

НАБІР ІФА ДЛЯ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ АЛЬФА-ФЕТОПРОТЕЇНУ (AFP)

600-10, CanAg AFP EIA

Каталог. №: 600-10

Методика від 04-2010

Кількість : 96

Виробник : Fujirebio Diagnostics,
Inc., (Швеція)



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

ПРИЗНАЧЕННЯ ВИКОРИСТАННЯ

Набір CanAg CA242 EIA призначений для кількісного визначення Альфа-Фетопротеїну (AFP) в сироватці крові людини.

ВСТУП І ПОЯСНЕННЯ МЕТОДУ (Див. оригінал інструкції англ. мовою).

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Справжній набір є твердофазним, неконкурентним методом, заснованим на прямій технології "сендвіч". Калібратори, Контролі та зразки пацієнтів інкубуються разом з біотинильованими анти-AFP моноклональними антитілами в покритих стрептавідином лунках мікропланшетів. Після промивання в кожну лунку додається буферний субстрат/хромогенний реагент (перекис водню і 3,3', 5,5'-тетраметилбензидин), в результаті відбувається ферментативна реакція. У процесі реакції в присутності антигену розвивається блакитне забарвлення. Інтенсивність забарвлення пропорційна кількості антигену AFP, присутньому у зразку.

Інтенсивність забарвлення вимірюється на мікропланшетному рідері при 620 нм (або, що необов'язково, при 405 нм після додавання стоп-розчину). Стандартні криві будуються для кожного аналізу в координатах оптична щільність проти концентрації для кожного стандарту. Концентрація AFP в зразках пацієнта розраховується з калібрувальної кривої.

РЕАГЕНТИ

- Кожен набір містить реагенти для 96 тестів.
- Термін придатності набору проставлений назовні коробки.
- Не використовуйте набір після закінчення терміну придатності.
- Не змішуйте реагенти з різних лотів і наборів.
- Зберігайте набір при 2-8 °С. Не заморожуйте.
- Стабільність розкритих реагентів наведена в таблиці нижче, за умови, що вони не були контаміновані, зберігалися в ретельно закритих оригінальних упаковках і зберігаються і використовуються, як описано. негайно повертайте реагенти в холодильник (2-8 °С) після використання.

Компонент	Кількість	Зберігання і стабільність після першого використання
Мікропланшет	1 планшет	2-8 °С до закінчення терміну придатності
12x8 мікролунок, покритих стрептавідином. Після розкриття негайно поверніть невикористані смужки в алюмінієвий пакет з осушувачем і ретельно запечатайте пакет, зберігайте сухим.		
Калібратори AFP	6 флаконів х 0.75 мл, 0-5-25-100-250-500 мкг/л	2-8 °С до закінчення терміну придатності
Антиген людського AFP в фосфатно-сольовому буферному розчині, що містить бичачий сироватковий альбумін, інертний жовтий барвник і 0.01% MIT в якості консерванту. Готові до використання.		
Контролі AFP	2 флакона х 0.75 мл	2-8 °С до закінчення терміну придатності
Антиген людського AFP в фосфатно-сольовому буферному розчині, що містить бичачий сироватковий альбумін, 0.01% MIT в якості консерванту. Готові до		

використання.

Біотинильований Анти-AFP	1 флакон х 15 мл	2-8 °С до закінчення терміну придатності, вказаного на флаконі
--------------------------	------------------	--

Біотинильоване Анти-AFP моноклональне мишаче антитіло, ~ 1.5 мкг/мл. Містить Tris-HCl буферний сольовий розчин (pH 7.2), бичачий сироватковий альбумін, бичачий імуноглобулін, блокуючі агенти, детергент, інертний синій барвник і 0.01% MIT в якості консерванту. Має бути змішаний з Tracer, Anti-HRP AFP перед використанням.

Трейсер, HRP-мічений анти-AFP	1 флакон х 0.75 мл	2-8 °С до закінчення терміну придатності, вказаного на флаконі
-------------------------------	--------------------	--

Сток-розчин кон'югату пероксидази хрому з анти-AFP моноклональними мишачими антитілами, ~ 20 мкг/мл. Містить консерванти. Перед використанням повинен бути змішаний з Біотинильованим Анти-AFP.

Субстрат ТМБ-HRP	1 флакон х 12 мл	2-8 °С до закінчення терміну придатності, вказаного на флаконі
------------------	------------------	--

Містить забуферений розчин перекису водню і 3,3', 5,5' Тетраметилбензидин (ТМБ). Готовий до використання.

Сток-розчин	1 флакон х 15 мл	2-8 °С до закінчення терміну придатності, вказаного на флаконі
-------------	------------------	--

Містить 0.12 М соляної кислоти. Готовий до використання.

Концентрат промивального буфера	1 флакон х 50 мл	2-8 °С до закінчення терміну придатності, вказаного на флаконі
---------------------------------	------------------	--

Містить TPIC-HCl сольовий розчин з ТВІН 20 і Germall II як консервант. Повинен бути розведений перед використанням в 25 разів водою.

Ознаки нестабільності

Розчин субстрату ТМБ повинен бути безбарвний або злегка блакитний. Блакитний колір свідчить про забруднення реагенту і розчин повинен бути викинутий.

ЗАУВАЖЕННЯ ТА ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

Для використання в in-Vitro діагностиці.

- Тільки для професійного використання.
- Будь ласка, зверніться до публікації Департамент охорони здоров'я та соціальних служб США (Bethesda, штат Меріленд, США) публікація № (CDC) 88-8395 щодо лабораторної безпеки або будь-якого іншого місцевого або національного регулювання.
- Поводитися зі зразками пацієнтів як з потенційно інфекційними.
- Дотримуйтеся місцевих керівних принципів при утилізації всіх відходів.

Увага

Матеріали людського походження, використані при виробництві реагентів даного набору, були протестовані з негативними результатами на антитіла до ВІЛ 1 та 2, антитіла до ВГС і поверхневого антигену гепатиту В (HBsAg). Оскільки не існує методу, який повністю гарантує відсутність інфекційних захворювань, що передаються з кров'ю, то з усіма матеріалами людського походження необхідно поводитися як з потенційно інфекційно небезпечними.

ЗБІР І РОБОТА ЗІ ЗРАЗКАМИ

Набір розроблений для використання сироватки. Зберіть кров з вени і відокремте сироватку, дотримуючись загальноприйнятих процедур. Зразки можуть зберігатися при 2-8 °С протягом 2 днів. Для тривалого часу зберігайте зразки при -20 °С або нижче. Уникайте повторних циклів заморожування-відтавання. Дозволити замороженим зразкам танути повільно, переважно при температурі 2-8 °С протягом ночі, а потім привести зразки до кімнатної температури перед аналізом.

ПРОЦЕДУРА

Необхідні матеріали, що не поставляються з набором

1. Мікропланшетний шейкер

Струшування має бути середнім або енергійним. Поздовжнє струшування близько 200 коливань/хв., коливання 700-900/хв..

2. Пристрій для промивання мікропланшета

Автоматичний промивальний пристрій з можливістю виконувати 1 і 6 циклів промивання з мінімальним обсягом наповнення 350 мкл/лунку/цикл промивки.

Якщо не використовується автоматичний мікропланшетний вошер, можна застосувати Nunc Immpio-8 вошер для ручного промивання.

- 3. Мікропланшетний Рідер**
З довжиною хвилі 620 нм і/або 405 нм і діапазоном абсорбції від 0 до 3.0.
- 4. Точні піпетки**
З одноразовими пластиковими наконечниками для внесення мікрооб'ємів рідин. 8-канальна піпетка для внесення 100 мкл бажана, але не обов'язкова. Піпетки для дозування обсягів в мілілітрах.
- 5. Дистильована або деіонізована вода**
Для приготування Промивного Розчину.

Примітки до методики

- Повне розуміння даної інструкції необхідно для забезпечення належного використання набору AFP EIA. Реагенти, що входять в комплект, призначені для використання як єдиний блок. Не змішуйте ідентичні реагенти з наборів, що мають різні номери партій. Не використовуйте реагенти після закінчення терміну придатності, вказаного на зовнішній стороні набору.
- Реагенти необхідно привести до кімнатної температури (20-25 °C) перед використанням. Аналіз варто проводити тільки при температурах між 20-28 °C для отримання точних результатів. Заморожені зразки повинні бути м'якю, але ретельно перемішані обережним перевертанням флаконів після відтавання.
- Перш ніж приступити до піпетування калібраторів і невідомих зразків, доцільно позначити смужки, щоб мати можливість чітко визначити зразки під час і після аналізу.
- Вимога ефективної і ретельної промивки для розділення зв'язаного і незв'язаного антигену і реагентів від зв'язаних твердо фазових комплексів антитіло-антиген є одним з найбільш важливих кроків в ІФА. З метою забезпечення ефективного промивання переконайтеся, що всі лунки повністю заповнені до верхнього краю розчином для промивання протягом кожного циклу промивання, що промивний розчин розливають з необхідною швидкістю, що аспірація лунок між і після циклів промивання є повною і, що лунки порожні. Якщо є залишки рідин, інвертувати пластину і постукати нею по фільтрувальному паперу.
- Автоматичний вошер: Дотримуйтесь інструкції виробника щодо належного очищення та обслуговування і проводьте необхідну кількість циклів промивання до і після кожної стадії інкубації. Рекомендується використовувати режим роботи *смужка* і режим промивки *переповнення* з об'ємом заповнення 800 мкл. Пристрій для аспірації/промивання не слід залишати з Промивним Розчином протягом тривалого часу, так як голки можуть забитися через погане наповнення рідиною і аспірацію.
- Субстрат TMB-HRP є дуже чутливим до забруднення. Для оптимальної стабільності TMB HRP-субстрату, залити необхідну кількість з флакона в ретельно промитий резервуар або одноразовий пластиковий лоток, щоб уникнути забруднення реагенту. Обов'язково використовуйте чисті одноразові пластикові піпетки (або наконечники).
- Обов'язково використовуйте чисті одноразові пластикові наконечники піпеток і правильну точну техніку піпетування при роботі із зразками і реагентами. Не допускайте торкання піпеткою поверхні рідини, щоб уникнути перенесення забруднення. Належна техніка піпетування має особливе значення при поводженні зі зразками та розчином TMB-субстрату HRP.

9	450	9
10	500	10
11	550	11
12	600	12

Переконайтеся, що використовуються тільки чисті пластикові або скляні посудини для приготування Розчину Антитіл.

Альтернатива: Вилийте вміст Трейсера, HRP Anti-AFP у флакон з Розчином для Трейсера і акуратно перемішайте. Переконайтеся, що Трейсер, HRP Анти-AFP повністю перелитий у флакон з Біотином Анти-AFP.

ПРИМІТКА: Розчин Антитіл стабільний протягом 3-х тижнів при 2-8 °C. Не готуйте більше Розчину Антитіл, ніж буде використано протягом цього періоду і переконайтеся, що він зберігається належним чином.

ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

Усі стандарти, контролі і зразки повинні аналізуватися в дублях. Калібрувальна крива повинна будуватися при кожній постановці аналізу. Перед використанням реагенти повинні бути приведені до кімнатної температури (20-25 °C).

- Приготуйте Промивний Розчин і Розчин антитіл. Дуже важливо використовувати чисті ємності. Чітко дотримуйтесь інструкції.
- Закріпіть необхідну кількість мікросмужок в тримачі. (Помістіть невикористовувані смужки в пластиковий пакет з осушувачем і закрийте його). Промийте кожну смужку один раз розчином для промивання. Не промивайте більше смужок, чим збирається використовувати протягом 30 хвилин.
- Внесіть 25 мкл AFP Калібраторів (CAL 0, 5, 25, 100, 250, 500), Контролей (C1, C2) і невідомих зразків (невідомі - Unk) в лунки у відповідності з наступною схемою:

	1	2	3	4	5 і т.д.
A	Кал. 0	Кал. 250	Невід. 1		
B	Кал. 0	Кал. 250	Невід. 1		
C	Кал. 5	Кал. 500	Невід. 2		
D	Кал. 5	Кал. 500	Невід. 2		
E	Кал. 25	C1	І т.д.		
F	Кал. 25	C1			
G	Кал. 100	C2			
H	Кал. 100	C2			

- Додайте 100 мкл Розчину Антитіл в кожну лунку, використовуючи точну піпетку на 100 мкл (або восьми канальну піпетку на 100 мкл). Уникайте дотику наконечників до поверхні рідини.
- Інкубуйте пластину протягом 1 години (± 5 хв.) при кімнатній температурі (20-25 °C) з постійним потрушуванням.
- Промийте кожну смужку 6 разів, використовуючи процедуру промивання, описану в пункті 4.
- Додайте 100 мкл субстрату TMB в кожну лунку, в тій же послідовності, як в п. 4. Розчин субстрату слід додавати по можливості швидко, щоб час між додаванням в першу і останню лунку не перевищував 5 хвилин.
- Інкубуйте 30 хвилин (± 5 хвилин) при кімнатній температурі з постійним перемішуванням планшета на шейкері. Уникайте потрапляння прямого сонячного світла.
- Негайно зчитайте оптичну щільність на рідері при 620 нм.

Альтернативний варіант

Якщо в лабораторії немає рідера з фільтром на 620 нм, оптична щільність може бути визначена як описано нижче:

Альт 9. Додайте 100 мкл стоп-реагенту в кожну лунку і перемішайте. Після цього протягом 15 хвилин зчитайте оптичну щільність при 405 нм.

Діапазон вимірювання

AFP EIA вимірює концентрації між 0.5 і 500 мкг/л. Якщо концентрація AFP вище діапазону вимірювання, як очікується, рекомендується розбавляти зразки з нормальною людською сироваткою перед аналізом. **УВАГА:** сироватка, використовувана для розбавлення, також повинна бути виміряна з метою визначення ендогенної концентрації CA242 (див. "Розрахунок результатів").

Контроль якості

AFP Контролі 1 і 2 слід використовувати для перевірки кожної серії аналізу. Діапазони очікуваних результатів зазначені на етикетках флаконів з реагентами. Якщо результати аналізу в недейсних результатах Калібратора чи Контролю, необхідно провести повну перевірку реагентів, точність піпеток, планшетний вошер і роботу зчитувача, і повторити аналіз. Кожна лабораторія може також підготувати свої власні пули сироваток різних рівней, які можуть бути

Приготування реагентів	Стабільність приготовленого реагенту
Промивний розчин	2 тижні при 2-25 °C в герметичному контейнері

Налийте 50 мл промивного концентрату в чисту посудину і розбавте в 25 разів додаванням 1200 мл дистильованої або деіонізованої води для отримання буферного розчину для промивання.

Розчин Антитіл	3 тижні при 2-8 °C
----------------	--------------------

Приготуйте потрібний об'єм Розчину Антитіл змішуванням 50 мкл Трейсера, HRP Анти-AFP з 1 мл Біотину Анти-AFP на смужку (див. таблицю нижче).

Кількість смужок	Трейсер, HRP Anti-AFP (мкл)	Біотин Анти-AFP (мл)
1	50	1
2	100	2
3	150	3
4	200	4
5	250	5
6	300	6
7	350	7
8	400	8

використані в якості внутрішнього контролю з метою забезпечення точності аналізу.

Референсний матеріал

1-й Міжнародний стандарт IS 72/225 може бути використаний як еталонний стандарт. Значення для Калібраторів і контролей AFP були визначені з набором внутрішніх еталонів, значення яких порівнюються до IS 72/225 з використанням коефіцієнта перерахунку 0.83, тобто 1 мкг/л відповідає 0.83 кМОд/л.

РОЗРАХУНОК РЕЗУЛЬТАТІВ

Якщо використовується мікропланшетний спектрофотометр з вбудованою програмою для розрахунку даних, створіть програму, яка використовує концентрацію, зазначену на етикетці кожного з AFP калібраторів.

Для автоматичного розрахунку результатів AFP рекомендується використовувати один з наступних методів:

- Метод кубічної кривої сплайна є підходящим методом. Калібратор 0 повинен бути включений в кривій зі значенням 0 мкг/л.
- Метод згладженої кривої сплайна є підходящим методом. Калібратор 0 слід використовувати як бланк.
- Інтерполяція з оцінкою від точки до точки. Калібратор 0 повинен бути включений в кривій зі значенням 0 мкг/л.
- Метод квадратного рівняння кривої є підходящим методом. Калібратор 0 повинен бути включений в кривій зі значенням 0 мкг/л.

ПРИМІТКА: 4-параметрична або лінійна регресія не повинні використовуватися.

Для ручної оцінки калібрувальна крива будується відкладенням значень абсорбції (A), отриманих для кожного AFP калібратора проти відповідної концентрації AFP (в мкг/л). Невідомі концентрації AFP потім можуть бути визначені з калібрувальної кривої з використанням середнього значення абсорбції кожного зразка пацієнта.

Якщо зразки в первинному аналізі дають рівні AFP вище, ніж 500 мкг/л, зразки необхідно розвести 1/10 і 1/100 з нормальною людською сироваткою і повторити аналіз, щоб отримати точну концентрацію AFP. **ПРИМІТКА:** Зразок, використовуваний для розведення, також повинен бути проаналізований з метою визначення ендогенної концентрації AFP.

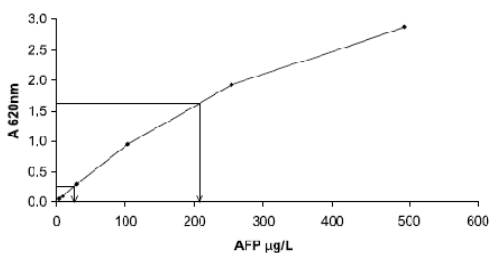
Концентрація AFP з нерозведеному зразку обчислюється таким чином:

Розведення 1/10: $10x [AFP]_{\text{розвед. зразок}} - (0.9x [AFP]_{\text{нормальна сироватка}})$

Розведення 1/100: $100x [AFP]_{\text{розвед. зразок}} - (0.99x [AFP]_{\text{нормальна сироватка}})$

Приклад результатів

Зразок	Значення Калібраторів (мкг/л)	Середнє абс. значення (A)	AFP мкг/л
Калібратор 0	0	0.036	
Калібратор 5	5	0.083	
Калібратор 25	25	0.282	
Калібратор 100	100	0.938	
Калібратор 250	250	1.914	
Калібратор 500	500	2.854	
Зразок А		0.220	19.4
Зразок В		1.686	208



Приклад, не використовуйте цю криву для визначення результатів аналізу.

ОБМЕЖЕННЯ ПРОЦЕДУРИ

Рівні AFP не можуть бути використані як абсолютний доказ присутності або відсутності злоякісних пухлин, а набір AFP не повинен використовуватися для скринінгу онкологічних хворих. Результати тестування повинні інтерпретуватися тільки у зв'язку з

іншими дослідженнями і методами діагностики захворювань, і AFP-тест не повинен замінювати інші клінічні дослідження.

Анти-реагентні антитіла (як анти-мишачі антитіла (НАМА) або Гетерофільні антитіла) в зразках пацієнта можуть іноді впливати на результати дослідження, незважаючи на додавання специфічних блокуючих агентів в буфер.

ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ

Концентрації AFP були визначені цим набором у 40 здорових чоловіків і 93 здорових жінок. Середнє значення склало 2.8 мкг/л зі стандартним відхиленням 2.6. Нижня і верхня межі нормального діапазону оцінювалися згідно з рекомендаціями IFCC для непараметричного статистичного аналізу та визначені як 2,5% (нижній) і 97,5% (верхній) фрактали. Референс-інтервал визначений як 95%.

Fraction	Reference limit (µg/L)	90% confidence interval
2.5 th (lower)	0.1	0.0–0.3
97.5 th (upper)	10	8.7–14.6

Рекомендується, щоб кожна лабораторія встановила свій власний діапазон нормальних значень з урахуванням локальних факторів навколишнього середовища, таких, як харчування, клімат, умови життя, відбір пацієнтів і т.д.

ТЕХНІЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Точність

Точність оцінювалася згідно NCCLS EP5-A з використанням 4 рівнів концентрацій пулованої замороженої сироватки з додаванням людського AFP і дев'ять різних комбінацій реагентів CanAg AFP EIA. Кожен зразок був довільно піпетований (n = 2/аналіз) і проаналізований двічі кожен день протягом 20 днів поспіль.

Зразок	N	Середня конц. мкг/л	В аналізі SD, мкг/л	В аналізі CV, %	Між днями SD, мкг/л	Між днями CV, %
AFP 1	80	7.8	0.2	2.0	0.1	1.8
AFP 2	80	23.2	0.4	1.8	0.3	1.4
AFP 3	80	207	3.5	1.7	3.5	1.7
AFP 4	80	416	6.6	1.6	8.5	2.0

Межа виявлення (чутливість)

Межа виявлення для даного набору склала ≤ 0.5 мкг/л і визначена як концентрація, відповідна значенню оптичної щільності нульового стандарту плюс 2 стандартних відхилення:

$$\frac{2 \times \text{SD Калібратора 0}}{\text{OD Калібратора 5} - \text{OD Калібратора 0}} \times 5 \text{ мкг/л}$$

Відновлення

Насичені зразки сироватки були приготовлені додаванням аліквоти зразка з сильно підвищеним значенням AFP до нормального зразка сироватки. % відновлення антигену був знайдено в діапазоні 90-106%. **ПРИМІТКА:** дослідження відновлення не повинні проводитися з використанням набору калібраторів.

Хук-ефект

Хук-ефект не спостерігається для зразків з концентраціями до 40 000 мкг/л. Однак, так як пацієнти з попередніми гепатоцелюлярними карциномами можуть показати дуже високі рівні, помилкові низькі результати через хук-ефект можна бачити в зразках цих пацієнтів. Для того, щоб уникнути помилково низьких результатів через хук-ефект при більш високих концентраціях, особливо у пацієнтів, для яких маркери вимірюються в перший раз, або коли дуже високі значення AFP можна очікувати, рекомендується для аналізу зразків проводити два розведення (наприклад, незначне і розбавлене 1:100 з нормальною людською сироваткою).

Лінійність розведення

Проби пацієнтів були розбавлені Розчинником зразків і проаналізовані. Отримані значення склали $\pm 10\%$ від очікуваних значень.

Специфічність

	Концентрації с незначною інтерференцією ($\pm 10\%$)
Ліпемія	10 мг/мл
Білірубін, незв'язаний	0.6 мг/мл
Гемоглобін	2 мг/мл

ГАРАНТІЯ

Будь-які зміни або модифікації процедури, не рекомендовані Fujirebio Діагностика, можуть вплинути на результати, і в цьому випадку Fujirebio Діагностика відмовляється від усіх гарантій, явних,

припущених або передбачених законодавством, включаючи гарантії товарного стану та придатності для використання.



ОФІЦІЙНИЙ ДИСТРИБ'ЮТОР

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