



НАБІР ДЛЯ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ α-фетопроतेїну (АФП) в сироватці

Кат. № : 105-1468

Кількість : 96

Виробник : DRG (Німеччина)

Увага: основою при проведенні аналізу є оригінал інструкції англ. мовою.

Методика від 07-2008
версія 7.0

1. ВСТУП

DRG AFP ELISA є ферментним імуноаналізом для кількісного вимірювання альфа протеїну (AFP) в сироватці.

1.2 Підсумок та Пояснення

Альфа-фетопротеїн (АФП) – глікопротеїн з молекулярною вагою близько 70 КД. АФП звичайно виробляється печінкою і жовтковим мішком плода і в малих концентраціях гастроінтестинальним трактом. Після народження рівень АФП в сироватці швидко зменшується і до другого року життя визначаються тільки його сліди.

Надмірне зростання рівнів АФП трапляється при злоякісних захворюваннях, особливо при несеєміноматозному тестикулярному раку і первинній гепатоцелюлярній карциномі. При несеєміноматозному тестикулярному раку виявлена чітка кореляція між рівнями АФП і стадією захворювання. Також підвищені рівні АФП знаходять у пацієнтів з семіноюю з несеєміноматозними елементами, але не з чистою семіноюю.

На додаток, підвищені рівні АФП також визначають у пацієнтів з нераковими хворобами, атаксією, телеангіектазією, спадковою тирозинемією, неонатальною гіпербілірубінемією, гострим вірусним гепатитом, хронічним активним гепатитом і цирозом. Зростання АФП також зустрічається у вагітних жінок. Таким чином, визначення АФП не рекомендується для проведення скринінгу хворих для виявлення пухлин у загальній популяції.

2. ПРИНЦИП ТЕСТУ

Набір є соліднофазним ферментнозв'язаним імуносорбційним набором, створеним по принципу "сендвіча". Лунки на мікропланшетці покриті моноклональним антитілом проти антигену на молекулі АФП. Зразок сироватки пацієнта з ендogenous АФП інкубується у лунці разом з ензимним кон'югатом (анти-АФП-сироватка, кон'югована з пероксидазою хрому). Після інкубації незв'язаний кон'югат вимивається водою. Кількість зв'язаної пероксидази прямо пропорційна концентрації АФП в зразку. Після додавання субстрату інтенсивність утвореного забарвлення пропорційна концентрації АФП в зразку пацієнта.

3. ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

- Даний набір тільки для діагностики in vitro.
- 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, проби і матеріали треба вважати потенційно інфекційними і використовувати з відповідною обережністю.
- Уникайте контакту зі Стоп-розчином (0,5 М H₂SO₄). Це може спричинити подразнення шкіри і опіки.
- Не піпетуйте ротом і уникайте контакту з слизовими.
- Не їжте, не пийте і не курите в місцях робот з реагентами.
- Використовуйте одноразові рукавички при роботі з реагентами.
- Використовуйте реагенти відповідно до правил безпеки.
- Не використовуйте реагенти після закінчення терміну придатності.
- Необхідно дотримуватись всіх об'ємів, визначених інструкцією. Оптимальні тестові результати будуть отримані при використанні каліброваних піпеток.
- Не змішуйте компоненти різних наборів, не рекомендується міняти місцями лунки різних планшеток навіть від однакових наборів, оскільки набори могли транспортуватись різними способами, тому допускається незначна відмінність.
- Хімічні речовини або використані або приготовлені реактиви необхідно обробляти відповідно правилам безпеки.
- Лист даних по безпеці доступний по запиту.

4. КОМПОНЕНТИ НАБОРУ

4.1 Вміст набору

1. **Мікропланшетка з лунками:** 1 шт., 96 лунок, покритих анти-АФП-моноклональними антитілами.

2. **Стандарт (Стандарт 0-4):** 5 флаконів, 0,5 мл (ліофілізовані). Концентрації: 0, 10, 40, 80, 160 МО/мл (1 МО/мл=1,21 нг/мл).
*Містить 0,03% Proclin 300, 0,015% BND і 0,010% MIT як консерванта.
3. **Ферментний кон'югат:** 1 флакон, 11 мл. Готовий до використання. Анти-АФП-сироватка, кон'югована з пероксидазою хрому.
*Містить 0,03% Proclin 300, 0,015% BND і 0,010% MIT як консерванта.
4. **Розчин Субстрату:** 1 флакон, 14 мл. Готовий до використання. ТМБ.
5. **Стоп-розчин:** 1 флакон, 14 мл. Готовий до використання. Містить 0,5 М H₂SO₄.

Примітка: на прохання можна додатково замовити Нульовий стандарт для розведення зразків.

4.1.1 МАТЕРІАЛИ, ЩО НЕ ПОСТАЧАЮТЬСЯ

1. Фотометр (450 нм±10 нм).
2. Калібровані мікропіпетки.
3. Абсорбуючий папір.
4. Бідистильована вода

Зауваження: дуже важливим є використання бідистильованої води.

4.2 ЗБЕРІГАННЯ І СТАБІЛЬНІСТЬ

При зберіганні при температурі 2-8⁰С активність реагентів буде збережена до закінчення терміну придатності. Не використовуйте після дати завершення терміну придатності. *Ензимний кон'югат, розчин Субстрату, Стандарти і Нульовий стандарт повинні зберігатись при 2-8⁰ С.*

Планшетка з лунками повинна зберігатись при 2-8⁰ С. Після відкриття пакету треба знову тісно його запечатати. Імунореактивність лунок стабільна приблизно 6 тижнів після відкриття, але наступного тісного запечатання з десікатором.

4.3 ПРИГОТУВАННЯ РЕАГЕНТІВ

Стандарти: розведіть ліофілізований вміст флаконів стандартів 0,5 мл бідистильованої води.

Зауваження: розведені стандарти стабільні 2 місяця при 2-8⁰С. Для більш тривалого зберігання заморозьте до -20⁰С.

4.4 ЗНИЩЕННЯ НАБОРУ

Знищення набору необхідно проводити відповідно до місцевого законодавства. Спеціальна інформація до даного продукту вказана в листі даних безпеки. (див. роз. 13).

4.5 ПОШКОДЖЕННЯ НАБОРУ

При значному пошкодженні набору або його компонентів необхідно повідомити виробника на протязі одного тижня після отримання набору. Значне пошкодження компонентів не допускає їх використання для аналізу. До вирішення проблеми, зберігайте дані компоненти, а потім знищіть.

5. ЗРАЗКИ

Для аналізу повинна використовуватись сироватка. Не використовуйте для аналізу гемолізовані, істеричні зразки. Не використовуйте зразки, які містять азид натрія.

5.1 Забір зразків

Сироватка:

Заберіть кров венопункцією (напр. Sarstedt Monovette # 02.1388.001), дайте можливість упасти в осад і відділіть сироватку центрифугуванням при кімнатній температурі. Не центрифугуйте допоки не утворився осад. Для пацієнтів, що отримали антикоагулянтну терапію може бути необхідний довший час для осаду.

5.2 Зберігання зразків

Проби повинні бути закриті і в такому виді можуть зберігатись при 2-8⁰С 5 днів. Для довшого зберігання проби повинні бути заморозжені до -20⁰ С. Після проби необхідно кілька разів легко потрясти перед тестуванням.

5.3 Розведення зразків

Якщо при початковому аналізі вміст взірця вищий за найвищий стандарт, взірць можна розвести 0 стандартом і повторно проаналізувати. При вичисленні результату необхідно враховувати коефіцієнт розведення.

Наприклад:

- Розведення 1:10: 10 мкл сироватки + 90 мкл стандарт 0 (ретельно перемішати)
- Розведення 1:100: 10 мкл попередньо розведеної 1:10 сироватки + 90 мкл стандарт 0 (ретельно перемішати)

6. ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗУ

6.1 ЗАГАЛЬНІ ЗАУВАЖЕННЯ

1. Приведіть всі реагенти до кімнатної температури перед початком тесту. Всі реагенти змішуйте без піноутворення.
2. Після початку тесту всі кроки повинні виконуватись без затримки.
3. Використовуйте нові насадки для піпеток перед кожним використанням.
4. Абсорбція залежить від температури і часу інкубації. Тому, перед початком тесту необхідно прослідкувати, щоб все було готовим: ковпачки зняті, реагенти приготовлені, лунки позначені і таке інше. Це дозволить проводити всі кроки за однаковій інтервали часу.
5. В загальному, ферментна реакція прямо пропорційна часу і температурі.

6.2 ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

1. Закріпіть необхідну кількість лунок в тримачі.
2. Додайте **25 мкл** кожного зі Стандартів, контролів і проб (**кожного разу з новою насадкою**) у відповідні лунки;
3. Додайте в кожну лунку **100 мкл Ферментного кон'югату**; Добре змішуйте 10 секунд. Важливо досягнути повного змішування на даному етапі;
4. Інкубуйте **30 хвилин** при кімнатній температурі;
5. Різно вилийте вміст лунок; Промийте лунки 5 разів дистильованою водою (400 мкл на лунку); Витряхніть лунки над промокальним папером, щоб видалити залишки; Важливо: На чутливість і точність аналізу впливає правильне виконання процедури промивання.
6. Додайте **100 мкл Субстрату** в кожну лунку;
7. Інкубуйте **10 хвилин** при кімнатній температурі;
8. Зупиніть реакцію додаванням в кожну лунку **50 мкл стоп-розчину**;
9. Зчитайте дані на фотометрі при 450 ± 10 нм впродовж **10 хвилин** після додавання стоп-розчину.

6.3 ВИРАХУВАННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

1. Визначте значення середньої абсорбції для кожного набору стандартів, зразків і контролів.
2. Побудуйте стандартну криву, відкладаючи середню абсорбцію для кожного стандарту на У-вісі проти відповідних концентрацій на Х-вісі.
3. Використовуючи значення середньої абсорбції для кожного зразка, визначте відповідну концентрацію АФП зі стандартної кривої. Опрацювання даних може проводитись і іншими методами, в залежності від досвіду.
4. Концентрація зразків може бути зчитана зі стандартної кривої. Зразки з концентрацією вище найвищого стандарту повинні даліше розводитись. Визначена концентрація зі стандартної кривої для розведених зразків повинна бути помножена на фактор розведення.

6.3.1 Приклад типової стандартної кривої

(Див. в оригіналі інструкції англ. мовою на ст.. 5).

7. ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ

1. Настійливо рекомендується, щоб кожна лабораторія визначала свої нормальні і патологічні показники.
2. Нижня межа концентрації АФП в нормальній сироватці менш ніж 1 МО/мл; верхня - біля 10 МО/мл.
3. Значення АФП в материнській сироватці під час вагітності: (Див. таблицю в оригіналі інструкції на ст.. 6).

КЛІНІЧНА ВАЖЛИВІСТЬ

1. Вміст АФП у материнській сироватці на 16-18 тиждень вагітності перевищував нормальні величини у 2,5 раз в 88% аненцефалії і в 79% відкритої "spina bifida".
2. Концентрація АФП при гепатоцелюлярній гепатомі і гермінативному клітинному раку коливається від нормальних величин до кількох мільйонів МО/мл. Після хірургічного видалення концентрація може впасти до нормальних величин або не набагато перевищити їх.
3. АФП може визначатись у сироватці хворих з неонатальним гепатитом і негепатогенними неоплазмами.

8. КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Рекомендується використовувати контролі згідно державним і федеральним правилам. Використання контролю дає можливість щоденної оцінки достовірності результатів. Використовуйте контролі і нормального рівня, і патологічного.

Контролі і відповідні результати QC лабораторії вказані в QC сертифікаті, що поставляється з набором. Величини, вказані в даному сертифікаті відповідають лоту набору і повинні використовуватись для порівняння результатів.

Також рекомендується використовуватись національні і міжнародні програми оцінки якості для підтвердження достовірності результатів. Використовуйте відповідний статистичний метод для аналізу величин контролю. Якщо результати аналізу не попадають в установленні межі матеріалів контролю, результати являються не достовірними.

В такому випадку перевірте наступні дані: пристрої піпетування і вимірювання часу; фотометр; дати придатності реагентів, умови зберігання і інкубації, методи аспірації і промивання. Якщо не знайдено помилки, зверніться до Вашого постачальника.

9. ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛІЗУ

9.1 Динамічний діапазон аналізу

Діапазон аналізу знаходиться в межах 0-160 МО/мл.

9.2 Специфічність антитіл (крос-реактивність)

(Див. таблицю в оригіналі інструкції на ст.. 7).

9.3 Аналітична чутливість

Аналітична чутливість була вирахована із середн. значення плюс двох стандартних відхилень 20 копій Стандарту 0 і виявилася в значенні 1,78 МО/мл.

9.4 Точність

(Показники точності в середині і між аналізами див. в таблицях в оригіналі інструкції на ст.. 7).

9.5 Відтворення

Відтворення DRG ELISA набору було визначено шляхом додавання зростаючого об'єму аналіту в три сироватки вагітних жінок. Відсотки відтворення визначені шляхом порівняння очікуваних і отриманих значень проб (див. табл. в оригіналі інструкції на ст.. 7).

9.6 Лінійність

Три проби з різними кількостями аналіту були послідовно розбавлені (до 1:16) нульовим стандартом і проаналізовані DRG ELISA набором. Відсотки відтворення визначені шляхом порівняння очікуваних і отриманих значень проб (див. табл. в оригіналі інструкції на ст.. 8).

10. ОБМЕЖЕННЯ ВИКОРИСТАННЯ

Впливаючі речовини

Будь-яка неналежна робота зі зразками чи зміна тесту може впливати на результати.

Не впливають на результати гемоглобін (до 4 мг/мл), білірубін (до 0,5 мг/мл) і тригліцериди (до 7,5 мг/мл).

Вплив речовин

На сьогодні не відомо жодних речовин (лікарств), що впливають на вимірювання АФП в зразку.

Побічний ефект

При тестуванні не було виявлено побічного ефекту до 1600 МО/мл АФП

11. ЮРИДИЧНІ АСПЕКТИ

11.1. Достовірність результатів

Тест необхідно проводити точно у відповідності з інструкцією виробника. Також користувачу необхідно слідувати правилам техніки безпеки, національним стандартам. Особливо це стосується використання контрольних реагентів. Тестові результати вважаються достовірними, якщо контролі знаходяться в указаних межах і якщо інші тестові параметри також відповідають тестовій специфікації.

11.2. Терапевтичні висновки

Терапевтичні висновки не повинні базуватись на результатах одного тесту і повинні враховувати всю клінічну картину пацієнта. Тільки якщо лабораторні дані повністю збігаються з клінічною картиною, можна встановлювати терапевтичні висновки для пацієнта.

11.3. Надійність

Будь-які зміни тесту чи зміна компонентів різних лотів може негативно відобразитись на результатах тесту. Такі зміни та модифікації не можуть бути приводом для заміни набору. Будь-які пошкодження набору при транспортуванні не відносяться до відповідальності виробника.

Інформація для замовлення:

ПМП ДІАМЕБ
вул. Чорновола, 97, м. Івано-Франківськ, 76005
тел: +38 (0342) 775 122
тел/факс: +38 (0342) 775612
E-mail: info@diameb.com

