

**«УТВЕРЖДАЮ»**

Руководитель Департамента  
государственного контроля качества,  
эффективности, безопасности лекарственных  
средств и медицинской техники МЗ РФ  
\_\_\_\_\_ Р.У. Хабриев  
«05» января 2001 г.

**ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ  
ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ  
альфа-ФЕТОПРОТЕИНА  
В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА  
(ИФА-АФП-1)**

Рекомендована Комиссией по наборам реагентов  
для иммуноферментного (неинфекционные),  
радиоиммунологического и других видов  
иммунохимического анализа Комитета  
по новой медицинской технике МЗ РФ  
(протокол № 10 от 20 ноября 2000 г.)

ВЗАМЕН ИНСТРУКЦИИ ПО ПРИМЕНЕНИЮ,  
УТВЕРЖДЕННОЙ 16 июля 1997 г.

## **1. НАЗНАЧЕНИЕ**

**1.1.** Набор реагентов «ИФА-АФП-1» предназначен для количественного определения альфа-фетопротеина в сыворотке крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

**1.2.** Альфа-фетопротеин (АФП) является гликопротеином с молекулярной массой около 70000 Да. В процессе развития человека АФП образуется главным образом в желточном мешке и эмбриональной печени и в меньшей степени в желудочно-кишечном тракте. АФП является главным белком сыворотки крови раннего плода. Своей максимальной концентрации (до 240000 МЕ/мл) в сыворотке крови плода АФП достигает в период 12...15 недель внутриутробного развития, после чего 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 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 методом 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... 80000 МЕ/мл и выше) очень часто сопутствует первичной гепатоме, тератомам семенников и опухолям эндодермального синуса яичников.

**1.3.** Набор «ИФА-АФП-1» 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.

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

## **2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА**

В наборе «ИФА-АФП-1» 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 его с конъюгатом. При удалении содержимого из лунок и промывке происходит удаление избытка конъюгата анти-АФП-пероксидаза, не связавшегося с иммобилизованным в ходе инкубации АФП. Количество связавшегося конъюгата прямо пропорционально количеству АФП в исследуемом образце.

Во время инкубации с раствором ТМБ происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски прямо пропорциональна количеству связанного антителами конъюгата анти-АФП-пероксидаза. После измерения оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочного графика рассчитывается концентрация АФП в определяемых образцах.

## **3. 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 пакет;
- калибровочные пробы на основе сыворотки крови, аттестованные по Первому международному стандарту ВОЗ 72/225, содержащие известные количества АФП; концентрации АФП в калибровочных пробах указаны на этикетках флаконов — 6 флаконов (по 0,5 мл);
- конъюгат анти-АФП-пероксидаза, маркирован «Конъюгат Е» — 1 флакон (14 мл);
- буфер для разведения образцов сыворотки крови, маркирован «Буфер Д<sub>2</sub>» — 1 флакон (10 мл);
- концентрированный буферный раствор для промывки лунок, маркирован «Буфер Р» — 1 флакон (20 мл);
- раствор тетраметилбензидина, маркирован «Раствор ТМБ» — 1 флакон (14 мл);
- стоп-реагент, маркирован «Стоп-реагент» — 1 флакон (14 мл);
- контрольная сыворотка с известным содержанием АФП, маркирована «Контрольная сыворотка» — 1 флакон (0,5 мл).

## **4. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА**

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

**4.2.** Коэффициент вариации результатов определения АФП в одном и том же образце с использованием набора «ИФА-АФП-1» не превышает 8%.

**4.3.** Линейность. Зависимость концентрации альфа-фетопroteина в образцах сыворотки крови при разведении их буфером Д<sub>2</sub> имеет линейный характер в диапазоне концентраций калибровочных проб № 2–№ 6 и составляет ±10%.

**4.4.** Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» АФП— соответствие измеренной концентрации АФП предписанной в пробе, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы №3. Процент открытия составляет 90–110.

**4.5.** Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая набором концентрация АФП в сыворотке крови человека не превышает 1 МЕ/мл.

**4.6.** В наборе «ИФА-АФП-1» значения концентраций калибровочных проб выражены в МЕ/мл. Для пересчета концентраций АФП в нг/мл значение концентрации в МЕ/мл следует умножить на 1,25.

**4.7.** 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-1» хук-эффект не обнаружен вплоть до концентрации АФП 12500 МЕ/мл.

**4.8.** Клиническая проверка. Концентрация АФП у 200 здоровых доноров составила 0...14,4 МЕ/мл.

**4.9.** Рекомендуется в каждой лаборатории при использовании набора уточнить значения концентраций АФП, соответствующие нормальным.

## **5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ**

**5.1.** Потенциальный риск применения набора — класс 2а.

**5.2.** Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

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

**5.5.** При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, т.к. производные крови человека являются потенциально инфицированным материалом, способным длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель инфекций.

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

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

## **6. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ:**

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

## **7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА**

**7.1.** Калибровочные пробы и контрольная сыворотка готовы к использованию.

**7.2.** Буфер Д<sub>2</sub> готов к использованию.

**7.3.** Предварительное разведение исследуемых сывороток. Если значения АФП в исследуемых образцах по предварительным данным выше значения калибровочной пробы № 6, образцы следует развести Буфером Д<sub>2</sub> в 100 и 5000 раз. Пример подготовки образца к анализу:

Образец № 1 (разведение в 100 раз): 990 мкл Буфера Д<sub>2</sub> + 10 мкл исследуемого образца.

Образец № 2 (разведение в 5000 раз): 490 мкл Буфера Д<sub>2</sub> + 10 мкл образца №1.

**7.4.** Стрипы. Перед вскрытием пакет необходимо выдержать при комнатной температуре (+18...25°C) в течение 30 минут. Открыть пакет и переставить на свободную рамку необходимое количество стрипов. Оставшиеся стрипы хранить в пакете с герметично закрытым замком при температуре +2...8°C в течение всего срока годности.

**7.5.** Промывочный буфер. Необходимое количество Буфера Р развести дистиллированной водой в 10 раз.

Например: 5 мл Буфера Р + 45 мл дистиллированной воды.

Тщательно перемешать, избегая пенообразования. Хранить закрытым при комнатной температуре не более 5 суток. Оставшийся неиспользованным Буфер Р хранить закрытым при температуре +2...8°C в течение всего срока годности.

**7.6.** Конъюгат анти-АФП-пероксидаза готов к использованию.

**7.7.** Раствор ТМБ готов к использованию.

**7.8.** Стоп-реагент готов к использованию.

## **8. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА**

**8.1.** Все реагенты перед проведением анализа должны быть тщательно перемешаны и доведены до комнатной температуры. На последней странице приведена схема проведения анализа.

**8.2.** Составить протокол маркировки лунок. Лунки промаркировать следующим образом:

A1, A2 — №1 для измерения величины оптической плотности раствора ТМБ;  
B1, B2 — № 2 для калибровочной пробы № 1;  
C1, C2 — № 3 для калибровочной пробы № 2;  
D1, D2 — № 4 для калибровочной пробы № 3;  
E1, E2 — № 5 для калибровочной пробы № 4;  
F1, F2 — № 6 для калибровочной пробы № 5;  
G1, G2 — № 7 для калибровочной пробы № 6;  
H1, H2 — № 8 для контрольной сыворотки.

**8.3.** Во все лунки, кроме лунок A1 и A2, внести по 100 мкл раствора конъюгата анти-АФП-пероксидаза.

**8.4.** Внести в соответствующие лунки по 20 мкл калибровочных проб и контрольной сыворотки, в оставшиеся лунки по 20 мкл исследуемой сыворотки в дубликатах.

**8.5.** Инкубировать стрипы в течение 1 часа при встряхивании в термостатируемом шейкере при температуре +37°C со скоростью 500–800 об/мин.

**8.6.** По окончании инкубации удалить содержимое лунок декантированием и промыть лунки пять раз. При каждой промывке во все лунки добавлять по 300 мкл промывочного буфера, приготовленного по п.7.5, встряхнуть рамку на шейкере в течение 5–10 сек. с последующим декантированием. После последнего декантирования тщательно удалить остатки жидкости из лунок постукиванием рамки со стрипами в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

**8.7.** Немедленно внести во все лунки по 100 мкл раствора тетраметилбензидина. Инкубировать стрипы в темноте в течение 20 мин.

**8.8.** 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, встряхивать на шейкере 1–2 мин.

**8.9.** Измерить на фотометре вертикального сканирования оптическую плотность в лунках при 450 нм. Если программа фотометра позволяет вычитать величину оптической плотности в лунках A1 и A2 из значений оптических плотностей всех остальных лунок, то для дальнейших расчетов необходимо использовать величину *B* — среднее значение оптической плотности в лунках, содержащих калибровочные или

исследуемые пробы. В линейных координатах построить для калибровочных проб график зависимости  $B$  (ед.опт.плотн.) от концентрации АФП в калибровочных пробах (МЕ/мл).

Если программа фотометра не позволяет вычитать величину оптической плотности лунок  $A_1$  и  $A_2$ , то необходимо пользоваться формулой  $B - B_T$ , где  $B_T$  — среднее значение оптической плотности лунок  $A_1$  и  $A_2$ .

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

**8.10.** Если по техническим причинам невозможно измерить оптическую плотность в лунках планшета непосредственно после выполнения п.8.8, то следует иметь в виду, что окраска в лунках планшета стабильна в течение **20 минут** при температуре  $+2...8^{\circ}\text{C}$ .

## **9. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА**

**9.1.** Набор «ИФА-АФП-1» должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре  $+2...8^{\circ}\text{C}$  в течение всего срока годности. Допускается хранение набора при температуре до  $+25^{\circ}\text{C}$  не более 5 суток. Срок годности набора — 12 месяцев.

В случае дробного использования компоненты набора необходимо хранить следующим образом:

- стрипы хранить в герметично закрытом пакете с замком при температуре  $+2...8^{\circ}\text{C}$  в течение всего срока годности;
- калибровочные пробы и контрольную сыворотку после вскрытия флаконов хранить не более 1 месяца при температуре  $+2...8^{\circ}\text{C}$ ;
- конъюгат анти-АФП-пероксидаза, раствор ТМБ и буфер $D_2$  после вскрытия флаконов хранить не более 1 месяца при температуре  $+2...8^{\circ}\text{C}$ ;
- промывочный буфер, подготовленный к использованию, хранить закрытым не более 5 суток при комнатной температуре ( $+18...25^{\circ}\text{C}$ );
- Буфер $P$  и стоп-реагент после вскрытия флаконов хранить при температуре  $+2...8^{\circ}\text{C}$  в течение всего срока годности.

**9.2.** Для проведения анализа не следует использовать плазму крови, гемолизированную, мутную сыворотку, а также сыворотку, содержащую азид натрия.

**9.3.** При использовании набора для проведения нескольких независимых серий анализов необходимо иметь в виду, что для каждого независимого эксперимента необходимо построение нового калибровочного графика, кроме этого рекомендуется определение концентрации альфа-фетопroteина в контрольной сыворотке.

**9.4.** Запрещается использовать стоп-реагенты из наборов реагентов других фирм-производителей.

**9.5.** Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции.

**По вопросам качества набора «ИФА-АФП-1» обращаться по адресу: 189650, г. Санкт-Петербург, п. Песочный, ул. Ленинградская, д. 70/4, тел/факс: (812) 596-67-80, или в ИГКЛС НЦ ЭГКЛС МЗ РФ по адресу: 117246, Москва, Научный проезд, д. 14А, тел. (095) 120-60-95.**

### СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

Стадия анализа и реагенты	Номер пары лунок в соответствии с маркировкой по п. 8.2.								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9–48
Конъюгат анти-АФП-пероксидаза, мкл	–	100	100	100	100	100	100	100	100
КП № 1, мкл	–	20	–	–	–	–	–	–	–
КП № 2, мкл	–	–	20	–	–	–	–	–	–
КП № 3, мкл	–	–	–	20	–	–	–	–	–
КП № 4, мкл	–	–	–	–	20	–	–	–	–
КП № 5, мкл	–	–	–	–	–	20	–	–	–
КП № 6, мкл	–	–	–	–	–	–	20	–	–
КС, мкл	–	–	–	–	–	–	–	20	–
С <sub>х</sub> , мкл	–	–	–	–	–	–	–	–	20
Инкубация №1	1 час, термостатируемый шейкер, +37°C								
5-кратная промывка: промывочный буфер, мкл	5х 300	5х 300	5х 300	5х 300	5х 300	5х 300	5х 300	5х 300	5х 300
Раствор ТМБ, мкл	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Инкубация №2	КТ, темное место, 20 минут								
Стоп-реагент, мкл	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Перемешивание	Шейкер, 1–2 минуты								
Измерение ОП р-ров в лунках стрипов	Фотометр, 450 нм								
Расчет результатов	Калькулятор и масштабная бумага либо соответствующая компьютерная программа								

**Примечания:**

*КП* — калибровочная проба;  
*КС* — контрольная сыворотка;  
*С<sub>х</sub>* — анализируемые пробы;  
*ОП* — оптическая плотность;  
*КТ* — комнатная температура (+18...25°C).

---

Инструкция составлена сотрудниками ЗАО «Алкор Био»: зав. лабораторией биотехнологии В.А. Головаченко и ген. директором, к.б.н. Д.Г. Полынцевым.