ایده‌آل تشخیص آتیه

کیت اندازه‌گیری AFP در سرم انسان
AFP ELISA Kit 96t
Cat. No: 1124-96 / Rev: B4 (1404/09/08)

مقدمه:

آلفا فیتوپروتئین (AFP) گلیکوپروتئینی با جرم مولکولی تقریبی ۷۰ کیلودالتون است که معمولاً در دوران جنینی توسط کیسه زرده، کبد و با غلظت‌های کمتر توسط دستگاه گوارش ساخته می‌شود. AFP یک تومورمارکر مهم جهت تشخیص و پیگیری درمان کارسینومای هپاتوسلولار است و مقادیر افزایش یافته آن در بیماری‌هایی نظیر هپاتومای اولیه و تومور سلول‌های کیسه زرده مشاهده می‌شود. سطح این پروتئین در سرم خانم‌های باردار نیز افزایش می‌یابد و در سه ماهه سوم بارداری به بیشترین حد می‌رسد. حیطه کاربرد این کیت، اندازه‌گیری کمی سطح AFP در نمونه سرم انسان به روش الایزا است.

اصول آزمایش:

این آزمایش بر اساس الایزای ساندویچ طراحی شده است. بی‌حرکت‌سازی کمپلکس ایمنی توسط واکنش بین **استرپتاویدین** تثبیت شده در کف چاهک و آنتی‌بادی بیوتینیله مونوکلونال ضد AFP صورت می‌گیرد. با قرار گرفتن سرم حاوی آنتی‌ژن در معرض آنتی‌بادی بیوتینیله و آنتی‌بادی متصل به آنزیم (HRP)، واکنش بین آنتی‌ژن و آنتی‌بادی‌ها بدون هیچ رقابتی صورت می‌گیرد و کمپلکس‌های ایمنی به کف چاهک متصل می‌شوند. پس از به تعادل رسیدن واکنش و شستشوی چاهک‌ها، با افزودن محلول رنگزا (سوبسترای آنزیم HRP) و سپس محلول متوقف‌کننده، محصول نهایی تولید می‌شود که بیشترین جذب نوری را در طول‌موج ۴۵۰ نانومتر دارد. میزان رنگ ایجاد شده و در نتیجه شدت جذب نوری با غلظت AFP سرم ارتباط مستقیم دارد. در نهایت غلظت AFP سرم به کمک منحنی استاندارد محاسبه می‌گردد.

محتویات کیت:

۱) میکروپلیت ۹۶ تستی حاوی استرپتاویدین تثبیت شده.
۲) کالیبراتور (AFP Cal A-F): شش ویال با غلظت‌های ۰، ۵، ۲۵، ۵۰، ۲۵۰ و ۵۰۰ ng/mL، تهیه شده از سرم انسان.
۳) محلول کونژوگه آنزیمی (AFP Enzyme Conjugate): یک ویال ۱۱ میلی‌لیتری حاوی آنتی‌بادی متصل به بیوتین و آنتی‌بادی متصل به آنزیم HRP.
۴) محلول شستشو (Wash Solution-50X): یک ویال ۲۰ میلی‌لیتری.
۵) محلول رنگزا A (Substrate Solution A): یک ویال ۶/۵ میلی‌لیتری.
۶) محلول رنگزا B (Substrate Solution B): یک ویال ۶/۵ میلی‌لیتری.
۷) محلول متوقف‌کننده (Stop Solution): یک ویال ۱۲ میلی‌لیتری.
۸) محلول کنترل (AFP Control): ویال(های) ۰/۵ میلی‌لیتری.
۹) برچسب مخصوص پلیت: یک ورق.

توجه ۱: تمام محلول‌ها در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شوند. محلول متوقف‌کننده در دمای اتاق نیز قابل نگهداری است.
توجه ۲: مقادیر کنترل(ها) در COA درج گردیده است.

مواد و وسایل مورد نیاز تأمین نشده در کیت:

۱) دستگاه خوانش‌گر پلیت دارای فیلتر ۴۵۰ و ۶۳۰ نانومتر (فیلتر مرجع).
۲) سمپلر کالیبره.
۳) آب مقطر دیونیزه.

احتیاط در استفاده از کیت:

۱) محتویات این کیت برای استفاده در همین کیت تعبیه گردیده است؛ لذا از استفاده مشترک با سایر کیت‌ها و یا شماره‌های ساخت دیگر جداً خودداری نمایید.
۲) کلیه محلول‌ها تا زمان انقضاء کیت پایدار هستند. از محلول‌هایی که تاریخ انقضاء آن‌ها گذشته است استفاده نکنید.
۳) توجه فرمایید محلول‌ها در معرض نور مستقیم قرار نگیرند.
۴) محتویات کیت با منشاء انسانی از نظر منفی بودن HBsAg، HIV1/2 و HCV بررسی شده‌اند؛ ولی تشخیص قطعی در مورد منفی بودن تمام عوامل عفونی بیماری‌زا با استفاده از روش‌های متداول آزمایشگاهی امکان‌پذیر نیست. بنابراین، با در نظر گرفتن احتمال آلودگی و بیماری‌زایی محتویات کیت، تمام مراحل آزمایش باید مطابق با دستورالعمل‌های ایمنی انجام شوند.
۵) استفاده از دستکش و عینک در هنگام کار الزامی است. در هنگام کار با کیت دقت فرمایید که محتویات آن بر روی صورت یا سایر نقاط بدن ریخته نشود. از تماس مواد با دهان و سایر مخاط جداً جلوگیری نمایید.
۶) نمونه بیماران، کنترل‌ها، چاهک‌ها و سر سمپلرهای استفاده شده باید به‌عنوان پسماندهای عفونی در نظر گرفته شوند و مطابق با الزامات دفع پسماندهای عفونی امحاء گردند.

جمع‌آوری، آماده‌سازی و نگهداری نمونه:

۱) نمونه مناسب برای این آزمایش سرم است. ناشتا بودن فرد به هنگام نمونه‌گیری در درستی نتایج به‌دست آمده تأثیرگذار خواهد بود. نمونه خون با استفاده از تکنیک استاندارد خون‌گیری سیاهرگی تهیه شود و سرم بعد از لخته شدن کامل خون (۳۰ تا ۶۰ دقیقه) از سلول‌های خونی جدا شود. حتی الامکان از نمونه‌های ایکتریک، لیپمیک و همولیز استفاده نکنید.
۲) در افرادی که دوز بالایی از بیوتین (>5 mg/day) را دریافت می‌کنند، نمونه‌گیری باید حداقل ۸ ساعت پس از دریافت آخرین دوز بیوتین انجام شود.
۳) درب ظرف نمونه‌ها باید کاملاً بسته باشد. نمونه‌ها تا ۵ روز در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد و حد اکثر تا ۱ ماه در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قابل نگهداری و استفاده هستند. از منجمد و ذوب کردن مکرر نمونه‌ها خودداری کنید.

آماده‌سازی و نگهداری معرف‌ها:

۱) آماده‌سازی و نگهداری محلول شستشو: حجم ۲۰ میلی‌لیتر از محلول شستشو (50X) را به ۹۸۰ میلی‌لیتر آب مقطر دیونیزه اضافه و پس از آماده‌سازی در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری کنید. در صورت مشاهده رسوب در محلول شستشو، آن را در بن ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار دهید تا رسوب حل شود. در صورت مشاهده کدورت در محلول شستشو، از مصرف آن خودداری کنید.
۲) آماده‌سازی محلول رنگزا: قبل از شروع استفاده از کیت، کل حجم محلول رنگزا B (ویال روشن) را داخل محلول رنگزا A (ویال تیره) خالی نمایید و برای انجام تست تا پایان مصرف کیت استفاده نمایید. در صورت مشاهده رنگ آبی و یا کدورت در محلول رنگزا، از مصرف آن خودداری فرمایید.

روش انجام آزمایش:

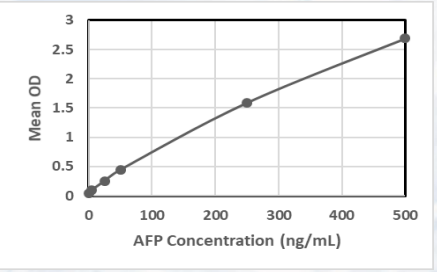
قبل از شروع آزمایش مطمئن شوید که تمام اجزاء کیت و نمونه‌ها به دمای اتاق (۲۲ تا ۲۸ درجه سانتی‌گراد) رسیده‌اند. کالیبراتورها، نمونه‌ها و کنترل‌ها را با ۵ بار سر و ته کردن به‌آرامی یکنواخت کنید.
۱) تعداد چاهک‌های مورد نیاز برای انجام تست را بردارید و بقیه چاهک‌ها را همراه رطوبت‌گیر در کیسه آلومینیومی قرار دهید، درب آن را بسته و در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری نمایید.
۲) حجم ۲۵ میکرولیتر از کالیبراتورها، نمونه‌ها و کنترل را در چاهک‌های مورد نظر بریزید. بهتر است که از هر نمونه، کنترل و یا کالیبراتور به‌صورت دوتایی (دوپلیکیت) در چاهک‌ها ریخته شود.
۳) حجم ۱۰۰ میکرولیتر محلول کونژوگه آنزیمی به هر چاهک اضافه کنید و پلیت را به‌مدت ۳۰ ثانیه روی سطح میز به‌آرامی تکان دهید.
۴) چاهک‌ها را با برچسب مخصوص پلیت بپوشانید و به‌مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.
۵) محتویات چاهک‌ها را با وارونه کردن یا آسپیراسیون تخلیه کنید. سپس چاهک‌ها را ۳ مرتبه و هر مرتبه با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشو آماده شده (بخش آماده‌سازی معرف‌ها را مطالعه بفرمایید) بشویید. اگر شستشو به‌صورت دستی انجام می‌شود در انتهای شستشو به‌آرامی پلیت را بر روی دستمال رطوبت‌گیر بزنید. به‌منظور انجام شستشوی مناسب و استاندارد چاهک‌ها، مطابق با فیلم قرار داده شده در وب‌سایت شرکت[1] اقدام نمایید.
۶) حجم ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رنگزای آماده مصرف (بخش آماده‌سازی معرف‌ها را مطالعه بفرمایید) درون تمام چاهک‌ها بریزید و پلیت را به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه کنید. از تکان دادن پلیت در این مرحله خودداری کنید.
توجه: اگر بالاترین میزان جذب نوری کالیبراتور کمتر از ۲ به‌دست آمد، می‌توانید زمان انکوباسیون محلول رنگزا را به‌مدت ۱۵ دقیقه افزایش دهید.
۷) حجم ۵۰ میکرولیتر محلول متوقف‌کننده به تمام چاهک‌ها اضافه کنید و پلیت را به‌مدت ۲۰ ثانیه به‌آرامی تکان دهید تا تمام رنگ آبی آن به زرد تبدیل شود.

1. http://www.idealdiag.com/Training.aspx

ISO13485 KGS

۸) مقدار جذب نوری را برای هر چاهک در طول‌موج ۴۵۰ نانومتر با استفاده از متد Point to Point حداکثر تا ۱۵ دقیقه بعد از متوقف کردن واکنش بخوانید (از طول‌موج رفرانس ۶۲۰ تا ۶۳۰ نانومتر استفاده کنید). میزان جذب و نمودار کالیبراتورهای این کیت به‌عنوان نمونه در زیر آورده شده است.

Calibrator	Well Number	OD	Mean OD	Conc. (ng/mL)
Cal. A	A1	0.051	0.049	0
	B1	0.048		
Cal. B	C1	0.101	0.101	5
	D1	0.102		
Cal. C	E1	0.246	0.255	25
	F1	0.265		
Cal. D	G1	0.444	0.446	50
	H1	0.448		
Cal. E	A2	1.509	1.541	250
	B2	1.573		
Cal. F	C2	2.755	2.691	500
	D2	2.627		



مقادیر مورد انتظار برای تست الایزای AFP

شرکت تولیدکننده کیت، مقادیر مورد انتظار برای این آزمایش را به قرار زیر مشخص کرده است. اگرچه، این مقادیر برای آنالیت مورد نظر باید توسط آزمایشگاه تعیین گردد.

Normal Range (ng/mL)
Male and Female < 8.5

پارامترهای کنترل کیفی

۱) بررسی دقت- آزمون دقت درون‌دور (Within Run)

دقت درون‌دور با ارزیابی تکرارپذیری نتایج حاصل از سه نمونه سرم با غلظت‌های متفاوت در یک نوبت‌کاری (۲۰ بار تکرار برای هر نمونه) بررسی شد. معیار پذیرش در این آزمایش CV<21.78% است.

Serum Sample	1	2	3
No. of Repeats	20	20	20
Mean AFP (ng/mL)	3.56	8.27	22.81
SD (ng/mL)	0.21	0.45	0.80
CV (%)	5.9	5.4	3.5

۲) بررسی دقت-آزمون دقت بین‌دور (Between Run)

دقت بین‌دور با ارزیابی تجدیدپذیری نتایج حاصل از سه نمونه سرم با غلظت‌های متفاوت در ۴ نوبت‌کاری (۵ بار تکرار برای هر نمونه در هر نوبت‌کاری) انجام شد. معیار پذیرش در این آزمایش CV<21.78% است.

Serum Sample	1	2	3
No. of Repeats	20	20	20
Mean AFP (ng/mL)	2.92	10.31	25.91
SD (ng/mL)	0.18	0.47	1.0
CV (%)	6.2	4.6	3.9

۳) بررسی درستی - آزمون بازیابی (Recovery)

در این آزمایش به ازاء هر آزمون، دو نمونه سرم به نسبت مساوی با یکدیگر ترکیب شد و به‌عنوان یک نمونه، غلظت AFP در آن سنجش گردید. معیار پذیرش در این آزمایش، Bias<11.22% نسبت به نتیجه مورد انتظار است.

No.	Sample (ng/mL)	Added (ng/mL)	Exp. (ng/mL)	Obs. (ng/mL)	% Rec.
1	2.4	18.2	10.3	10.7	103.9
2	5.7	13.9	9.8	9.6	98.0
3	11.6	31.4	21.5	20.5	95.3

۴) بررسی درستی- آزمون خطی بودن (Linearity)

در این تست غلظت AFP در رقت‌های مختلف نمونه سرم برای تعیین خطی بودن کیت اندازه‌گیری شد. معیار پذیرش در این آزمایش Bias<11.22% است.

No	Sample (ng/mL)	1/2	1/4	1/8	1/16
		% Bias			
1	8.31	0.8	-1.7	2.8	3.8
2	19.2	-1.2	-2.0	-3.1	-3.4
3	26.1	-1.7	-1.5	-2.2	-2.6

۵) بررسی ویژگی- آزمون واکنش متقاطع(Cross Reactivity)

ویژگی این آزمایش به کمک اضافه کردن غلظت‌های مختلفی از مواد مندرج در جدول زیر به نمونه‌های سرم، ارزیابی شده است. واکنش متقاطع با اندازه‌گیری نسبت بین مقدار ماده اضافه شده به مقدار AFP مورد نیاز برای ایجاد همان مقدار جذب، بررسی شده است.

معیار پذیرش واکنش متقاطع (بسته به نوع آنالیت و ماده اضافه شده) برای آنالیت در محدوده ۱۰۰±۱۰ درصد و برای ماده اضافه شده حداکثر تا ۲۵ درصد است.

Analyte	Cross Reactivity	Concentration
Acetylsalicylic Acid	ND*	100µg/mL
Amethopterin	ND	100µg/mL
Ascorbic Acid	ND	100µg/mL
Atropine	ND	100µg/mL
Caffeine	ND	100µg/mL
CEA	ND	10µg/mL
PSA	ND	1.0µg/mL
CA-125	ND	10.000 U/mL
hCG	ND	1000 IU/mL
hLH	ND	10 IU/mL
hTSH	ND	100 mIU/mL
hPRL	ND	100 µg/mL

*ND: Not Detectable

۶) بررسی حساسیت (Sensitivity)

حساسیت کیت براساس Limit of Detection (LOD) و Limit of Blank (LOB) با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد و برابر با ۰/۵ ng/mL تعیین گردید.

$$LOD = LOB + 1.645\ SD_s$$
$$LOB = Mean_b + 1.645\ SD_b$$

(s: Diluted sample & b: Blank)

۷) بررسی اثر هوک (Hook Effect)

غلظت AFP تا ۱۰۰۰۰ ng/mL بررسی گردید و اثر هوک مشاهده نشد.

۸) بررسی پایداری (Stability)

Accelerated Stability Test: بررسی پایداری کیت به مدت ۴ هفته در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد.

In Use Stability Test: بررسی پایداری کیت پس از باز کردن درب محلول‌ها به مدت ۸ هفته در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد.

Shelf Stability Test: بررسی پایداری ۸ عدد کیت به مدت ۲ سال در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و ارزیابی نتایج به صورت هر سه ماه یک بار می‌باشد.

مطالعات مختلف بررسی پایداری نشان می‌دهد که کیت مورد نظر در زمان‌های مشخص شده پایدار است. معیار پذیرش در آزمایش‌های مربوط به تعیین پایداری، تغییر نتایج کمتر از ۲۰ درصد است.

علائم استفاده شده در برچسب کالاها

EC REP	Authorized representative in the European community
	Manufacturer
	Use-by date
LOT	Batch code
IVD	In vitro diagnostic medical device
CE	European conformity
REF	Catalogue number
Σ	Contains sufficient for tests
	Temperature limit
	Date of manufacture

References:
1. McPherson R, Pincus M. Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. Elsevier Health Sciences; 2021.
2. Pagana KD. Mosby's manual of diagnostic and laboratory tests. Elsevier Health Sciences; 2013.
3. Tietz. Reference information for the clinical laboratory. Hn Textbook of clinical chemistry. Burtis, CA, Ashwood, RA, WB, Saunders. Philadelphia; 1999.

در صورت بروز هرگونه مشکل خواهشمند است با شماره‌های مندرج بر روی جعبه (بخش پشتیبانی) تماس بگیرید.

توجه: چنانچه از دستگاه‌های الایزا پروسسور استفاده می‌کنید، می‌توانید تنظیمات دستگاه خود را از شرکت دریافت نمایید.

دفتر مرکزی: تهران - بزرگراه آبشناسان - سردارجنگل شمالی - خیابان پنج تن - بلوار قدس - کوچه دوم شرقی - پلاک ۸
کارخانه: کرج - کمالشهر، شهرک صنعتی بهارستان، انتهای گلستان دوم غربی، پلاک ۱۱ تلفن: ۲۳-۲۱۸۵۵۱۹۵۱۹.