



Набір ІФА для визначення в сироватці людини А-ФЕТОПРОТЕЇНУ (АФП)

Каталог. № : KP20IW
Кількість : 96
Виробник : Radim (Італія)

Методика від 10-2003
Версія 5

Увага: основою при проведенні дослідження є оригінал інструкції.

ТОЛЬКО ДЛЯ ДИАГНОСТИЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ IN VITRO

ПРИНЦИП ДОСЛІДЖЕННЯ

Даний набір базується на імуноферментометричному аналізі (EIMA). В ньому використовуються два різні моноклональні антитіла до АФП, одними покриті лунок, а інші кон'юговані до пероксидази хрому (HRPO). Впродовж інкубації АФП в калібраторах і зразках водночас зв'язується з двома моноклонами, утворюючи комплекс «сандвіч». Після цієї інкубації весь незв'язаний матеріал видаляється циклом аспірації/промивання. Залишкова ферментативна активність в лунках прямо пропорційна концентрації АФП в калібраторах і зразках, та відображатиметься при інкубації твердої фази з розчином хромогену (ТМБ) в субстратному буфері. Колориметричне зчитування здійснюється за допомогою спектрофотометра при 450 нм.

РЕАГЕНТИ, ЩО ПОСТАЧАЮТЬСЯ В НАБОРІ: ПРИГОТУВАННЯ ТА СТАБІЛЬНІСТЬ

- реагентів достатньо для 96 лунок
- зберігати набір при 2-8°C
- термін придатності кожного реагента вказаний на етикетці флакону.

- Покритий мікропланшет:** 96 лунок, покритих моноклональними антитілами до АФП. Невикористані лунок необхідно зберігати при 2-8°C в наявному поліетиленовому пакеті та герметично закритими.
 - Калібратори:** 7 фл. АФП в основі сироватки, ліофілізовані. Концентрації: 0, 10, 20, 50, 100, 200 та 400 нг/мл. Консервант: неоміцин. Калібратори були перевірені відповідно до 1-ї Міжнародної підготовки стандартів АФП ВООЗ 72/225 (1 нг = 0,92 МО). Розвести калібратори 1 мл дистильованої води. Після розведення зберігати при 2-8°C впродовж 7-10 днів; для довшого зберігання слід заморозити до -20°C.
ПРИМІТКА: див. листок сертифікату якості за більш точними даними по концентраціях.
 - Ферментний трейсер:** 2 фл. (12 мл) моноклональних антитіл до АФП, кон'югованого пероксидазою хрому (HRPO) в Tris HCl, BSA та стабілізаторах. Консервант: неоміцин та тімеросал (<0,05%). Готовий до використання.
 - Контрольна сироватка:** 1 фл. АФП в основі сироватки. Ліофілізована. Консерванти: неоміцин. Розвести 1 мл дистильованої води. Після розведення зберігати при 2-8°C 7-10 днів; для довшого зберігання заморозити до -20°C.
ПРИМІТКА: див. листок сертифікату якості за більш точними даними по концентраціях.
 - Розчинник зразків:** 1 фл. (10 мл) Tris-HCl та BSA. Консервант: неоміцин та тімеросал (<0,05%). Готовий до використання.
 - Промивний розчин (концентрований):** 1 фл. (50 мл) PBS і Tween 20. Консервант: тімеросал (<0,05%). Розвести вміст флакону дистильованою водою до 500 мл. У випадку нерозчинних кристалів, обробіть розчин, помістивши флакон на декілька хвилин в інкубатор при 37°C. Зберігати розведений промивний розчин при 2-8°C впродовж 1 місяця.
 - Хромоген:** 1 фл. (15 мл) ТМБ із цитрат-фосфатним буфером і DMSO. Рідкий. Готовий до використання.
 - Субстратний буфер:** 1 фл. (15 мл) цитрат-фосфатного буферу і H₂O₂. Рідкий. Готовий до використання.
ПРИМІТКА: в скляному посуді провести розведення 1+1 рівних порцій хромогену та субстратного буферу. Уникати прямого попадання світла впродовж 1 год. з часу приготування.
 - Блокуючий реагент:** 1 фл. (14 мл) N H₂SO₄. Готовий до використання.
- Адгезивна плівка для планшету
– Поліетиленовий пакет

МАТЕРІАЛИ, ЩО ВИМАГАЮТЬСЯ АЛЕ НЕ ПОСТАЧАЮТЬСЯ

- Регульовані, автоматичні мікро піпетки зі змінними насадками.
- Мірна колба.
- Мікропланшетний струшувач на 1200 об/хв..
- Помпа для аспірації або автоматизований пристрій для промивки лунок.
- Мікропланшетний спектрофотометр з абсорбцією в межах 0-3,0 А інтервалу при 450 нм.
- Міліметровий графічний папір.
- Дистильована вода.

АВТОМАТИЗОВАНИЙ АНАЛІЗ

- даний аналіз може бути проведений з використанням автоматизованого апарату для ELISA наборів на мікро планшетах.
- Виробник гарантує використання даного набору в автоматизованих апаратах компанії RADIM і/або SEAC.
- При використанні інших автоматизованих мікропланшетних апаратів, відповідальність за правильність аналізів ELISA наборів у них несе користувач.

ПОПЕРЕДЖЕННЯ та ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

- Не змішуйте реагенти різних партій.
- Не використовуйте реагенти після закінчення терміну придатності.
- використовуйте ретельно очищений лабораторний посуд, вільний від забруднення іонами металів або окислюючі речовин.
- Використовуйте дистильовану воду, що зберігається в ретельно очищених емкостях.
- уникайте забруднення зразків. З цієї метою для кожної Зразки та реагента використовуйте змінні насадки.
- Виконуйте чітко вимоги щодо інкубації як описано в розділі «Процедура аналізу».

Для того щоб уникнути особистого зараження та забруднення середовища, дотримуйтесь наступних застережень:

- Одягайте рукавиці при роботі зі зразками і реагентами. Мікробіологічне забруднення реагентів чи зразків може дати помилкові результати.

- Не розкапувайте ротом.
- Не їжте, не пийте, не курить і не користуйтеся косметикою в процесі аналізу.
- Методів, які б з остаточною впевненістю переконали, що такі інфекційні агенти як вірус гепатиту В, ВІЛ-вірус чи інші в компонентах набору відсутні не існує. Тому, зразки і матеріали треба вважати потенційно інфекційними і використовувати з відповідною обережністю.
- Уникайте розбризкування та утворення аерозолів. У їх випадку ретельно промийте 3% розчином гіпохлориту натрію. Будь-який очищуючий матеріал такого складу слід вважати потенційно інфекційним та дотримуватись вимог по його утилізації.

ЗАБІР ТА ПІДГОТОВКА ЗРАЗКІВ

Аналіз може проводитись на зразках сироватки. Високо ліпемічні або гемолізовані Зразки необхідно видалити. Зберігати при 2-8°C 1-2 дні. Для довшого зберігання Зразки повинні бути заморожені до -20°C. Уникати повторного розморожування/заморожування. Через дуже високу концентрацію АФП в фетальній сироватці, зразки навколоплідних вод, забруднених пуповинною кров'ю, можуть призвести до переоцінки результатів. Розбавте зразки амніотичної рідини розчином для розведення зразків наступним чином:

12 - 24 тиждень 1:50 1:250

25 - 36 тиждень 1:10 1:50

Сироватки вагітних жінок можуть досліджуватись нерозбавленим протягом всієї вагітності. Якщо очікуються рівні АФП вище 400 нг/мл, необхідно розвести зразки розчином для розведення зразків, з використанням того ж способу розведення для амніотичної рідини. При одночасному заборі материнської сироватки та амніотичної рідини необхідно здійснити забір сироватки перед амніотичною рідиною, так як амніоцентез викликає збільшення рівня АФП сироватки.

Зразки з патологічними значеннями ОФП (> 15 нг/мл) повинні бути належним чином розбавлені і підтверджені ще одним аналізом.

ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ*

- Доведіть всі реагенти та зразки до кімнатної температури.
 - Перед використанням перемішайте перевертаючи зразки.
1. Приготувати лунки для: бланку, калібраторів, контрольної сироватки і зразків.
 2. Розкапати у відповідні лунки по **20 мкл** кожного калібратора, контрольної сироватки і зразка.
 3. Розкапати в кожну лунку по **200 мкл** ферментного трейсера, крім лунки бланку.
 4. Накрити мікропланшет адгезивною плівкою (постачається в наборі) та легко змішати.
 5. Інкубувати лунки впродовж **30 хвилин** при кімнатній температурі на орбітальному струшувачі (1200 об/хв.).
 6. Зняти адгезивну плівку і ретельно аспірувати зі всіх лунок інкубаційну суміш.
 7. Промити лунки **4 рази 350 мкл** розведеного промивного розчину. Аспірувати всю рідину із лунок.
 8. Розкапати у всі лунки по **200 мкл** розчину хромогену-субстрату (див. розділ Реагенти);
 9. Інкубувати лунки впродовж **15 хвилин** при кімнатній температурі на орбітальному струшувачі (1200 об/хв.), уникати прямого попадання світла.
 10. Розкапати у всі лунки по **100 мкл** блокуючого реагенту.
 11. Зчитати абсорбцію лунок за допомогою біхроматичного спектрофотометра при **450** з референтною довжиною хвилі **620 нм** (налаштовуючи апарат на нуль лункою бланку). Зчитування необхідно завершити впродовж **1 год** після завершення аналізу.

*При використанні в процедурі автоматизованих апаратів компаній RADIM і/або SEAC, зсилайтесь на відповідні інструкції.

СХЕМА АНАЛІЗУ (Див. ст.. 23)

ОБЧИСЛЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Використовуючи автоматичні апарати SEAC і/або RADIM для мікропланшетів спектрофотометричне зчитування виконуватиметься автоматично при 3 різних довжинах хвилі: 450, 405 і 620 нм, таким чином розширюючи амплітуду кривої..

Вивести калібрувальну криву на міліметровому графічному папері, виводячи концентрації калібраторів' (вісь абсцис) проти абсорбції, отриманої для кожного калібратора (вісь ординат). Відповідні концентрації АФП в нг/мл отримуються шляхом інтерполяції абсорбції кожного зразка на калібрувальну криву; у випадку розведених зразків перемножити на фактор розведення.

ПРИКЛАД ОБЧИСЛЕННЯ

Нижчезказані значення слід розглядати в якості прикладу та не повинні використовуватися замість даних дослідження.

Опис	Абсорбція	АФП
Калібратор 0 нг/мл	0,015	
Калібратор 10 нг/мл	0,097	
Калібратор 20 нг/мл	0,195	
Калібратор 50 нг/мл	0,482	
Калібратор 100 нг/мл	0,824	
Калібратор 200 нг/мл	1,401	
Калібратор 400 нг/мл	2,210	
Зразок	0,812	97 нг/мл

ЗНАЧЕННЯ НОРМИ

Значення, вказані нижче, є орієнтовними. Рекомендується щоб кожна лабораторія встановлювала свій власний діапазон норми.

Значення норми були затверджені шляхом дослідження здорових і чоловіків і жінок.

Див. ст.. 18 в оригіналі інструкції.

Критерії достовірності

Перед початком проведення обчислення результатів переконайтеся, що концентрація контрольної сироватки знаходиться в межах вказаних в листку контролю якості.

ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛІЗУ

Специфічність

Даний метод не демонструє перехресної реактивності з жодними АФП-подібними речовинами.

Чутливість

Чутливість була визначена на основі калібрувальної кривої і виражена як мінімальна доза, вказуючи на значну різницю із нульовим калібратором (середн. значення + 3 СВ). Ця доза складає **1 нг/мл**.

Точність

Точність була оцінена виходячи із варіативності в межах процедури на між процедурами в 3 сироватках при різних концентраціях АФП.

В межах процедури (повторюваність)

Сироватка	Середн.	+/- (нг/мл)	СВ	КВ %	К-сть реплікатів
A	22,0		0,8	3,6	10
B	175,0		7,1	4,0	10
C	245,0		8,0	3,3	10

Між процедурами (відтворюваність)

Сироватка	Середн.	+/- (нг/мл)	СВ	КВ %	К-сть аналізів
A	21,8		1,2	5,5	10
B	110,4		1,9	1,8	10
C	241,7		9,3	3,8	10

Достовірність

Достовірність методу була перевірена тестами на відновлення та паралелізм.

Тест на відновлення

Відомі послідовні значення АФП були додані до об'єднання сироваток норми та досліджені.

Додано (нг/мл)	Очікувані (нг/мл)	Отримані (нг/мл)	Відновлення %
P	—	0,4	—
P + 200	200,4	199,0	99,3
P + 100	100,4	95,0	94,6
P + 50	50,4	48,0	95,2
P + 25	25,4	25,0	98,4

Дослідження на паралелізм

Дві сироватки з високими концентраціями АФП були розведені нульовим калібратором.

Розведення	Очікувані (нг/мл)	Отримані (нг/мл)
S2 нерозведений	---	124,0
1:2	62,0	61,0
1:4	31,0	30,0
1:8	15,5	15,0
S3 нерозведений	---	205,3
1:2	102,6	99,6
1:4	51,3	47,9
1:8	25,7	26,1

«Хук-ефект» високої дози

Кожного разу, коли зразки з дуже високими концентраціями антигена аналізуються нерозведеними в поетапному "сендвіч"- методі, як в цьому наборі, «хук-ефект» може дати значення концентрацій очевидно нижчі, ніж фактичні значення. В цьому наборі на спостерігається «хук-ефект» в концентрації до 45000 нг/мл.

ОБМЕЖЕННЯ ПРОЦЕДУРИ

Результати аналізу повинні ретельно інтерпретуватись і бути підтверджені клінічними оцінками і подальшими діагностичними дослідженнями.

ІНФОРМАЦІЯ ДЛЯ ЗАМОВЛЕННЯ:

ПМП «ДІАМЕБ»
 вул. Чорновола, 97, м.
 Івано-Франківськ, 76005
 тел.: (0342) 775122 факс: (0342) 775612
 E-mail: info@diameb.ua
www.diameb.ua