

## ІНСТРУКЦІЯ З ВИКОРИСТАННЯ

### Набір реагентів для кількісного імуноферментного визначення альфа - ФЕТОПРОТЕЇНУ (АФП-БЕСТ)

#### 1. ПРИЗНАЧЕННЯ

Набір реагентів «АФП-БЕСТ» призначений для кількісного *in vitro* визначення альфа-фетопротеїну у сироватці крові людини методом твердофазного імуноферментного аналізу. Набір «АФП-БЕСТ» рекомендований для проведення аналізу в дублікатах 40 невідомих, 6 калібрувальних проб, однієї проби контрольної сироватки й однієї проби для визначення оптичної густини розчину тетраметилбензидину (ТМБ) при використанні всіх стрипів одночасно. У випадку дробового застосування необхідна обов'язкова постановка всіх каліброваних проб для кожного окремого аналізу.

#### 2. СКЛАД НАБОРУ

**Планшет** - полістирольний, з іммобілізованими антитілами до АФП **1 упаковка**.

**Кон'югат** – анти - АФП - пероксидаза **1 флакон**

**Калібрувальні проби (КП):**

**КОМПЛЕКТ**

**КП№1**- 1 флакон, 0,5 мл, містить 0 МО/мл АФП,

**КП№2**- 1 флакон, 0,5 мл, містить 10 МО/мл АФП,

**КП№3**- 1 флакон, 0,5 мл, містить 50 МО/мл АФП,

**КП№4**- 1 флакон, 0,5 мл, містить 100 МО/мл АФП ,

**КП№5**- 1 флакон, 0,5 мл, містить 200 МО/мл АФП,

**КП№6**- 1 флакон, 0,5 мл, містить 300 МО/мл АФП ,

**примітка:** ТОЧНІ номінали каліброваних проб **зазначені на етикетках флаконів і в паспорті до набору реагентів.**

**КС (контрольна сироватка)** містить відому кількість АФП, діапазон концентрацій зазначений на етикетці флакону. **1 флакон**

**РРС (Розчин для розведення зразків сироватки крові),** водно-сольовий розчин,, **1 флакон**

**Промивочний розчин,** концентрований водно-сольовий розчин для промивання. **2 флакона**

**ТМБ (Розчин тетраметилбензидина)**

**1 флакон**

**СР (Стоп-реагент)**

**1 флакон**

#### 3. АНАЛІТИЧНІ Й ДІАГНОСТИЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРУ.

**3.1. Чутливість.** Мінімальна достовірно обумовлена набором концентрація АФП в сироватці крові людини не перевищує 0,9 МО/мл.

**3.2. Діапазон очікуваних значень.** Концентрація АФП в сироватці крові донорів чоловіків та жінок склала 0–14,4 МО/мл. В Таблиці 1 приведено значення очікуваних показників АФП у жінок на різних термінах нормальної вагітності.

Таблиця 1

Термін вагітності (повних тижнів)	Медіана АФП, МО/мл	Толерантні межі, МО/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

Діапазон очікуваних значень, медіани та їх толерантні межі залежать від багатьох факторів: специфічності метода, особливостей досліджуваної популяції, точності метода в конкретній лабораторії. Для цього кожній лабораторії рекомендується використовувати данні виробником значення медіан тільки до тих пір, поки спеціалістами лабораторії не будуть визначені медіани, характерні для конкретної популяції в місці розташування.

**Примітка :** у наборі « ІФА- АФП » значення концентрацій калібрувальних проб виражені в МО/мл . Для перерахунку концентрацій у нг/мл необхідно значення концентрацій в МО/мл помножити на 1,21.

#### 4. ЗАПОБІЖНІ ЗАХОДИ.

При роботі з досліджуваними сироватками і контрольними зразками слід дотримуватись заходів безпеки, прийняті при роботі з потенційно інфекційним матеріалом: працювати в гумових рукавичках; не пікетувати розчини ротом; всі використані матеріали дезінфікувати відповідно до вимог чинного законодавства.

## 5. ОБЛАДНАННЯ Й МАТЕРІАЛИ, НЕОБХІДНІ ПРИ РОБОТІ З НАБОРОМ:

Спектрофотометр, шейкер – інкубатор, вошер, центрифуга лабораторна на 2,5- 3,0 тис. об / хв., холодильник побутовий, піпетки напівавтоматичні одно канальні і багатоканальні рукавички гумові хірургічні, колба мірна, папір фільтрувальний, вода дистильована.

## 6. АНАЛІЗОВАНІ ЗРАЗКИ.

**6.1.** Узяття крові для аналізу слід проводити з використанням стандартних процедур для венозної крові, а зразки сироватки повинні бути звільнені від клітин крові центрифугуванням. Після центрифугування сироватка крові повинна бути перенесена в окрему пробірку.

**6.2.** Слід уникати використання в аналізі плазми крові, гемолізованої, мутної або гіперліпемічної сироватки. Не допускається використання як консервант азиду натрію.

**6.3.** Зразки сироватки крові слід використати протягом 24 годин з моменту отримання за умови їх зберігання при +2...8°C. Для більш тривалого зберігання зразки необхідно заморозити при температурі нижче -20°C. Уникати повторного заморожування зразків.

## 7. ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗУ.

### 7.1 . Підготовка реагентів

7.1.1 . Стріпи . Перед розкриттям пакет зі стріпами необхідно витримати при кімнатній температурі ( +18 ... 25 ° С ) не менше 30 хвилин. Розкрити пакет і переставити на вільну рамку необхідну кількість стріпів .

7.1.2 . Рідкі калібрувальні проби і контрольна сироватка готові до використання.

Для відновлення ліофілізованих калібрувальних проб та контрольної сироватки перед розкриттям флаконів легким постукуванням струсити частинки , які прилипли до стінок флаконів або до кришок . Відкрити флакони і покласти кришки перевернутими на суху поверхню. У кожний флакон з калібрувальної пробію та контрольної сироваткою внести по 0,5 мл дистильованої води і закрити кришками. Витримати флакони протягом 10 хвилин при кімнатній температурі без перемішування. Потім , акуратно нахилиючи і обертаючи флакони , перемішати їх вміст до повного розчинення , уникаючи піноутворення . Протягом наступних 10 хвилин витримати флакони при кімнатній температурі , періодично перемішуючи.

7.1.3 . Кон'югат готовий до використання. Витрата кон'югату на один стріп становить 1,15 мл .

7.1.4 . РРС готовий до використання.

7.1.5 . Розчин для промивання . Необхідна кількість промиваючого розчину розвести дистильованою водою в 20 разів.  
*Наприклад:* 5 мл промиваючого розчину + 95 мл дистильованої води.

Ретельно перемішати , уникаючи піноутворення .

7.1.6 . Розчин тетраметилбензидину ( ТМБ ) готовий до використання. Витрата ТМБ на один стріп становить 1,15 мл .

7.1.7 . Стоп - реагент готовий до використання. Витрата стоп- реагенту на один стріп становить 1,15 мл .

7.1.8 . Всі реагенти перед проведенням аналізу повинні бути ретельно перемішані і доведені до кімнатної температури ( +18 ... 25 ° С ) .

7.1.9 . Розведення досліджуваних зразків сироваток крові. Якщо за попередніми даними або за результатами аналізу (див. п. 9.3 . ) Значення концентрації АФП в досліджуваних зразках вище КП № 6 , зразки слід послідовно розвести РРС в 20 і 400 разів:

**Зразок № 1** (розведення в 20 разів) :

380 мкл РРС + 20 мкл досліджуваного зразка.

**Зразок № 2** (розведення в 400 разів) :

380 мкл РРС + 20 мкл Зразка № 1 .

При кожному розведенні необхідно ретельно перемішування .

Наведено схему проведення аналізу.

### 7.2 Постановка аналізу

7.2.1 . Скласти протокол маркування лунок. Лунки промаркувати наступним чином :

A1 , A2 - № 1 - для вимірювання величини оптичної густини розчину ТМБ ;

B1 , B2 - № 2 - для вимірювання величини оптичної густини КП № 1 ;

C1 , C2 - № 3 - для вимірювання величини оптичної густини КП № 2 ;

D1 , D2 - № 4 - для вимірювання величини оптичної густини КП № 3 ;

E1 , E2 - № 5 - для вимірювання величини оптичної густини КП № 4 ;

F1 , F2 - № 6 - для вимірювання величини оптичної густини КП № 5 ;

G1 , G2 - № 7 - для вимірювання величини оптичної густини КП № 6 ;

H1 , H2 - № 8 - для вимірювання величини оптичної густини контрольної сироватки.

7.2.2 . У всі лунки , крім лунок A1 і A2 , внести по 100 мкл кон'югату .

7.2.3 . Внести у відповідні лунки по 20 мкл калібрувальних проб та контрольної сироватки , в що залишилися лунки - по 20 мкл досліджуваної сироватки крові в дублікатах .

**Примітка 1:** загальний час внесення калібрувальних проб , контрольної сироватки і досліджуваних сироваток крові не повинен перевищувати 15 хвилин , інакше час інкубації різних зразків буде значно відрізнятись , що призведе до неправильних результатів .

**Примітка 2:** при розведенні зразків необхідно ставити в аналіз обидва розлучених зразка ( в 20 і 400 разів ) .

7.2.4 . Інкубувати стріпи протягом 60 хвилин при струшуванні в термо-шейкері при температурі +37 ° С зі швидкістю 500-800 об / хв .

7.2.5 . По закінченні інкубації видалити вміст лунок в контейнер з дезінфікуючим розчином ( 1% розчином гіпохлориту натрію або 6% розчином перекису водню ) і промити лунки п'ять разів. При кожній промивці в усі лунки додавати по 300 мкл розчину для промивання , приготованого за п. 7.1.5 , струснути рамку на шейкері протягом 5-10

секунд з наступним декантуванням . Після останнього декантування ретельно видалити залишки рідини з лунок поштукуванням рамки зі стріпами в перевернутому положенні по фільтрувальному паперу .

Допускається промивка лунок за допомогою автоматичного промивного пристрою.

7.2.6 . негайно внести в усі лунки по 100 мкл розчину ТМБ . Інкубувати стріпи в темноті при кімнатній температурі ( +18 ... 25 ° С ) протягом 15-30 хвилин в залежності від ступеня розвитку забарвлення або 10 хвилин у термо-шейкері при температурі +37 ° С зі швидкістю 500-800 об / хв .

7.2.7 . Додати в усі лунки з тією же швидкістю і в тій же послідовності , як і розчин ТМБ , по 100 мкл стоп-реагенту для зупинки ферментної реакції , перемішати на шейкері протягом 1-2 хвилин при кімнатній температурі.

7.2.8 . Якщо неможливо виміряти оптичну густину у лунках планшета безпосередньо після виконання п. 7.2.7 . , То слід мати на увазі , що забарвлення в лунках планшета стабільна не більше 20 хвилин при кімнатній температурі.

**Примітка:** максимальна оптична густина не повинна перевищувати меж лінійного виміру спектрофотометра. Робочий діапазон спектрофотометра необхідно уточнювати в паспорті приладу . Рекомендована максимальна оптична густина не більше 2,5 од.ОГ

## 8 . РЕЄСТРАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Виміряти на фотометрі вертикального сканування оптичну густину у лунках при довжині хвилі 450 нм

При реєстрації результатів необхідно віднімати величину оптичної густини в лунках А1 і А2 з значень оптичної густини всіх інших лунок.

**Примітка:** середнє арифметичне значення оптичної густини в лунках А1 і А2 не повинно перевищувати 0,09 од.ОГ.

## 9 . ОБЛІК РЕЗУЛЬТАТІВ

9.1 . Побудувати калібрувальний графік залежності оптичної густини від концентрації АФП (МО/мл) в калібрувальних пробах (Малюнок 1). Зовнішній вигляд графіка залежить від способу перетворення осей .

**Примітка:** для побудови калібрувального графіка на масштабній папері необхідно використовувати дані оптичної густини після вирахування з них середньої величини оптичної густини лунок з ТМБ .

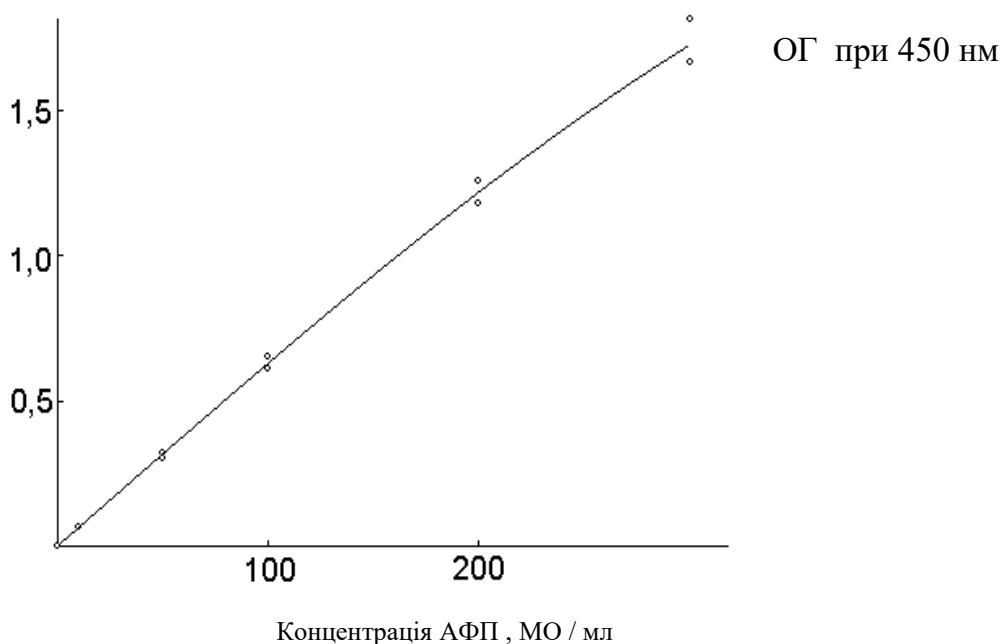
Якщо програма фотометра не дозволяє віднімати величину оптичної густини лунок А1 і А2 , то необхідно користуватися формулою :

**В- ВТ ,**

де В - середнє арифметичне значення оптичної густини в лунках , що містять калібрувальні або досліджувані проби ,  
ВТ - середнє арифметичне значення оптичної густини лунок А1 і А2.

9.2 . Визначити зміст АФП в пробах за калібрувальним графіком. У разі додаткового розведення зразків необхідно виміряну концентрацію АФП помножити на коефіцієнт розведення

9.3 . Екстраполяція калібрувального графіка для значень концентрації АФП , що перевищують номінал КП № 6 , не допускається. Для точного визначення концентрації АФП в таких зразках необхідно виконати їх розведення у відповідності з п. 7.1.9 .



Малюнок 1 . Типовий калібрувальний графік

## 10 . УМОВИ ЗБЕРІГАННЯ ТА ЕКСПЛУАТАЦІЇ НАБОРУ

Набір зберігати і транспортувати при (2-8)°С.

Промивочний розчин підготовлений до використання зберігати не більш 5 діб.

Допускається транспортування при температурі до 25°C не більше 5 діб. Не допускати заморожування!

Термін придатності набору реагентів – 14 місяців з дня випуску.

З питань, що стосуються якості набору, звертатися: в **ТОВ «Бест Діагностик»** за адресою:

04074, м. Київ-74, вул.Лугова, 9, тел./факс: (044) 500-57-11 E-mail: [info@bestdiagnostic.com.ua](mailto:info@bestdiagnostic.com.ua)

Виробник залишає за собою право вразі вдосконалення набору вносити зміни до інструкції.

### СХЕМА ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗУ

№	Стадія	Реагенти	Температура	Час	Примітка
1	Внесення реагентів	100 мкл кон'югату	КТ	Внесення КП,КС не більше 15 досліджуваних зразків	В лунки для виявлення ОГ ТМБ нічого не вносити
2		20 мкл КП і КС			
3		20 мкл досліджуваних зразків			
4	<b>Інкубація</b>	-	+37°C	60	Термо- шейкер , 500-800 об/хв.
5	Промивка	300 мкл в лунку 1*промив. розчину (5 разів)			1*промив. розчину=14 мл промив. розчину+266 мл H <sub>2</sub> O
6	Внесення хромогена	100 мкл ТМБ			
7	<b>Інкубація з ТМБ</b>	-	КТ	15-30	В темноті
			+37°C	10	Термо- шейкер , 500-800 об/хв
8	Зупинка ферментної реакції	100 мкл стоп-реагент			
9	Змішування	-	КТ	1-2	Шейкер
10	Ресстрація результатів	-		В перебігу 20 після зупинки ферментної реакції	Фотометр, 450 нм
11	Обробка результатів	-			Калькулятор і масштабний папір /відповідно ПЗ

#### Примітки:

**КП** - калібрувальна проба;

**КС** - контрольна сироватка;

**ОГ** - оптична густина;

**RT** - кімнатна температура (+18 ... 25 ° C);

**ПЗ** - програмне забезпечення.