

НАБІР ІФА

ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ АЛЬФА-ФЕТОПРОТЕЇНУ (AFP)

1925-300, Alpha-Fetoprotein (AFP) Test System

Каталог. №: 1925-300

Кількість : 96

Виробник : Monobind Inc., (США)

Методика від 19-07-2019

Версія 7



Основною при проведенні аналізу є оригінал інструкції англійською мовою, вкладеної в набір. Номер і дата версії оригіналу та перекладу інструкції повинні співпадати.

1.0 ВСТУП

Призначення: Кількісне визначення концентрації альфа-фетопротеїнів (AFP) в сироватці людини за допомогою мікропланшетного ферментного імуноаналізу, колориметричний.

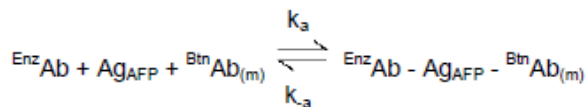
2.0 РЕЗЮМЕ І ПОЯСНЕННЯ ТЕСТУ (Див. оригінал інструкції).

3.0 ПРИНЦИП

Імуноферментний аналіз (ТИП 3)

Найважливіші реагенти, необхідні для проведення імуноферментного аналізу, включають антитіла високої спорідненості та специфічності (ферментні та іммобілізовані), з різним та виразним розпізнаванням епітопу, **в надлишку**, та нативний антиген. У цій процедурі іммобілізація відбувається під час аналізу на поверхні лунки мікропластини через взаємодію стрептавідину, нанесеного в лунці, та екзогенно доданого біотинильованого моноклонального анти-AFP-антитіла.

Після змішування моноклонального біотинильованого антитіла, антитіла, міченого ферментом і сироватки, що містить нативний антиген, відбувається реакція між нативним антигеном та антитілами, без конкуренції або стеричних перешкод, утворюючи розчинний сендвіч-комплекс. Взаємодія ілюструється наступним рівнянням:



$\text{B}^{\text{tn}}\text{Ab}_{(\text{m})}$ = Біотинильовані моноклональні антитіла (надлишкова кількість)

Ag_{AFP} = Нативний антиген (змінна кількість)

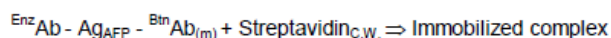
EnzAb = ферментно-мічене антитіло (надлишкова кількість)

$\text{EnzAb} - \text{Ag}_{\text{AFP}} - \text{B}^{\text{tn}}\text{Ab}_{(\text{m})}$ = Сендвіч-комплекс антиген-антитіло (змінна кількість)

k_a = Константа швидкості асоціації

k_{-a} = Константа швидкості дисоціації

Одночасно цей комплекс розміщується в лунці через реакцію високої афінності стрептавідину та біотинильованого антитіла. Ця взаємодія ілюструється нижче:



Стрептавідин_{C.W.} = Стрептавідин, нанесений в лунки

Іммобілізований комплекс = Імунний комплекс, зв'язаний з поверхнею лунок.

Після досягнення рівноваги фракція, пов'язана з антитілами, відділяється від не зв'язаних антигенів декантацією або промиванням. Активність ферменту у фракції пов'язаних антитіл прямо пропорційна концентрації нативного антигену. При використанні декількох стандартів з відомим значенням концентрації антигену будується калібрувальна крива, по якій обчислюється концентрація невідомих зразків.

4.0 РЕАГЕНТИ

Матеріали, що постачаються:

A. Калібратори AFP – 1 мл/флакон

Шість (6) флаконів референсних антигенів AFP рівнів 0 (A), 5 (B), 25 (C), 50 (D), 250 (E) та 500 (F) нг/мл. Зберігати при 2-8 °C. Додано консервант.

Зауваження: Калібратори на основі сироватки людини були калібровані за допомогою еталонного препарату, який аналізували проти 1-го IRP BOO3 № 72/225.

B. Ферментний реагент AFP – 13 мл/флакон

Один (1) флакон, що містить фермент-мічене антитіло, біотинильований моноклональний мишачий IgG у буфері, барвник та консервант. Зберігати при 2-8 °C.

C. Мікропланшет, покритий стрептавідином – 96 лунок

Один 96-луноквий мікропланшет, покритий стрептавідином і запакований в алюмінієву фольгу з осушувачем. Зберігати при 2-8 °C.

D. Концентрат розчину для промивання – 20 мл/флакон

Один флакон, що містить ПАВ в фосфатному сольовому буфері. Містить консервант. Зберігати при 2-8 °C.

E. Субстрат А – 7 мл/флакон

Один флакон, що містить ТМБ в буфері. Зберігати при 2-8 °C.

F. Субстрат В – 7 мл/флакон

Один флакон, що містить перекис водню в буфері. Зберігати при 2-8 °C.

G. Стоп-розчин – 8 мл/флакон

Один флакон, що містить сильну кислоту (1N HCl). Зберігати при 2-8 °C.

H. Інструкція

Зауваження 1: Не використовуйте реагенти після закінчення терміну придатності.

Зауваження 2: Відкриті реагенти стабільні 60 днів при зберіганні від 2 до 8 °C. Стабільність набору і компонентів вказана на етикетці.

Зауваження 3: Всі реагенти призначені для формату одного 96-луноквого планшета.

4.1 Необхідні матеріали, які не поставляються з набором

1. Мікродозатори на 0.025 та 0.050 мл (25 і 50 мкл) з точністю не гірше 1.5%.
2. Диспенсери на 0.100 та 350 мл (100 і 350 мкл) з точністю не гірше 1.5%.
3. Мікропланшетний вошер або дозаторна пляшка (опційно).
4. Мікропланшетний рідер з фільтрами 450 нм і 620 нм.
5. Фільтрувальний папір для висушування мікролунок.
6. Пластикові плівки або кришки для інкубування мікропланшетів.
7. Вакуумний аспіратор для промивання (опційно).
8. Таймер.
9. Контрольні матеріали.

5.0 ЗАУВАЖЕННЯ ТА ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

**Набір призначений тільки для діагностики in-vitro
Не для внутрішнього або зовнішнього використання
на людях або тваринах**

Використовувана для виготовлення компонентів набору людська сироватка протестована методами, схваленими FDA, в яких отримані негативні результати на наявність антитіл до ВІЛ 1 та 2, HCV і поверхневого антигену гепатиту В. Однак, оскільки не існує методів, що дають повну гарантію відсутності інфекційних агентів, з реагентами слід поводитися з обережністю, як з потенційно небезпечним біоматеріалом, що рекомендується для будь-яких зразків крові згідно правил кваліфікованої лабораторної практики. Рекомендації дивіться в національних посібниках з біобезпеки або антикоагулянтів. Дозвольте крові згорнутися. Для відділення сироватки використовуйте центрифугу.

Безпечна утилізація компонентів набору повинна проводитися відповідно до місцевих нормативно-законодавчих вимог.

6. ЗБІР І ЗБЕРІГАННЯ ЗРАЗКІВ

Зразками служить сироватка крові, за типом, дотримуватися звичайних запобіжних заходів при заборі зразків венепункцією. Для порівняння нормальних значень повинна бути отримана ранкова сироватка (натще). Кров слід збирати в пробірки з червоним маркуванням без добавок або антикоагулянтів. Дозвольте крові згорнутися. Для відділення сироватки використовуйте центрифугу.

У пацієнтів, які отримують терапію високими дозами біотину (наприклад, > 5 мг/добу), не слід брати зразок до принаймні 8 годин після останнього введення біотину, бажано протягом ночі, щоб забезпечити пробу натще.

Зразки можуть зберігатися при 2-8 °С до 5 днів. Якщо зразки не можуть бути проаналізовані за цей час, вони можуть бути заморожені до -20 °С на період до 30 днів. Уникайте повторних циклів заморожування - відтавання. Для аналізу в дублях вимагається 0.050 мл зразка.

7.0 КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Кожна лабораторія повинна проводити аналіз контролю на рівні низького, нормального та підвищеного діапазону для контролю ефективності аналізу. Ці контролю повинні досліджуватися як невідомі зразки в кожній постановці аналізу. Повинні будуватися карти контролю якості для відстеження характеристик реагентів, що поставляються. Слід застосовувати прийнятні статистичні методи для встановлення відхилень. Значні відхилення від встановлених характеристик можуть свідчити про зміни в умовах експерименту або зниження якості реагентів набору. Для визначення причини змін повинні бути використані свіжі реагенти.

8.0 ПРИГОТУВАННЯ РЕАГЕНТІВ

1. Промивний буфер

Розбавте концентрат розчину для промивання до 1000 мл дистильованою або деіонізованою водою. Зберігайте при кімнатній температурі (2-30 °С) до 60 днів.

2. Робочий Субстратний розчин - Стабільний протягом одного (1) року
Змішайте Субстрати, виливши вміст бурштинового флакона з Субстратом А у прозорий флакон з Субстратом В. Закрийте прозорий флакон жовтою кришкою для легкої ідентифікації. Перемішайте суміш і підпишіть відповідно. Розчин зберігається при 2-8 °С.

Зауваження 1: Не використовуйте субстрат, якщо він придбав блакитне забарвлення.

Зауваження 2: Не використовувати забруднені реагенти, або реагенти, де спостерігається ріст бактерій.

9.0 ПРОТОКОЛ АНАЛІЗУ

Перед початком аналізу всі реагенти, стандарти і контролю повинні досягти кімнатної температури (20-27 °С).

****Процедура тестування повинна проводитись кваліфікованим фахівцем****

- Виберіть необхідну кількість лунок для зразків, стандартів і контролів для постановки в дублях. Поверніть невикористані смужки в алюмінієвий пакет і закрийте його. Зберігайте при 2-8 °С.
- Додайте піпеткою по 25 мкл стандартів, контролів та досліджуваних зразків у відповідні лунки.
- Додайте по 100 мкл Ферментного реагенту AFP у кожен лунку. Дуже важливо додавати всі реагенти на дно лунок.
- Змішуйте (див. Примітку) вміст мікропланшета протягом 20-30 секунд, поки не стане гомогенним.
- Струшуйте мікропланшет обережно протягом 20-30 секунд для перемішування і накрийте його.
- Інкубуйте 60 хвилин при кімнатній температурі.
- Видаліть вміст лунок декантациєю або аспірацією. Висушіть планшет на фільтрувальному папері, якщо використовувалася декантация.
- Додайте 350 мкл промивного буфера (див. розділ "Приготування реагентів") і видаліть його. Повторіть процедуру ще два рази (загальна кількість циклів промивки - 3). Для цієї процедури краще використовувати автоматичний або ручний вошер відповідно до інструкцій виробника приладів. Якщо використовується дозаторна пляшка, наповнити кожен лунку до верху (уникайте повітряних бульбашок). Видаліть вміст і повторіть ще 2 рази.
- Додайте по 100 мкл Робочого розчину субстрату в кожен лунку (див. "Приготування реагентів"). Завжди додавайте реагенти в одній і тій же послідовності і з однаковою швидкістю, щоб уникнути відмінностей у часі реакції в різних лунках.

НЕ СТРУШУЙТЕ ПЛАНШЕТ ПІСЛЯ ДОДАВАННЯ СУБСТРАТУ

- Інкубуйте 15 хвилин при кімнатній температурі.
- Зупиніть розвиток забарвлення додаванням в кожен лунку 50 мкл стоп-розчину і перемішайте протягом 15-20 секунд. Завжди додавайте реагенти в одній і тій же послідовності і з однаковою швидкістю, щоб уникнути відмінностей у часі реакції в різних лунках.
- Виміряйте величини поглинання вмісту лунок на довжині хвилі 450 нм (вимірювання проводити при референсній довжині хвилі 620-630 нм). Виміри повинні бути проведені протягом 30 хвилин після додавання стоп-розчину.

Примітка: Цикл (початок і зупинка) змішування (4 цикли) протягом 5-8 секунд/цикл є більш ефективним, ніж один безперервний (20-30 секунд) цикл для досягнення однорідності. Для виконання циклу змішування можна використовувати змішувач для планшета.

10.0 РЕЗУЛЬТАТИ

Для визначення концентрації АФП в невідомих зразках використовується калібрувальна крива.

- Запишіть значення оптичної щільності для всіх лунок як показано в прикладі 1.
- Для побудови калібрувальної кривої на лінійному графічному папері використовуйте кожен з двох оптичних густин для кожного стандарту залежно від концентрації АФП в нг/мл (не розраховуйте середнього значення до побудови).
- Проведіть оптимальну калібрувальну криву.
- Щоб визначити концентрацію АФП для невідомого, відкладіть середню абсорбцію дублікатів для кожного невідомого на вертикальній осі графіка, знайдіть точку перетину на кривій і прочитайте концентрацію (в нг/мл) з горизонтальної осі графіка (дублікати невідомого можуть бути усереднені, як зазначено). У наступному прикладі середня абсорбція (0.420) перетинає криву реакції дози при концентрації АФП 33.2 нг / мл (Див. Малюнок 1).

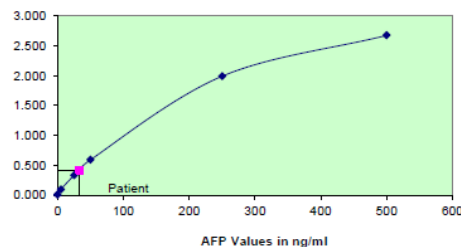
Примітка: Програмне забезпечення може також бути використане для перетворення даних. Якщо таке програмне забезпечення використовується, перевірка програмного забезпечення повинна бути проведена.

Приклад 1

Зразок	Лунка	Абсорбція (А)	Середнє абсорбції (В)	Концентрація (нг/мл)
Калібратор А	A1	0.012	0.011	0
	B1	0.011		
Калібратор В	C1	0.100	0.098	5
	D1	0.097		
Калібратор С	E1	0.336	0.335	25
	F1	0.333		
Калібратор D	G1	0.612	0.594	50
	H1	0.577		
Калібратор E	A2	2.005	1.990	250
	B2	1.975		
Калібратор F	C2	2.664	2.672	500
	D2	2.680		
Зразок	E2	0.427	0.420	33.2
	F2	0.413		

*Дані наведені в прикладі 1 тільки для ілюстрації і **не повинні використовуватися** для побудови стандартної кривої.

Малюнок 1



11.0 ПАРАМЕТРИ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ

Результати аналізу можна вважати достовірними, якщо дотримуються наступні умови:

- Оптична щільність Калібратора «F» повинна бути ≥ 1.8
- Оптична щільність Калібратора «A» повинна бути ≤ 0.035
- Чотири з шести контролів якості повинні укладатися у встановлені інтервали.

12.0 АНАЛІЗ РИЗИКІВ

Форма MSDS та аналізу ризиків для цього продукту доступна за запитом від Monobind Inc.

12.1. Якість роботи набору

- Для відтворюваності результатів важливо, щоб час реакції підтримувався постійним в кожній лунці.
- Піпетування зразків не повинно перевищувати 10 хвилин.
- Не використовувати високо ліпемічні, гемолізовані або забруднені зразки.
- Якщо використовується більше, ніж один планшет, рекомендується повторювати калібрувальну криву.
- Додавання субстратного розчину ініціює кінетичну реакцію, яка зупиняється при додаванні стоп-розчину. Отже, додавання субстрату і стоп-розчину повинно проводитися в однаковій послідовності для усунення відмінностей у часі реакції в різних лунках.
- Вимірювання оптичної щільності на рідері проходить вертикально. Не торкайтеся до дна мікролунок.
- Погана промивка лунок (неповне видалення розчину під час аспірації) може призводити до невідтворюваних і недостовірних результатів.
- Використовуйте компоненти тільки з одного лота. Не змішуйте реагенти з різних партій.
- Зразки з концентраціями АФП понад 500 нг/мл необхідно розвести (наприклад, 1:10 або вище) нормальною чоловічою сироваткою (АФП < 10 нг/мл) і проаналізувати повторно. Результат помножити на фактор розведення.
- Правильне і точне піпетування, а також дотримання точного часу і температурних вимог є необхідними умовами. Будь-які відхилення від встановлених Monobind можуть давати невірні результати.
- Дотримуватись всіх встановлених норм роботи лабораторної практики для забезпечення нормальної роботи пристрою.
- Важливим є калібрування всього обладнання, тобто, піпеток, рідера, вошера та/або автоматизованих інструментів, які використовуються з даним пристроєм. Також обов'язковим є належний догляд і обслуговування пристрою.
- Аналіз ризиків для даного пристрою може бути наданий Monobind.

12.2 Інтерпретація результатів

- Вимірювання та інтерпретація результатів повинні проводитись досвідченими професіоналами.**
- Лабораторні результати не можуть бути єдиним критерієм для визначення лікування, особливо, якщо отримані результати не співпадають з іншими дослідженнями.
- Реагенти для процедур тестової системи були розроблені для усунення максимальних перешкод; однак, потенційна взаємодія між рідкісними зразками сироватки та випробувальними реагентами може призвести до помилкових результатів. Гетерофільні антитіла часто викликають ці взаємодії і, як відомо, є проблемами для всіх видів імунологічних аналізів (Boscato LM, Stuart MC. "Гетерофільні антитіла: Проблема для всіх імунологічних аналізів" *Clin.Chem.* 1988: 3427-33). Для діагностичних цілей результати цього аналізу повинні використовуватися в комбінації з клінічним оглядом, історією хвороби та всіма іншими клінічними висновками.
- Для отримання дійсних результатів адекватні контролю та інші параметри повинні знаходитися в межах встановлених норм.
- Monobind не несе відповідальності за результати тесту в разі, якщо складові набору були замінені іншими складовими з інших наборів, або якщо результати були інтерпретовані невірно.
- Якщо для обробки результатів тесту використовується комп'ютер, то розраховані значення стандартів не повинні відхилятися більш, ніж на 10% від приписаних значень концентрації.
- АФП має низьку клінічну чутливість і специфічність як раковий маркер. **Само по собі значення АФП не є діагностичною величиною** і повинно використовуватися разом з іншими клінічними даними. Відомо, що рівень АФП підвищений у ряді доброякісних захворювань та умов, включаючи вагітність та не-злоякісні захворювання печінки, такі як гепатити та цироз печінки.

13.0 ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ

Приблизно 97-98% нормального здорового населення мають рівні АФП менше 8.5 нг/мл. У пацієнтів групи ризику значення АФП між 100 і 350 нг/мл припускають наявність гепатоцелюлярної карциноми. Концентрації вище 350 нг/мл зазвичай свідчать про наявність захворювання.

ТАБЛИЦЯ 1
Очікувані значення для тесту АФП

Чоловіки та жінки < 8.5 нг/мл (97-98 %)

Важливо мати на увазі, що встановлений діапазон значень, який можна очікувати у даній популяції "нормальних" людей з використанням даного методу, залежить від безлічі факторів: специфічності методу, популяції, яка тестується, і точності методу в руках лаборанта. З цих причин кожна лабораторія повинна встановити свій власний діапазон нормальних значень.

14.0 ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРУ

14.1 Точність

Точність набору АФП всередині серії і між серіями визначалася в аналізі пулів сироваток трьох різних рівнів. Кількість (N), середнє значення (x), стандартне відхилення (δ) і коефіцієнт варіації (C.V.) для цих сироваток наведені в таблицях 2 і 3.

ТАБЛИЦЯ 2
Точність в аналізі (нг/мл)

Зразок	N	x	δ	C.V., %
Рівень 1	24	14.71	0.67	4.6
Рівень 2	24	71.89	2.68	3.7
Рівень 3	24	148.62	7.24	4.9

ТАБЛИЦЯ 3
Точність між аналізами* (нг/мл)

Зразок	N	x	δ	C.V., %
Рівень 1	30	16.20	1.41	8.7
Рівень 2	30	88.26	7.47	8.5
Рівень 3	30	188.43	11.92	6.3

*вимірювання проводились в 30 експериментах в дублях.

14.2 Чутливість

Тест-система AFP AccuBind® ELISA має чутливість 0.01 нг. Це еквівалентно зразку, що містить 0.44 нг/мл концентрації AFP. Чутливість (межа виявлення) визначалася шляхом визначення варіабельності калібратора «0 нг/мл» та використання статистики 2σ (95% точності) для обчислення мінімальної дози.

14.3 Точність

Справжній метод порівнювався з референсним методом. Використовувалися зразки в діапазоні 1.0-41 нг/мл з загальним числом 42. Було отримано рівняння лінійної регресії, і був розрахований коефіцієнт кореляції для АФП в порівнянні з референсним методом. Отримані дані наведені в таблиці 4.

ТАБЛИЦЯ 4

Метод	Середнє (x)	Рівняння регресії	Коефіцієнт кореляції
Даний метод	5.27	$y = 0.746(x) + 1.0007$	0.973
Метод порівняння	5.72		

Тільки незначна розбіжність даного методу і референс-методу була виявлена, що доводять близькі середні значення. Рівняння регресії і коефіцієнт кореляції показують прекрасну узгодженість методів.

14.4 Специфічність

Перехресні реакції антитіл до АФП з різними речовинами оцінювалися додаванням інтерферуючих речовин в сироватку в різних концентраціях. Крос-реактивність розраховувалася як відношення між дозою інтерферуючої речовини і дозою АФП, необхідного для заміщення цієї кількості речовини.

Речовина	Перехресна реактивність	Концентрація
Ацетилсаліцилова кислота	Не виявлено	100 мкг/мл
Аметоптерин	Не виявлено	100 мкг/мл
Аскорбінова кислота	Не виявлено	100 мкг/мл
Атропін	Не виявлено	100 мкг/мл
Кофеїн	Не виявлено	100 мкг/мл
СЕА	Не виявлено	10 мкг/мл
ПСА	Не виявлено	1.0 мкг/мл
СА-125	Не виявлено	10.000 Од/мл
ХГЛ	Не виявлено	1000 МОд/мл
ЛГ	Не виявлено	10 МОд/мл
ТТГ	Не виявлено	100 мМОд/мл
Пролактин	Не виявлено	100 мкг/мл

14.5 Лінійність та хук-ефект:

Для оцінки лінійності та хук-ефекту використовувались підготовки трьох різних лотів для реагентів тест-системи AFP AccuBind® ELISA. Масивні концентрації АФП (> 100 000 нг/мл) використовувалася для лінійних розчинів у пулованих сироватках пацієнтів.

Тест не показав хук-ефекту при концентраціях 10 000 нг/мл, з відновленням дози від 86.1 до 113.6%.



Monobind, Inc.
100 North Pointe Drive
Lake Forest, CA 92630

Tel: 949.951.2665 Fax: 949.951.3539 www.monobind.com



УПОВНОВАЖЕНИЙ ПРЕДСТАВНИК

ТОВ «ДІАМЕБ»
вул. Чорновола, 97
м. Івано-Франківськ, 76005
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com

