе зауваження: після використання реагенту закривайте флакон кришкою. Закривайте кожний флакон відповідною кришкою.

8.4. Для проведення аналізу не слід використовувати гемолізовану, непрозору сироватку (плазму) крові, а також сироватку (плазму) крові, що містить азид натрію. У разі проведення аналізу не в день взяття крові, сироватку (плазму) крові необхідно зберігати при -20°C. Не допускається повторне заморожування/розморожування зразків.

8.5. Дослідження зразків сироватки (плазми) крові людей, що отримували з метою діагностики або терапії препарати, до складу яких входять мишачі антитіла, може давати помилкові (підвищені) значення.

8.6. Під час використання Набору для проведення декількох незалежних серій аналізів слід мати на увазі, що для кожного визначення необхідна побудова нового калібрувального графіка та використання контрольної сироватки.

8.7. Не слід використовувати компоненти з інших наборів або з аналогічних наборів інших партій.

9. ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗУ

1	Помістіть в рамку необхідну кількість стріпів – із розрахунку на кількість досліджуваних зразків у двох повторях і 14 лунок для калібрувальних проб та контрольної сироватки.
2	Якщо концентрація АФП в досліджуваному зразку перевищує 500 МО/мл, його необхідно додатково розвести, використовуючи калібрувальну пробу С1. Використання інших буферів чи реагентів для розведення зразків може призвести до помилкових результатів. Примітка: в такому випадку для отримання надійних результатів необхідно використовувати декілька послідовних розведень досліджуваного зразка сироватки (плазми) крові.
3	Внесіть у всі лунки по 100 мкл кон'югату.
4	Внесіть у відповідні лунки у двох повторях по 50 мкл калібрувальної проби та контрольної сироватки. В лунки, що залишилися, внесіть у двох повторях 50 мкл досліджуваних зразків сироватки (плазми) крові. Внесення калібрувальних проб, контрольної сироватки та досліджуваних зразків, необхідно провести протягом 15 хв.
5	Обережно перемішайте вміст планшета круговими рухами на горизонтальній поверхні, заклейте планшет плівкою для заклеювання планшета. Інкубуйте планшет протягом 60 хвилин при температурі +37 °С.
6	Після закінчення інкубації видаліть вміст лунок і відмийте лунки 5 разів . При кожному відмиванні додавайте в усі лунки по 250 мкл розчину для відмивання (див. п.7.3), струшуйте планшет круговими рухами по горизонтальній поверхні, а потім видаліть рідину з лунок за допомогою вакууму або витрушуванням. По закінченні відмивання необхідно ретельно видалити залишки рідини з лунок на фільтрувальний папір.
7	Внесіть в усі лунки по 100 мкл розчину субстрату тетраметилбензидину. Внесення розчину субстрату тетраметилбензидину в лунки необхідно провести протягом 2–3 хв. Інкубуйте планшет у темряві при кімнатній температурі (+18...+25°C) протягом 10–20 хвилин, в залежності від швидкості розвитку синього забарвлення.
8	Внесіть в усі лунки з тією же швидкістю і у тій же послідовності, як і розчин субстрату тетраметилбензидину, по 100 мкл стоп-реагенту; при цьому вміст лунок забарвлюється в яскраво-жовтий колір.
9	Визначте величину оптичної густини (ОГ) в лунках планшета за допомогою планшетного фотометра при довжині хвилі 450 нм. Вимірювання ОГ вмісту лунок планшета необхідно провести протягом 15 хв після внесення стоп-реагенту. Бланк фотометра виставляйте за калібрувальною пробою С1 або за повітрям.
10	Побудуйте в лінійних координатах калібрувальний графік: вісь абсцис (x) – концентрація АФП в калібрувальних пробах (МО/мл), вісь ординат (y) – оптична густина калібрувальних проб (ОГ 450 нм). Для алгоритму обчислення (апроксимації) калібрувального графіка використовуйте інтервальний (відрізково-лінійний, «від точки до точки») метод.
11	Визначте за калібрувальним графіком вміст АФП в досліджуваних зразках. У разі додаткового розведення зразка (див. п.2), отриманий результат необхідно домножити на фактор розведення.

10. ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ ТА НОРМИ

10.1. Ґрунтуючись на результатах досліджень, що проведені фахівцями ТОВ «ХЕМА», рекомендуємо скористатися нормами, наведеними нижче. Разом із тим, у відповідності до принципів GLP (Належної лабораторної практики), кожна лабораторія повинна самостійно визначити параметри норми, які є характерними для обстежуваної популяції.

Примітка: значення концентрацій АФП в досліджуваних зразках, які знаходяться нижче межі чутливості Набору (0.9 МО/мл), а також перевищують значення верхньої калібрувальної проби (500 МО/мл) необхідно наводити в наступній формі: «в досліджуваному зразку X концентрація АФП нижча за 0.9 МО/мл» або «вища за 500 МО/мл». В Наборі «АФП-ІФА» значення концентрацій калібрувальних проб виражені в МО/мл. Для перерахунку концентрацій в нг/мл, отримане значення концентрації в МО/мл необхідно домножити на 1.25.

$$1 \text{ МО/мл} = 1.25 \text{ нг/мл}$$

Досліджувана група	Одиниці вимірювання, МО/мл		Одиниці дод., нг/мл	
	Нижня межа	Верхня межа	Нижня межа	Верхня межа
Здорові донори	-	10.0	-	12.5

Медіани та СКВ (рекомендований діапазон норм 0.5-2.0 МОМ)

Вагітність, тиждень	Медіана, МО/мл	СКВ
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. ЛІТЕРАТУРА

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. AACCC Press, Washington 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. AACCC Press, Washington, 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.

З питань якості Набору «АФП-ІФА»

звертатися в ТОВ «ХЕМА» за адресою: м. Київ, вул. Академіка Єфремова, 23

тел./факс: + 38 (044) 422-62-16

email: info@xema.com.ua

www.xema-medica.com

Начальник відділу з контролю якості ТОВ «ХЕМА»

Коваленко Еліна Володимирівна