

НАБОР ИФА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АЛЬФА- ФЕТОПРОТЕИНА (АФП)

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

Каталог. № : 1925-300

Количество : 96

Производитель: **Monobind (США)**

Методика от 06-07-2012

Версия 3



Основой при проведении анализа является оригинал инструкции на английском языке, вложенной в набор. Номер и дата версии оригинала и перевода инструкции должны совпадать.

1.0 ВВЕДЕНИЕ

Назначение: количественное определение концентрации Альфа-Фетопroteина (АФП) в человеческой сыворотке.

2.0 ОБЪЯСНЕНИЕ ТЕСТА

гликопротеин с молекулярной массой около 70 KD. АФП. У эбрионов синтезируется в эмбриональной печени, желточном мешке и в меньшей степени в желудочно-кишечном тракте. Пик – 10 мг/мл достигается на 12-й неделе гестации (1). Этот пик постепенно снижается до величин менее чем 25 нг/мл через год после родов ниже 10 нг/мл в дальнейшем.

Высокие значения АФП находят у пациентов с первичным раком печени и герминогенными опухолями желточного мешка. АФП – эффективный маркер для диагностики и мониторинга гепатоцеллюлярной карциномы (2).

АФП также повышен у беременных женщин. Концентрация АФП выше нормальных значений у беременных является маркером риска рождения ребенка с синдромом Дауна (3).

В этом методе калибраторы АФП, образцы пациента или контроля сначала добавляются в микроячейки, покрытые стрептавидином. Затем добавляются биотинилированные моноклональные антитела и фермент-меченые антитела/ферментный конъюгат (специфичные против разных эпитопов АФП), и реагенты перемешиваются. Реакция между различными анти-АФП антителами и нативным АФП образует сэндвичевый комплекс, который связывается со стрептавидином в ячейках.

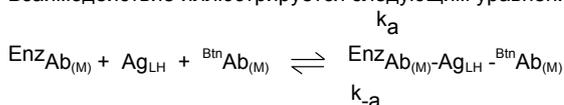
После завершения необходимого инкубационного периода связавшийся с ячейками ферментный конъюгат отделяют от несвязавшегося конъюгата промывкой. Активность фермента на поверхности ячеек измеряется реакцией с подходящим субстратом. Использование стандартов АФП с известными различными концентрациями позволяет построить калибровочную кривую. Концентрации АФП в неизвестных образцах находят по этой калибровочной кривой.

3.0 ПРИНЦИП МЕТОДА

Иммуноферментный анализа (тип 3)

Настоящие реагенты, необходимые для иммуноферментного определения, включают в избытке высокоаффинные и специфичные антитела (фермент-меченые и биотинилированные) для специфического распознавания различных эпитопов, и естественный антиген. В процессе анализа на поверхности микроячеек взаимодействуют сорбированный в ячейках стрептавидин и добавляемые биотинилированные анти-АФП антитела.

При смешивании биотинилированных анти-АФП моноклональных антител, ферментного конъюгата и сыворотки, содержащей естественный антиген, между нативным антигеном и антителами происходит реакция без конкуренции или пространственных затруднений с образованием растворимого сэндвич-комплекса. Взаимодействие иллюстрируется следующим уравнением:



$\text{B}^{in}\text{Ab}_{(M)}$ = биотинилированные моноклональные антитела (избыточное количество)

Ag_{LH} = нативный антиген (переменное количество)

$\text{EnzAb}_{(M)}$ = фермент-меченые моноклональные антитела (избыточное количество)

$\text{EnzAb}_{(M)}\text{-Ag}_{LH}\text{-B}^{in}\text{Ab}_{(M)}$ = сэндвичевый комплекс антиген-антитело

k_a = константа скорости ассоциации

k_{-a} = константа скорости диссоциации

Одновременно в ячейках образуется комплекс при реакции высокоаффинного взаимодействия стрептавидина и биотинилированных антител. Это взаимодействие иллюстрируется так:

$\text{EnzAb}_{(M)}\text{-Ag}_{LH}\text{-B}^{in}\text{Ab}_{(M)} + \text{стрептавидин}_{C.W.} \Rightarrow \text{имм. Комплекс стрептавидин}_{C.W.}$ = стрептавидин, иммобилизованный на ячейках
Имм.(обилизованный) комплекс = сэндвич-комплекс, связанный с твердой поверхностью.

После достижения равновесия фракция, связанная с антителами, отделяется от несвязавшихся антигенов декантацией или аспирацией и последующей промывкой. Активность фермента во фракции связанных антител прямо пропорциональна концентрации нативного антигена. При использовании нескольких стандартов с известным значением концентрации антигена строится калибровочная кривая, по которой вычисляется концентрация неизвестных образцов.

4.0 РЕАГЕНТЫ

Поставляемые материалы:

- A. Альфа-Фетопrotein (АФП) - 1 мл/флакон - значки A-F**
6 флаконов референсной сыворотки (стандартов) с концентрациями AFP 0 (A), 5 (B), 25 (C), 50 (D), 250 (E) и 500 (F) нг/мл. Хранить при 2-8°C. Содержат консерванты.
Замечание: Стандарты на основе человеческой сыворотки калиброваны по референс-препарату, исследованному по 1-му международному референс-препарату (IRP # 72/225).
- B. Ферментный Реагент Анти-AFP – 13 мл/флакон - значок E**
Один флакон, содержащий фермент-меченные антитела, биотинилированные моноклональные мышиные IgG специфические к AFP в буфере, краситель и консервант. Хранить при 2-8°C.
- C. Планшет, покрытый стрептавидином, 96 ячеек, значок J**
Один 96-луночный микропланшет, покрытый 1.0 мкг/мл стрептавидина и запаянный в алюминиевую фольгу с осушителем. Хранить при 2-8°C.
- D. Концентрат Буфера для промывок - 20 мл - значок K**
Один флакон, содержащий ПАВ в фосфатном солевом буфере. Содержит консервант. Хранить при 2-30°C.
- E. Субстрат A - 7 мл/флакон - значок S^A**
Один флакон, содержащий ТМБ в буфере. Хранить при 2-8°C.
- F. Субстрат B - 7 мл/флакон - значок S^B**
Один флакон, содержащий перекись водорода в буфере. Хранить при 2-8°C.
- G. Стоп-раствор -- 8.0 мл/флакон - значок STOP**
Один флакон, содержащий сильную кислоту (1N HCl). Хранить при 2-30°C.
- H. Инструкция к набору.**

Замечание 1: Не используйте реагенты с истекшим сроком годности.

Замечание 2: Открытые реагенты стабильны 60 дней при хранении от 2 до 8°C.

Замечание 3: Перечисленные реагенты для одного 96-луночного микропланшета.

4.1 Необходимые, но не поставляемые с набором материалы

1. Микродозатор на 25, 50 мкл с точностью не хуже 1.5%
2. Диспенсеры на 100 и 350 мкл с точностью не хуже 1.5%
3. Микропланшетный вошер или сжимаемая бутылка
4. Микропланшетный ридер с фильтрами 450 нм и 620 нм.
5. Фильтровальная бумага для высушивания лунок
6. Пластиковая пленка или крышка для инкубации микропланшета.
7. Вакуумный аспиратор (опционально) для промывок
8. Таймер
9. Контрольные материалы

5.0 ЗАМЕЧАНИЯ И ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

**Набор предназначен только для диагностики *in vitro*
Не для внутреннего или наружного использования на людях
или животных**

Потенциально опасный биоматериал. Используемая для изготовления компонентов набора человеческая сыворотка протестирована методами, одобренными FDA, в которых получены отрицательные результаты на наличие антител к ВИЧ 1 и 2, HCV и поверхностного антигена гепатита В. Однако, поскольку не существует методов, дающих полную гарантию отсутствия инфекционных агентов, с реагентами следует обращаться с

осторожностью, как с потенциально опасным биоматериалом, что рекомендуется для любых образцов крови согласно правилам квалифицированной лабораторной практики. Рекомендации смотрите в национальных руководствах по биобезопасности или, например, в "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories," 2nd Edition, 1988, HHS Publication No. (CDC) 88-8395.

6.0 СБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Образцами служат кровь, сыворотка. Должны соблюдаться обычные меры предосторожности. Для сопоставимого сравнения нормальных значений должна быть получена утренняя сыворотка (натощак). Кровь следует собирать в пробирки с красной маркировкой без добавок или антикоагулянтов. Для получения плазмы используйте пробирки с гепарином или ЭДТА. Позвольте крови свернуться. Для отделения сыворотки используйте центрифугу. Образцы могут храниться при 2-8 °C до 5 дней. Если образцы не могут быть проанализированы за это время, они могут быть заморожены до -20 °C на период до 30 дней. Избегайте повторных циклов замораживания - оттаивания. Для анализа в дублях требуется 0.050 мл образца.

7.0 КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Каждая лаборатория должна использовать контроли низкого, нормального и высокого уровней, для отслеживания характеристик набора. Эти контроли должны исследоваться как неизвестные образцы в каждой постановке анализа. Должны строиться карты контроля качества для отслеживания характеристик поставляемых реагентов. Следует применять приемлемые статистические методы для установления отклонений. Значительные отклонения от установленных характеристик могут свидетельствовать об изменениях в условиях эксперимента или разложении реагентов набора. Для определения причины изменений должны быть использованы свежие реагенты.

8.0 ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ.

1. Буфер для промывок

Разведите концентрат промывочного буфера в подходящем сосуде, до 1000 мл дистиллированной водой. Храните при комнатной температуре (2-30 °C) до 60 дней.

2. Рабочий субстратный раствор

Смешайте Субстраты, вылив содержимое коричневого флакона с Субстратом А во флакон Субстрат В. Закройте смесь желтой крышечкой для легкой идентификации. Перемешайте смесь и подпишите флакон «Рабочий раствор субстрата». Раствор хранится при 2-8 °C.

Замечание: не используйте рабочий раствор субстрата, если он приобрел голубую окраску.

9.0 ПРОТОКОЛ АНАЛИЗА

Перед началом анализа все реагенты, стандарты и контроли должны достичь комнатной температуры (20-27°C).

- Выберите необходимое количество лунок для образцов, стандартов и контролей для постановки в дублях. **Верните неиспользуемые стрипы в алюминиевый пакет и закройте его. Храните при 2-8 °C.**
- Добавьте по 0.025 мл (25 мкл) стандартов, контролей и исследуемых образцов в соответствующие лунки.
- Добавьте по 0.100 мл (100 мкл) рабочего раствора ферментного конъюгата в каждую лунку. **Важно вносить все реагенты близко ко дну лунок микропланшета.**
- Хорошо перемешайте микропланшет в течение 20-30 секунд.
- Инкубируйте 60 минут при комнатной температуре.
- Удалите содержимое ячеек декантацией или аспирацией. Высушите планшет на фильтровальной бумаге, если использовалась декантация.
- Добавьте 350 мкл буфера для промывок (см. раздел "Приготовление реагентов") и удалите его. Повторите процедуру еще два раза (общее количество циклов промывки - 3). Для этой процедуры лучше использовать автоматический или ручной вошер в соответствии с инструкциями производителя приборов (избегайте воздушных пузырьков).
- Добавьте по 100 мкл Рабочего раствора субстрата в каждую лунку (см. "Приготовление реагентов"). **Всегда добавляйте реагенты в одной и той же последовательности и с одинаковой скоростью, чтобы избежать различий во времени реакции в разных ячейках.**

НЕ ВСТРЯХИВАЙТЕ ПЛАНШЕТ ПОСЛЕ ДОБАВЛЕНИЯ СУБСТРАТА

- Инкубируйте 15 минут при комнатной температуре.
- Остановите развитие окраски добавлением в каждую ячейку 50 мкл стоп-раствора и перемешайте ячейки в течение 15-20 секунд. **Всегда добавляйте реагенты в одной и той же последовательности и с одинаковой скоростью, чтобы избежать различий во времени реакции в разных ячейках.**

- Измерьте величины поглощения содержимого ячеек на длине волны 450 нм (измерение проводите при референсной длине волны 620-630 нм). Измерения должны быть проведены в течение 30 минут после добавления стоп-раствора.

10.0 РЕЗУЛЬТАТЫ

Для определения концентрации AFP в неизвестных образцах используется калибровочная кривая.

- Запишите значения оптической плотности для всех ячеек как показано в примере 1.
- Для построения калибровочной кривой на линейной графической бумаге используйте каждую из двух оптических плотностей для каждого стандарта в зависимости от концентрации AFP в нг/мл (не рассчитывайте среднего значения до построения).
- Проведите оптимальную калибровочную кривую.
- Определите концентрации AFP в контролях и образцах, используя калибровочную кривую и средние значения оптической плотности для каждого образца. В приведенном ниже примере средняя абсорбция (0.420) пересекает стандартную кривую при 33.2 нг/мл (см. рис.1)

ПРИМЕР 1

Образец	Положение лунки	Абсорбция (A)	Среднее абсорбции (B)	Концентрация нг/мл
Калибратор А	A1	0.012	0.011	0
	B1	0.011		
Калибратор В	C1	0.100	0.098	5
	D1	0.097		
Калибратор С	E1	0.336	0.335	25
	F1	0.333		
Калибратор D	G1	0.612	0.594	50
	H1	0.577		
Калибратор E	A2	2.005	1.990	250
	B2	1.975		
Калибратор F	C2	2.664	2.672	500
	D2	2.680		
Образец	E2	0.427	0.420	33.2
	F2	0.413		

* Данные приведены в примере 1 только для иллюстрации и **не должны** использоваться для построения стандартной кривой.

Рисунок 1

(См. оригинал инструкции).

11.0 ПАРАМЕТРЫ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА

Для успешного выполнения теста необходимо выполнение следующих условий:

- Оптическая плотность Калибратора F должна быть ≥ 1.3
- Оптическая плотность Калибратора А должна быть ≤ 0.05
- Четыре из шести контролей качества должны укладываться в установленные интервалы.

12.0 АНАЛИЗ РИСКА

MSDS и Форма Анализа Риска доступны по запросу от Monobind Inc.

12.1 Проведение анализа

- Для воспроизводимости результатов важно, чтобы время реакции поддерживалось постоянным в каждой ячейке.
- Пипетирование образцов не должно превышать 10 минут.
- Очень липемические, гемолизированные и сильно загрязненные образцы не должны использоваться.
- Если используется больше, чем один планшет, рекомендуется повторять калибровочную кривую.
- Добавление раствора субстрата инициирует кинетическую реакцию, которая останавливается при добавлении стоп-раствора. Следовательно, добавление субстрата и стоп-раствора должно проводиться в одинаковой последовательности и с одинаковой скоростью для устранения различий во времени реакции в разных ячейках.
- Измерение оптической плотности на ридере проходит вертикально. Не прикасайтесь ко дну микроячеек.
- Плохая промывка ячеек может приводить к невоспроизводимым результатам.
- Использовать компоненты из одного набора. Не перемешивать реагенты из разных партий.
- Аккуратное и точное пипетирование и соблюдение точного времени и температуры являются важными. Любое отклонение может привести к неточным результатам.
- Для надлежащей работы устройства придерживаться всех установленных норм.

- Важно провести калибровку всего оборудования, например, пипеток, считывающих устройств, моющих устройств и/или автоматизированных инструментов.
- Анализ риска, как требуется Директивой 98/79/CE, для данного и других устройств, произведенных *Monobind Inc.*, может быть запрошен у Monobind@Monobind.com.

12.2 Интерпретация

- Измерения и интерпретация результатов должны проводиться опытным специалистом.**
- Лабораторные результаты не могут быть единственным критерием для определения диагноза. Особенно если результаты противоречат другим данным анализам.
- Для действительных результатов соответствующие контрольные и другие параметры должны находиться в установленных нормах.
- Производитель не несет ответственности** за результаты, если смешиваются составляющие из разных наборов.
- Если используются контрольные данные компьютера для интерпретации результатов, ожидаемые значения калибраторов должны быть в пределах 10 % заданных концентраций.

13.0 ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Примерно 97-98% нормального здорового населения имеют уровни АФП менее 8.5 нг/мл (4). У пациентов группы риска значения АФП между 100 и 350 нг/мл предполагают наличие гепатоцеллюлярной карциномы. Концентрации выше 350 нг/мл обычно свидетельствуют о наличии заболевания.

ТАБЛИЦА 1
Ожидаемые значения для АФП

Мужчины и Женщины	< 8.5 нг/мл (97-98 %)
-------------------	-----------------------

Важно помнить, что установленный диапазон значений, который можно ожидать у данной популяции "нормальных" людей с использованием данного метода зависит от множества факторов: специфичности метода, тестируемой популяции и точности метода в руках лаборанта. По этим причинам каждая лаборатория должна установить свой собственный диапазон нормальных значений.

14.0 ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

14.1 Воспроизводимость

Воспроизводимость набора внутри серии и между сериями определялась в анализе пулов сывороток трех разных уровней. Число, среднее значение, стандартное отклонение и коэффициент вариации для этих сывороток приведены в таблицах 2 и 3.

ТАБЛИЦА 2
Воспроизводимость внутри серии (нг/мл)

Образец	N	X	σ	C.V., %
Уровень 1	24	14.71	0.67	4.6
Уровень 2	24	71.89	2.68	3.7
Уровень 3	24	148.62	7.24	4.9

ТАБЛИЦА 3
Воспроизводимость между сериями (нг/мл)

Образец	N	X	σ	C.V., %
Уровень 1	30	16.20	1.41	8.7
Уровень 2	30	88.26	7.47	8.5
Уровень 3	30	188.43	11.92	6.3

*Измерения проводились в 30 постановках в дубляж.

14.2 Чувствительность

Чувствительность метода – 0.025 нг. Это эквивалентно образцу с концентрацией 1 нг/мл для данного набора. Предел обнаружения определен статистически как концентрация, соответствующая значению оптической плотности нулевого стандарта (нг/мл) плюс 2σ (σ - стандартное отклонение) при 95% доверительном интервале.

14.3 Точность

Настоящий метод сравнивался с другим иммуноферментным методом. Использовались образцы в диапазоне 2.5 - 601 нг/мл общим числом образцов 301. Было получено уравнение линейной регрессии, и был рассчитан коэффициент корреляции для АФП в сравнении с референсным методом. Полученные данные приведены в таблице 4.

ТАБЛИЦА 4

Метод	Среднее (x)	Уравнение регрессии	Кoeffициент корреляции
Этот метод	6.60	$Y = -0.7514 + 0.9639(x)$	0.978
Метод сравнения	6.43		

Было найдено только незначительное расхождение данного метода и референс-метода, что доказывают близкие средние значения. Уравнение и коэффициент корреляции показывают прекрасную согласованность методов.

14.4 Специфичность

Перекрестные реакции антител к АФП с различными веществами оценивались добавлением мешающих веществ в пулированную сыворотку в больших концентрациях. Не было обнаружено перекрестных реакций для следующих веществ.

Аналит	Концентрация
Ацетилсалициловая кислота	100 мкг/мл
Аметоптерин	100 мкг/мл
Аскорбиновая кислота	100 мкг/мл
Атропин	100 мкг/мл
Кофеин	100 мкг/мл
РЭА	10 мкг/мл
ПСА	1.0 мкг/мл
СА-125	10000 Ед/мл
ХГЧ	1000 МЕд/мл
ЛГ	10 МЕд/мл
ТТГ	100 мМЕд/мл
Пролактин	100 мкг/мл

14.5 Линейность и Хук-эффект

Были исследованы три образца с разными линейными разведениями АФП этим методом и референс-методом для оценки линейности и Хук-эффекта. Для приготовления линейных разведений был использован образец с высокой концентрацией АФП (> 100 000 нг/мл) и пулированная сыворотка от пациентов. Не наблюдался Хук-эффект, по крайней мере, до концентрации 10000 нг/мл, и в этом диапазоне концентраций открытие составило 97-109.4%.



ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

ООО «ДИАМЕБ»
ул. Чорновола, 97
г. Ивано-Франковск, 76005
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com