

НАБІР ІФА ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ α -ФЕТОПРОТЕЇНУ (АФП) В СИРОВАТЦІ

5101-16, AFP (Alpha Fetoprotein)

Каталог. №: 5101-16

Методика від 16-06-2008

Кількість : 96

Виробник : DAI, (США)



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

ПРИЗНАЧЕННЯ

Набір призначений для кількісного визначення концентрації АФП в сироватці людини.

ВСТУП

Альфа-фетопротейн (АФП) – глікопротеїн з молекулярною вагою близько 70 КД. АФП нормально виробляється в зародків і при народженні печінкою і частково шлунково-кишковим трактом. Після народження концентрація АФП в сироватці швидко зменшується і після другого року життя тільки невелика кількість нормально визначається в сироватці.

Ріст АФП до ненормального високого рівня виявлений при декількох злоякісних хворобах, найбільше при первинній гепатоцелюлярній карциномі, несеміноматозному тестикулярному раку. При несеміноматозному тестикулярному раку прямий зв'язок виявлений між стадією хвороби і рівнем АФП. Ріст рівня АФП також виявлений в пацієнтів з діагнозом семіноми з нонсеміноматичними елементами, але не в пацієнтів з легкою семіномою.

На додаток, ріст концентрації АФП виявлено в пацієнтів з нераковими захворюваннями, такими як гострий вірусний гепатит, хронічно активний гепатит і ін. Ріст рівня АФП також відбувається в вагітних жінок. Тому вимірювання АФП не рекомендується для визначення наявності пухлини в основної популяції.

ПРИНЦИП АНАЛІЗУ

Набір є твердофазовим ферментнозв'язаним імуносорбційним аналізом. Система аналізу використовує одне анти-АФП антитіло для іммобілізації солідної фази (мікропланшетні лунки) і інше мишає моноклональне анти-АФП антитіло в розчині антитіло-ензимного кон'югату (пероксидаза хрому). Тестовий зразок додається в покриті АФП антитілом лунки і інкубується з нульовим буфером. Якщо АФП присутній в зразку, він зв'язується з антитілом на лунці. Лунки потім промиваються для видалення залишків тестового зразка і додається АФП антитіло мічене кон'югатом пероксидази хрому. Кон'югат зв'язується з АФП в лунці, в результаті чого молекули АФП опиняються в сандвічі між солідною фазою і ензимно-зв'язаними антитілами. Після інкубації при кімнатній температурі, лунки промиваються водою для видалення незв'язаних мічених антитіл. Додається розчин ТМВ і інкубується 20 хв, в результаті відбувається розвиток голубого кольору. Розвиток кольору зупиняється додаванням стоп розчину, що змінює колір на жовтий і проводять спектрофотометричне вимірювання при 450 нм. Концентрація АФП прямо пропорційна інтенсивності кольору тестового зразку.

МАТЕРІАЛИ І КОМПОНЕНТИ

Матеріали, які постачаються з набором:

1. Мікропланшет покритий антитілом: 1 шт., 96 лунок.
2. Набір референтних стандартів АФП. Містить 0, 5, 20, 50, 150 і 300 нг/мл.
3. Реагент ферментного кон'югату, 18 мл.
4. ТМВ субстрат, 12 мл.
5. Стоп-розчин, 12 мл.
6. Концентрат промивного розчину (50x), 15 мл.

Матеріали, що вимагаються, але не постачаються:

1. Точні мікропіпетки: 0,0 мл, 0,04 \approx 0,2 мл.
2. Змінні наконечники до піпеток.
3. Дистильована вода.
4. Вортекс або його еквівалент.
5. Промокальний папір або паперовий рушничок.
6. Графічний папір.
7. Мікропланшетний зчитувач.

ЗБІР ТА ПРИГОТУВАННЯ ВЗІРЦІВ

Сироватка отримується з крові за звичайною технологією. Даний набір тільки для використання з зразками сироватки без будь-яких добавок.

ЗБЕРІГАННЯ НАБОРІВ ТА ІНСТРУМЕНТАРІЮ

Набір повинен зберігатися при температурі 2-8 °С і бути використаним до дати закінчення терміну, вказаній на зовнішній поверхні. Планшетка повинна зберігатися в пакеті з десіккантом для мінімізації впливу вологого повітря. Після відкриття набір залишиться стабільним до дати придатності, якщо він зберігається, як описано вище.

Можна використовувати фотометр з шириною доріжки 10 нм чи менше і межами оптичної щільності 0-2 ОЩ чи більше при 450 нм.

ПРИГОТУВАННЯ РЕАГЕНТІВ

1. Всі реагенти повинні бути приведені до кімнат. температури перед використанням (18-25 °С).
2. Розбавити 1 частину промивного буферу (50x) 49 частинами дистильованої води. Наприклад, розбавте 15 мл концентрату промивного буферу (50x) в дистильованій воді, щоб приготувати 750 мл промивного буферу (1x). Перед використанням добре змішайте.

ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

1. Відділіть необхідну кількість лунок;
2. Додайте **20 мкл** стандарту, зразків і контролів в відповідні лунки.
3. Внесіть **100 мкл** нульового буферу в кожну лунку.
4. Ретельно змішайте **10 сек.** Дуже важливо добитись повного змішування на цьому етапі.
5. Інкубуйте при кімнатній температурі (18-25°С) **30 хв.**
6. Видаліть інкубаційний розчин струшуванням над контейнером для відходів.
7. Промийте і струсіть лунки **5 разів** промивним розчином (1x).
8. Переверніть планшет на промокальний папір для видалення залишків води.
9. Додайте **150 мкл** реагенту ензимного кон'югату в кожну лунку. Обережно змішуйте **5 секунд.**
10. Інкубуйте при кімнатній температурі **30 хв.**
11. Видаліть інкубаційний розчин струшуванням планшетки над раковиною.
12. Промийте і струсіть мікропланшет **5 разів** промивним розчином (1x).
13. Переверніть планшетку на абсорбуючий папір для видалення залишків води.
14. Додайте **100 мкл** ТМВ реагенту в кожну лунку. Обережно змішуйте **5 секунд.**
15. Інкубуйте при кімнатній температурі **20 хв.**
16. Зупиніть реакцію, додаванням **100 мкл** Стоп розчину в кожну лунку.
17. Обережно змішуйте **30 сек.** Важливо, щоб весь голубий колір змінився на жовтий.
18. Зчитайте оптичну щільність при 450 нм мікротитрувальним зчитувачем протягом **15 хв.**

Важливі примітки:

Процедура промивання є надзвичайно важливою. Неточне промивання приведе до помилково завищених зчитувань абсорбції.

ВИЗНАЧЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Підрахуйте значення середньої абсорбції (A450) для кожного набору стандартів, контролю і зразків. Побудуйте стандартну криву, відкладаючи середню абсорбцію кожного стандарту проти його концентрації в нг/мл на графічному папері, з абсорбцією на вертикальній осі (Y) і концентрацією на горизонтальній осі (X). Використовуючи значення середньої абсорбції для кожного зразку, визначте відповідну концентрацію АФП в нг/мл з стандартної кривої.

ПРИКЛАД СТАНДАРТНОЇ КРИВОЇ

Результати типового стандартного тесту з оптичною густиною зчитаної при 450 нм показана на осі Y проти концентрації АФП показана на осі X. Дана крива тільки для ілюстрації і не може бути використана для знаходження невідомих. Кожний користувач повинен отримати власні дані і стандартну криву.

АФП (нг/мл)	Абсорбція (450 нм)
0	0,012
5	0,127
20	0,455
50	0,952
150	2,150
300	2,932

(Приклад калібрувальної кривої див. в оригіналі інструкції).

ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ І ЧУТЛИВІСТЬ

В пацієнтів з високим ризиком, значення АФП між 100 і 350 нг/мл передбачається діагноз гепатоцелюлярної карциноми, а рівень більше 350 нг/мл зазвичай визначає дану хворобу. Близько 97% здорових суб'єктів мають рівень АФП менше ніж 8.5 нг/мл. Рекомендовано, щоб кожна лабораторія встановлювала свої нормальні межі. Мінімальний рівень визначення концентрації АФП у цьому тесті становить 2,0 нг/мл.



ОФІЦІЙНИЙ ДИСТРИБ'ЮТОР

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