

کیت اندازه گیری AFP در سرم انسان
AFP ELISA Kit 96t
Cat. No: 1124-96 / Rev: C4 (1405/07/11)

مقدمه:

آلفا فیتوپروتئین (AFP) گلیکوپروتئینی با جرم مولکولی تقریبی ۷۰ کیلودالتون است که معمولاً در دوران جنینی توسط کیسه زرده، کبد و با غلظت های کمتر توسط دستگاه گوارش ساخته می شود. AFP یک تومورمارکر مهم جهت تشخیص و پیگیری درمان کارسینوما های هپاتوسلولار است و مقادیر افزایش یافته آن در بیماری های نظیر هپاتومای اولیه و تومور سلول های کیسه زرده مشاهده می شود. سطح این پروتئین در سرم خانم های باردار نیز افزایش می یابد و در سه ماهه سوم بارداری به بیشترین حد می رسد. حیطة کاربرد این کیت، اندازه گیری کمی سطح AFP در نمونه سرم انسان به روش الایزا است.

اصول آزمایش:

این آزمایش بر اساس الایزای ساندویچ طراحی شده است. بی حرکت سازی کمپلکس ایمنی توسط واکنش بین استرپتاویدین تثبیت شده در کف چاهک و آنتی بادی بیوتینیل ه مونوکلونال ضد AFP صورت می گیرد. با قرار گرفتن سرم حاوی آنتی ژن در معرض آنتی بادی بیوتینیل و آنتی بادی متصل به آنزیم (HRP)، واکنش بین آنتی ژن و آنتی بادی ها بدون هیچ رقابتی صورت می گیرد و کمپلکس های ایمنی به کف چاهک متصل می شوند. پس از به تعادل رسیدن واکنش و شستشوی چاهک ها، با افزودن محلول رنگزا (سوپسترای آنزیم HRP) و سپس محلول متوقف کننده، محصول نهایی تولید می شود که بیشترین جذب نوری را در طول موج 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 می گردد.

محتویات کیت:

- ۱) میکروپلیت ۹۶ تستی حاوی استرپتاویدین تثبیت شده.
- ۲) کالیبراتور (AFP Cal A-F): شش ویال با غلظت های ۰، ۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۳۰۰ ng/mL، تهیه شده از سرم انسان.

- ۳) محلول کونژوگه آنزیمی (AFP Enzyme Conjugate): یک ویال ۱۱ میلی لیتری حاوی آنتی بادی متصل به بیوتین و آنتی بادی متصل به آنزیم HRP.
 - ۴) محلول شستشو (Wash Solution-50X): یک ویال ۲۰ میلی لیتری.
 - ۵) محلول رنگزا A (Substrate Solution A): یک ویال ۶/۵ میلی لیتری.
 - ۶) محلول رنگزا B (Substrate Solution B): یک ویال ۶/۵ میلی لیتری.
 - ۷) محلول متوقف کننده (Stop Solution): یک ویال ۱۲ میلی لیتری.
 - ۸) محلول کنترل (AFP Control): ویال (های) ۰/۵ میلی لیتری.
 - ۹) برچسب مخصوص پلیت: یک ورق.
- توجه ۱: تمام محلول ها در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد نگهداری شوند. محلول متوقف کننده 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 خوانش گر 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 کیت ها و یا شماره های ساخت دیگر جداً خودداری نمایید.
- ۲) کلیه محلول ها تا زمان انقضاء کیت پایدار هستند. از محلول هایی که تاریخ انقضاء آن ها گذشته است استفاده نکنید.
- ۳) توجه فرمایید محلول ها در معرض نور مستقیم قرار نگیرند.
- ۴) محتویات کیت با منشاء انسانی از نظر منفی بودن HBSAg، HIV1/2 و HCV بررسی شده اند؛ ولی تشخیص قطعی در مورد منفی بودن تمام عوامل عفونی بیماری زا با استفاده از روش های متداول آزمایشگاهی امکان پذیر نیست. بنابراین، با در نظر گرفتن احتمال آلودگی و بیماری زایی محتویات کیت، تمام مراحل آزمایش باید مطابق با دستورالعمل های 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، کنترل ها، چاهک ها و سر سمپلر های استفاده شده باید به عنوان پسماندهای عفونی در نظر گرفته شوند و مطابق با الزامات دفع پسماندهای عفونی امحاء گردند.

جمع آوری، آماده سازی و نگهداری نمونه:

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

آماده سازی و نگهداری معرف ها:

- ۱) آماده سازی و نگهداری محلول شستشو: حجم ۲۰ میلی لیتر از محلول شستشو (50X) را به ۹۸۰ میلی لیتر آب مقطر دیونیزه اضافه و پس از آماده سازی در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد نگهداری کنید. در صورت مشاهده رسوب در محلول شستشو، آن را در بن ماری ۳۷ درجه سانتی گراد قرار دهید تا رسوب حل شود. در صورت مشاهده کدورت در محلول شستشو، از مصرف آن خودداری کنید.
- ۲) آماده سازی 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 نمونه ها به دمای اتاق (۲۲ تا ۲۸ درجه سانتی گراد) رسیده اند. کالیبراتور ها، نمونه ها و کنترل ها را با ۵ بار سر و ته کردن به آرامی یکنواخت کنید.
- ۱) تعداد چاهک های مورد نیاز برای انجام تست را بردارید و بقیه چاهک ها را همراه رطوبت گیر در کیسه آلومینیومی قرار دهید. درب آن را بسته و در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد نگهداری نمایید.
 - ۲) حجم ۲۵ میکرولیتر از کالیبراتور ها، نمونه ها و کنترل را در چاهک های مورد نظر بریزید. بهتر است که از هر نمونه، کنترل و یا کالیبراتور به صورت دوتایی (دوپلیکیت) در چاهک ها ریخته شود.
 - ۳) حجم ۱۰۰ میکرولیتر محلول کونژوگه آنزیمی به هر چاهک اضافه کنید و پلیت را به مدت ۳۰ ثانیه روی سطح میز به آرامی تکان دهید.
 - ۴) چاهک ها را با برچسب مخصوص پلیت ببوشانید و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.
 - ۵) محتویات چاهک ها را با وارونه کردن یا اسپیراسیون تخلیه کنید. سپس چاهک ها را ۳ مرتبه و هر مرتبه با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشو آماده شده (بخش آماده سازی معرف ها را مطالعه فرمایید) بشویید. اگر شستشو به صورت دستی انجام می شود در انتهای شستشو به آرامی پلیت را بر روی دستمال رطوبت گیر بریزید. به منظور انجام شستشوی مناسب و استاندارد چاهک ها، مطابق با فیلم قرار داده شده در وبسایت شرکت^۱ اقدام نمایید.
 - ۶) حجم ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رنگزای آماده مصرف (بخش آماده سازی معرف ها را مطالعه فرمایید) درون تمام چاهک ها بریزید و پلیت را به مدت 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 به دست آمد، می توانید زمان انکوباسیون محلول رنگزا را به مدت ۱۵ دقیقه افزایش دهید.
- ۷) حجم ۵۰ میکرولیتر محلول متوقف کننده به تمام چاهک ها اضافه کنید و پلیت را به مدت ۲۰ ثانیه به آرامی تکان دهید تا تمام رنگ آبی آن به زرد تبدیل شود.

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

علائم استفاده شده در پرچسب 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
	Contains sufficient for tests
	Temperature limit
	Date of manufacture

References:

- McPherson R, Pincus M. Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. Elsevier Health Sciences; 2021.
- Pagana KD. Mosby's manual of diagnostic and laboratory tests. Elsevier Health Sciences; 2013.
- 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 ایلازا پروسسور استفاده می‌کنید، می‌توانید تنظیمات دستگاه خود را از شرکت دریافت نمایید.

معیار پذیرش واکنش متقاطع (بسته به نوع آنالیت و ماده اضافه شده) برای آنالیت در محدوده $100 \pm 10\%$ 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 0.5 ng/mL تعیین گردید.

$$\text{LOD} = \text{LOB} + 1.645 \text{ SD}_s$$

$$\text{LOB} = \text{Mean}_b + 1.645 \text{ SD}_b$$

(s: Diluted sample & b: Blank)

۷ بررسی اثر هوک (Hook Effect)

غلظت AFP تا 10000 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.

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 $\text{CV} < 21.78\%$ 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، $\text{Bias} < 11.22\%$ 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 $\text{Bias} < 11.22\%$ است.

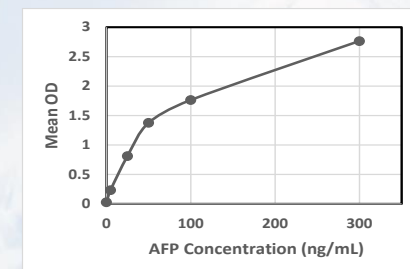
No	Sample (ng/mL)	1/2	1/4	1/8	1/16
		% Bias			
1	8.31	0.8	-1.7	2.8	3.8
2	19.2	-1.2	-2.0	-3.1	-3.4
3	26.1	-1.7	-1.5	-2.2	-2.6

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.

۸ مقدار جذب نوری را برای هر چاهک در طول موج ۴۵۰ نانومتر با استفاده از مدت Point to Point حداکثر تا ۱۵ دقیقه بعد از متوقف کردن واکنش بخوانید (از طول موج 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	0.029	0.030	0
	B1	0.031		
Cal. B	C1	0.231	0.235	5
	D1	0.239		
Cal. C	E1	0.803	0.812	25
	F1	0.821		
Cal. D	G1	1.371	1.376	50
	H1	1.381		
Cal. E	A2	1.731	1.763	100
	B2	1.795		
Cal. F	C2	2.700	2.764	300
	D2	2.828		



مقادیر مورد انتظار برای تست ایلازی 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)
UP TO 7 ng/mL

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 $\text{CV} < 21.78\%$ است.