

Набор АФП [I] IRMA

(Номер по каталогу: RK-800CT)

Система ¹²⁵I-АФП IRMA позволяет проводить прямое количественное определение *in vitro* альфа-фетопротеина (АФП) в сыворотке крови человека в диапазоне от 0-500 МЕ/мл при использовании образцов сыворотки объемом 50 мкл.

Введение

Альфа-фетопротеин (АФП) представляет собой гликопротеин с молекулярной массой 65000 кДа. В норме он образуется в большом количестве в печени эмбриона. Уровень АФП в материнской сыворотке постоянно увеличивается и достигает пика на 30 неделе беременности, а затем постепенно снижается. Повышенный уровень АФП в сыворотке беременных женщин наблюдается при дефектах нервной трубки (*spina bifida*) и аномалиях плаценты, в то время как пониженный уровень АФП в сыворотке крови беременной женщины и в амниотической жидкости – при хромосомных аномалиях.

У пациентов, страдающих карциномой печени, тератокарциномой яичек или яичников, наблюдаются очень высокие уровни АФП. Несколько реже повышенные уровни АФП могут наблюдаться при гепатитах, опухолях желудка, молочной железы или бронхов.

Данный набор может использоваться для оценки риска развития синдрома Дауна (трисомия 21) наряду с другими биохимическими и ультразвуковыми показателями, а также прочими данными (возраст и вес матери), при этом используется валидированное программное обеспечение для оценки риска развития синдрома Дауна (*см. Приложение*):

- Тройной тест:** определение во втором триместре беременности сывороточного АФП матери, чХГ (человеческий хорионический гонадотропин) и неконъюгированного эстриола.
- Четвертной тест:** определение во втором триместре беременности сывороточного АФП матери, чХГ, неконъюгированного эстриола и ингибина-А.
- Интегрированный тест:** определение в первом триместре беременности сывороточного АБПП-А матери, толщины воротникового пространства (ВП) плода с помощью ультразвукового исследования, а также определение во втором

триместре беременности сывороточного АФП матери, чХГ, неконъюгированного эстриола и ингибина-А.

Принцип метода

Технология, применяемая в системе иммунорадиометрического количественного определения (IRMA), подразумевает использование двух высокоафинных моноклональных антител.

Сигнальное антитело, меченое ¹²⁵I, связано с эпитопом молекулы АФП, которая пространственно отличается от молекулы, распознаваемой биотин-связанным антителом.

Два антитела одновременно реагируют с антигеном, который присутствует в стандарте или в образце, что приводит к образованию комплекса связанное антитело – антиген – сигнальное антитело, которое также называется "сэндвич".

В течение 2 часового периода инкубирования при постоянном перемешивании иммуно-комплекс иммобилизуется на реактивной поверхности пробирок, покрытых стрептавидином. Затем реакционную смесь сливают, пробирки тщательно промывают и определяют их радиоактивность в гамма-счетчике.

Концентрация антигена прямо пропорциональна радиоактивности, измеренной в пробирках. Путем построения калибровочной кривой, в которой отражаются полученные значения в сравнении с серией калибраторов, содержащих известное количество АФП, может быть определена искомая концентрация АФП в образцах пациента.

Содержание набора

- 1 флакон МЕТКИ (21 мл), готовой к использованию, содержит около 740 кБк ¹²⁵I-анти-АФП и связанных анти-АФП в буфере с красным красителем и 0,1% NaN₃.
- 6 флаконов СТАНДАРТОВ (1 x 3.0 мл, 5 x 0.5 мл), содержащих (S1-S6) 0, 2, 10, 40, 150, 500 МЕ/мл АФП (ВОЗ 1st IRP 72/225) в бычьей сыворотке с 0,1% NaN₃. (1 МЕ/мл = 1.21 нг/мл)
- 1 флакон КОНТРОЛЬНОЙ СЫВОРОТКИ, 1,0 мл сыворотки крови человека с 0,1% NaN₃. Концентрация контрольной сыворотки указана в прилагаемом сертификате качества, который прилагается.
- 2 упаковки ПРОБИРОК С ПОКРЫТИЕМ, готовых к использованию. 2x50 пробирок, 12 x 75 мм, упакованных в пластиковые коробки.
- 1 флакон КОНЦЕНТРАТА ПРОМЫВОЧНОГО БУФЕРА (20 мл),

содержащего 0,2% NaN₃. *См. «Приготовление реактивов».* Сертификат качества Листок-вкладыш

Необходимые материалы, инструменты и оборудование

Штатив для пробирок, автоматические пипетки с одноразовыми наконечниками (50, 200 и 2000 мкл), дистиллированная вода, вихревой смеситель, шейкер, полиэтиленовая пленка, адсорбирующая ткань, гамма-счетчик.

Рекомендуемые инструменты и оборудование:

Градуированные пипетки, диспенсер с резервуаром 1 литр (вместо пипеток 2 мл).

Сбор и хранение образцов

Образцы сыворотки могут быть приготовлены в соответствии со стандартными процедурами, применяемыми в клинической лабораторной практике. Образцы можно хранить при температуре 2-8 °C в случае, если анализ будет проводиться в течение 24 часов. В иных случаях аликвоты должны приготавливаться и храниться в условиях глубокого замораживания (-20°C). Перед анализом образцы необходимо разморозить и тщательно перемешать. Запрещается использовать липемичные, гемолизированные и мутные образцы, так как они могут давать ложноотрицательные результаты. Следует избегать повторного замораживания / размораживания реактивов.

Если при начальном тестировании образец сыворотки содержит более чем 500 МЕ/мл АФП, то образец можно разбавить в 10 раз стандартом S1 и провести исследование еще раз согласно описанию, приведенному в разделе «Процедура количественного определения».

Приготовление и хранение реактивов

Для того, чтобы получить 720 мл промывочного раствора, добавьте концентрат промывочного буфера (20 мл) к 700 мл дистиллированной воды. Разбавленный раствор можно хранить при температуре 2-8 °C до истечения срока годности набора.

После открывания реактивы следует хранить при температуре от 2 °C до 8 °C. При такой температуре каждый реактив остается стабильным до истечения срока годности набора. Фактический срок годности указан на упаковке и в сертификате качества.

ВНИМАНИЕ!

Необходимо уравновесить все реактивы и образцы сыворотки до

комнатной температуры. Перед использованием следует тщательно перемешать все реактивы и образцы. Избегайте чрезмерного пенообразования.

Процедура количественного определения
(Краткое описание см. в Таблице 1.)

1. Промаркируйте в двух экземплярах пробирки с покрытием для каждого стандарта (S1-S6), контрольной сыворотки и образцов.
2. Путем аккуратного перемешивания гомогенизируйте все реактивы и образцы, при этом избегайте пенообразования.
3. С помощью пипетки поместите по 50 мкл стандартов, контроля и образцов в предварительно промаркированные пробирки. Пробирок должны быть установлены в штативе. Не трогайте и не царапайте наконечником пипетки внутреннюю поверхность пробирок.
4. С помощью пипетки поместите в каждую пробирку по 200 мкл метки.
5. Запечатайте все пробирки полиэтиленовой пленкой. Прочно зафиксируйте штатив на шейкере. Включите шейкер и установите необходимую скорость с тем, чтобы жидкость постоянно вращалась или перемешивалась в каждой пробирке.
6. Проводите инкубирование пробирок в течение 2 часов при комнатной температуре и непрерывном перемешивании.
7. Добавьте в каждую пробирку по 2,0 мл разбавленного промывочного буфера. Слейте супернатант из всех пробирок путем переворачивания штатива. Поместите штатив на фильтровальную бумагу в перевернутом состоянии на 2 минуты.
8. Верните штатив в первоначальное положение и повторите этап 7 еще два раза.
9. Подсчитайте радиоактивность каждой пробирки в гамма-счетчике в течение как минимум 60 секунд. Рассчитайте концентрацию АФП в образце так, как это описано в разделе «Расчет результатов».

Таблица 1. Протокол исследования, методика введения
(все объемы представлены в микролитрах)

Пробирки	Всего	Стандарт	Контроль	Образец
Стандарт		50		
Контроль			50	
Образец				50
Метка	200	200	200	200
Перемешивайте в течение 2 часов при комнатной температуре				

Промывочный буфер		2000	2000	2000
Слейте жидкость и высушите пробирки на фильтровальной бумаге				
Промывочный буфер		2000	2000	2000
Слейте жидкость и высушите пробирки на фильтровальной бумаге				
Промывочный буфер		2000	2000	2000
Слейте жидкость и высушите пробирки на фильтровальной бумаге				
Подсчитайте радиоактивность (60 сек/пробирка)				
Рассчитайте результаты				

Расчет результатов

Расчет результатов проиллюстрирован с использованием репрезентативных данных. Полученные данные должны быть схожими с данными, представленными в Таблице 2. Рассчитайте среднее значение радиоактивности в минуту (срм) для каждой из пар анализируемых пробирок. Рассчитайте нормализованное процентное связывание для каждого стандарта, контроля и образца, соответственно, с использованием следующей формулы:

$$V/T(\%) = \frac{S_{2-6} / C / M_x (\text{срм}) - S_1 (\text{срм})}{T(\text{срм})} \times 100$$

Используя полулогарифмическую графическую бумагу, постройте калибровочную кривую, откладывая рассчитанные значения V/T (%) для каждого стандарта по одной оси и соответствующие им концентрации АФП по другой.

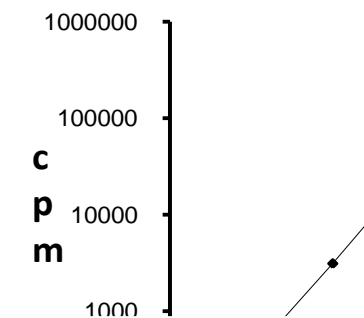


Рис 1. Типичная калибровочная кривая (Не используйте для расчета значений образца!)

Таблица 2. Типичные данные количественного определения

Пробирки	Количество срм	Среднее срм	V/T%
T	257181	257042	-

	256904		
S1	65 87	76	0.03
S2	771 747	759	0.27
S3	3192 3221	3207	1.22
S4	12423 12282	12353	4.78
S5	44624 42117	43371	16.84
S6	116753 113293	115023	44.72
C	10683 10208	10445	4.03

Определите концентрацию АФП в неизвестном образце методом интерполяции по калибровочной кривой. Не экстраполируйте значения, лежащие вне диапазона концентраций калибровочной кривой. Из доступных компьютерных программ для обработки данных с целью аппроксимации могут использоваться логит-логарифмические и сплайновые методы. Также возможно применение методов автоматической обработки полученных данных.

Характеристика количественного определения

Чувствительность

По результатам 15 количественных определений нулевых стандартов значение аналитической чувствительности составило 0,06 МЕ/мл. Под чувствительностью понималась концентрация, соответствующая сумме среднего значения срм и удвоенной величины стандартного отклонения.

Эффект крючка

При концентрациях АФП до 8500 МЕ/мл высокодозный «эффект крючка» отсутствует.

Специфичность

В данном наборе IRMA используются моноклональные антитела, специфичные к АФП. Перекрестной реакции с человеческим альбумином не наблюдается.

Точность и воспроизводимость

Для определения внутрисубъектной вариабельности были проанализированы 8 контрольных образцов в 15 повторах. Для определения межсубъектной вариабельности образцы измерялись дважды в ходе 15 независимых анализов. Полученные значения приведены ниже.

Внутрисубъектная вариабельность	Межсубъектная вариабельность

Среднее значение (ЕД/мл)	Коэффициент вариации (%)	Среднее значение (ЕД/мл)	Коэффициент вариации (%)
8.04	3.2	7.46	3.9
14.90	3.0	15.21	3.1
24.97	2.8	25.21	2.3
32.07	2.1	31.79	4.6
47.49	2.2	49.38	3.3
55.71	2.7	57.87	3.6
69.34	3.3	71.85	2.8
177.45	2.4	178.64	4.0

Восстановление

Под восстановлением понимается измеренное увеличение в процентах от ожидаемого повышения пиков образцов сыворотки с известным количеством АФП. Среднее значение восстановления для 3 сывороток с АФП на 5 уровнях составило 98.13% с диапазоном от 92.37% до 104.39%.

Тест на разведение (линейность):

Проводилось измерение 5 образцов в серии разведений с нулевым стандартом. Ниже приведена формула для расчета измеренной концентрации (X) в зависимости от ожидаемой концентрации (Y), которая демонстрирует хорошую линейность:

$$y = 1.0645x + 0.0217 \quad R^2 = 0,998 \quad n = 25$$

Ожидаемые значения:

Рекомендуется, чтобы каждая лаборатория устанавливала собственный диапазон эталонных значений для своей популяции пациентов, так как они могут отличаться в различных лабораториях и различных регионах.

Здоровые мужчины: 0.47-5.39 МЕ/мл.

Здоровые женщины: 0.37-4.41 МЕ/мл.

Во втором триместре беременности:

Неделя беременности	N	1 KM (МЕ/мл)
14	22	23.25
15	1107	25.7
16	1019	29.1
17	137	32.4

Каждые три месяца значения КМ должны проверяться и, при необходимости, пересчитываться.

Примечания к методике

1) **Источник ошибки!** Пробирки, упакованные в пластиковые коробки, индивидуально не промаркированы. Необходимо следить за тем, чтобы эти пробирки не смешались с обычными пробирками для проведения исследований. Для минимизации риска не следует брать из пластиковой коробки больше пробирок, чем

необходимо для проведения исследования. Пробирки для количественного определения рекомендуются помечать маркером.

2) **Источник ошибки!** Для обеспечения эффективного вращения пробирки следует прочно закрепить в штативе. Никогда не используйте штативы с открытым отверстием. Неравномерное или неполное перемешивание может стать причиной низкого качества количественного определения.

3) **Добавление промывочного буфера.** Для добавления промывочного буфера рекомендуется использовать обычный лабораторный диспенсер с емкостью объемом 1 литр и гибкой трубкой. При отсутствии данного инструмента можно использовать шприц большого объема, присоединенный к градуированной пипетке.

Дополнительная информация

Не следует смешивать или заменять компоненты из различных партий или наборов разных производителей.

Меры предосторожности

Радиоактивность

Данный продукт содержит радиоактивный материал. Пользователь несет ответственность за соблюдение местных законов или правил, касающихся порядка использования радиоактивных материалов.

Биологическая опасность

Компоненты человеческой крови, использованные в наборе, были получены у здоровых доноров. Они были протестированы индивидуально с использованием утвержденных методов (иммуноферментный анализ). В результате проверки были получены отрицательные результаты на наличие антител к вирусу иммунодефицита человека (анти-ВИЧ-1/2), антител к вирусу гепатита С (анти-НСV), антитрепонемных антител и поверхностных антигенов вируса гепатита В (HBsAg). Следует всегда соблюдать осторожность при работе с человеческими образцами, предназначенными для тестирования диагностическими наборами. Даже если образец был протестирован, ни один метод не может гарантировать полного отсутствия инфекционных агентов. Следовательно, с образцами крови человека следует обращаться как с *потенциально инфекционно опасным материалом*.

Продукты животного происхождения, использованные в наборе, были получены у здоровых животных. Тем не менее с продуктами животного происхождения следует обращаться как

с *потенциально инфекционно опасным материалом*.









Химическая опасность

Компоненты содержат в качестве антибактериального агента азид натрия. При утилизации отходов их необходимо смывать большим количеством воды для предотвращения накопления взрывоопасных азидов металлов в системе водопровода. Общее содержание азидов в каждой упаковке составляет 67.5 мг.

Условия хранения и срок годности

Хранить при температуре 2-8°C

Срок годности: 60 дней с момента готовности.

	Срок годности		Контроль
	Номер партии		Стандарт
	Внимание, обратитесь к сопроводительным документам		Пробирка с покрытием
	Биологическая опасность		Метка
	Обратитесь к инструкции по использованию		Промывочный буфер
	Устройство для проведения диагностики in vitro		Температурный предел. Хранить при температуре 2-8°C
	Производитель		Радиоактивный материал
	Номер по каталогу		

CE 1011

Сайт: <http://www.izotop.hu>

Технический

immuno@izotop.hu

e-mail:

Коммерческий

commerce@izotop.hu

e-mail:

IZOTOP

INSTITUTE OF ISOTOPES Ltd.

1535 Budapest, Pf.: 851.

Тел.: +36-1-392-2577,

Факс: +36-1-395-9247

Версия: апрель 2016 г.

Приложение к инструкции по использованию наборов для оценки риска развития синдрома Дауна

Данный набор был валидирован для оценки риска развития Трисомии 21 с использованием следующих наборов и программного обеспечения:

Название набора / программного обеспечения	Код	Производитель
РАРР-А IRMA	RK-4 CT	Institute of Isotopes Ltd.
Свободный βчХГ IRMA	RK-820CT	Institute of Isotopes Ltd.
АФП IRMA	RK-800 CT	Institute of Isotopes Ltd.
чХГ RIA	RK-770 CT	Institute of Isotopes Ltd.
Неконъюгированный эстриол RIA	RK-3 CT	Institute of Isotopes Ltd.
Активный Ингибин-А ELISA	DSL-10-28100	DSL - Beckman Coulter
альфа – антенатальное скрининговое программное обеспечение для выявления синдрома Дауна и дефектов нервной трубки		Logical Medical Systems Ltd.
<i>Указанные выше наборы и программное обеспечение промаркированы CE. Они могут использоваться в комплексе для оценки риска развития трисомии 21, в соответствии с директивой 98/79 EC IVD, а также на основании оценки соответствия, проведенной авторизованным уполномоченным органом (CE1011).</i>		

Пересмотренные результаты валидации, связанные с эффективностью оценки риска:

Чувствительность

Метод скрининга	Количество проведенных тестов	Положительные случаи по результатам теста		Случаи, подтвержденные цитогенетическим тестом		Ложноположительные случаи	
		№.	%	№.	% от положительных тестов	№.	%
Комбинированный тест	1389	42	3,02	2	4,76	40	2,88
Четвертной тест	539	30	5,57	1	3,33	29	5,38
Интегрированный тест	1741	47	2,70	3	6,38	44	2,53

Специфичность

Метод скрининга	Количество проведенных тестов	Отрицательные случаи	Отрицательные случаи по результатам теста		Ложноотрицательные случаи
			№.	%	
Комбинированный тест	1389	1387	1345	96,97	1 (0,07)
Четвертной тест	539	538	508	94,42	0
Интегрированный тест	1741	1738	1691	97,30	0

Литература: см. www.izotop.hu

CE₁₀₁₁

Сайт: <http://www.izotop.hu>

Технический e-mail: immuno@izotop.hu

Коммерческий e-mail: commerce@izotop.hu



INSTITUTE OF ISOTOPES Ltd.

1535 Budapest, Pf.: 851.

Тел.: +36-1-392-2577,

Факс: +36-1-395-9247