

# НАБІР РЕАГЕНТІВ

## АФП (АЛЬФА-ФЕТОПРОТЕЇН) ELISA

### AFP ELISA

Каталог. №: EIA-1468

Дата випуску інструкції: 2020-12-18  
Версія 10.0



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

#### 1. ВСТУП

**DRG AFP ELISA** є ферментним імуноаналізом для кількісного *in vitro* діагностичного вимірювання альфа-фетопропротеїну (AFP) в сироватці.

**Цей набір НЕ використовується для оцінки ризику трисомії 21.**

#### 1.2 Короткий опис та пояснення

Альфа-фетопропротеїн (АФП) – глікопротеїн з молекулярною вагою близько 70 КД (1). АФП звичайно виробляється печінкою і жовтковим мішком плода і в малих концентраціях гастроінтестинальним трактом (2). Після народження рівень АФП в сироватці швидко зменшується і до другого року життя та після визначаються тільки його сліди в сироватці (3).

Надмірне зростання рівнів АФП трапляється при злоякісних захворюваннях (4-7), особливо при не семіноматозному тестикулярному раку і первинній гепатоцелюлярній карциномі. При не семіноматозному тестикулярному раку виявлена чітка кореляція між рівнями АФП і стадією захворювання (8-9). Також підвищені рівні АФП знаходять у пацієнтів з семіною з не семіноматозними елементами, але не з чистою семіною (6,8, 10-11).

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 (12-15). Зростання АФП також зустрічається у вагітних жінок (16-17). Таким чином, визначення АФП не рекомендується для проведення скринінгу хворих для виявлення пухлин у населенні в цілому.

#### 2. ПРИНЦИП ТЕСТУ

Набір є твердофазним ферментним імуноаналізом на основі **принципу "сандвіч"**. Мікротитрові лунки покриті моноклональним антитілом (миші) спрямованим до унікальної ділянки антигену на молекулі АФП. Аліквота сироватки пацієнта з ендogenous АФП інкубується у лунці разом з ферментним 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 ТА ПОПЕРЕДЖЕННЯ

1. Тільки для діагностичного використання *in-vitro*. Для професійного використання.
2. Всі реагенти цього набору, які містять людську сироватку або плазму, були протестовані і підтверджені FDA методиками як негативні до ВІЛ-1,2, поверхневого антигену гепатиту В і вірусу гепатиту С. Однак, під час використання та утилізації всі реагенти слід розглядати як потенційно біологічно небезпечні.
3. Перед початком аналізу повністю і уважно прочитати інструкцію. Використовувати тільки дійсну версію інструкції. Впевнитись, що все зрозуміло.
4. Мікропланшет складається зі смужок, які відриваються. Невикористані лунки зберігати при 2-8 °C в закритому пакеті і використовувати з рамкою, що надається.
5. Піпетування зразків та реагентів проводити якомога швидше і в однаковому порядку для кожного кроку.
6. Використовувати ємності тільки для одиночних реагентів. Це особливо стосується ємностей з субстратами. Використання пробірки для розчину субстрату, яка перед тим використовувалась для розчину кон'югату, може призвести до зміни кольору

субстратного розчину. Не зливати реагенти назад у ємності, це може призвести до забруднення реагентів.

7. Перемішувати вміст лунок ретельно для отримання надійних результатів. Не використовувати лунки повторно.
8. Не дозволяти лункам висихати під час проведення аналізу; додавати реагенти одразу ж після завершення етапів промивання.
9. Дозволити реагентам нагрітись до кімнатної температури (21-26 °C) перед початком аналізу. Температура впливає на результати зчитування. Але не впливає на значення зразків пацієнтів.
10. Ніколи не піпетувати ротом і уникати контакту реагентів і зразків з шкірою та слизовими оболонками.
11. Не палити, не вживати їжу, не пити і не наносити косметику на території, де обробляються зразки або реагенти набору.
12. Одягати одноразові рукавички з латексу при обробці зразків і реагентів. Мікробіологічне зараження реагентів або зразків може дати помилкові результати.
13. Проведення аналізу має відповідати процедурам, зазначеним у відповідних державних посібниках або правилах з біологічної безпеки.
14. Не використовувати реагенти після дати закінчення терміну придатності, яка вказана на етикетках набору.
15. Згідно з протоколом аналізу необхідно слідувати всім робочим обсягам реагентів. Оптимальні результати можна отримати, якщо використовувати калібрувальні піпетки мікротитрові планшетні зчитувачі.
16. Не змішувати і не використовувати компоненти наборів з різними номерами партій. Рекомендується не замінювати лунки різних планшетів, навіть однієї і тієї ж партії. Можливо, що набори поставлялися і зберігалися в різних умовах, і зв'язуючі якості планшетів можуть в деякій мірі відрізнятися.
17. Уникати контакту зі *Стоп розчином*, що містить 0.5 моль/л H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Він може викликати подразнення шкіри і опіки.
18. Деякі реагенти містять Proclin 300, BND і/або MIT, як консерванти. У випадку контакту з очима або шкірою, негайно промити водою.
19. Субстрат ТМБ має подразнюючий ефект на шкіру та слизові. У разі контакту промити очі з великою кількістю води, а шкіру з милом та великою кількістю води. Промити забруднені предмети перед повторним використанням. При вдиханні вийти на свіже повітря.
20. Виходячи з відповідних державних посібників чи правил з біологічної безпеки, хімічні речовини, і підготовлені або використані реагенти повинні розглядатися як небезпечні відходи.
21. За інформацією щодо небезпечних речовин, що входять в набір, прохання звертатися до Паспорту Безпеки Матеріалу. Паспорт Безпеки Матеріалу надається за запитом безпосередньо від компанії DRG Instruments GmbH.

#### 4. РЕАГЕНТИ

##### 4.1 Реагенти, які постачаються

1. **Мікротитрові лунки:** 12 x 8 (відривні) смужки, 96 лунок, покритих антитілами анти-АФП (моноклональні).
2. **Стандарт (Стандарт 0-4):** 5 флаконів, 0.5 мл (ліофілізовані). Концентрації: 0-10-40-80-160 МО/мл  
Конверсія: 1 МО/мл=1.21 нг/мл.  
Стандарти відкалібровані відповідно до 1-го Міжнародного Стандарту NIBSC для АФП (AFP перший IRP 72/225)  
Дивіться «Підготовка реагентів»;  
Містить нертутний консервант.
3. **Ферментний кон'югат:** 1 флакон, 11 мл. Готовий до використання.  
Анти-АФП антитіло, кон'юговане з пероксидазою хрому.  
Містить нертутний консервант.
4. **Розчин Субстрату:** 1 флакон, 14 мл. Готовий до використання  
Тетраметилбензидин (ТМБ).
5. **Стоп-розчин:** 1 флакон, 14 мл. Готовий до використання. Містить 0.5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.  
Уникати контакту зі стоп-розчином. Це може викликати подразнення шкіри і опіки.

**Примітка:** За запитом можна додатково замовити *Нульовий стандарт* для розведення зразків.

##### 4.2 Матеріали, що не постачаються

- Відкалібрований мікротитровий зчитувач планшетів (450 нм, з референсною довжиною хвилі від 620 нм до 630 нм).
- Відкалібровані прецизійні мікропіпетки.
- Абсорбуючий папір.
- Дистильована вода.
- Таймер.

– Графічний папір або програмне забезпечення для обробки даних.

#### 4.3 Зберігання і стабільність набору

При зберіганні при температурі 2-8 °C активність реагентів буде збережена до закінчення терміну придатності. Не використовуйте після дати завершення терміну придатності.

Відкриті реагенти повинні зберігатися при 2-8 °C. Мікротитрові лунки повинні зберігатися при 2-8 °C. після відкриття мішечка з фольги, слід його знову щільно закрити.

Розкриті набори зберігають активність протягом 9 тижнів при дотриманні вищевказаних умов зберігання.

#### 4.4 Підготовка реагентів

Перед використанням доведіть всі реагенти та потрібну кількість смужок до кімнатної температури.

#### Стандарти

Розвести ліофілізований вміст флакону зі стандартом з 0,5 мл деіонізованої води і витримати протягом 10 хвилин мінімум. Перемішати кілька разів перед використанням.

**Примітка:** відновлені стандарти стабільні протягом 2-х місяців при температурі від 2 °C до 8 °C. Для більш тривалого зберігання заморозити при -20 °C.

#### 4.5 Утилізація набору

Утилізацію набору необхідно здійснювати відповідно до державних правил. Спеціальна інформація про даний набір надана в Паспорті безпеки.

#### 4.6 Пошкоджені набори

У випадку серйозного пошкодження набору або його компонентів, необхідно проінформувати про це компанію DRG в письмовій формі не пізніше 1 тижня після отримання набору. Сильно пошкоджені окремі компоненти не повинні використовуватися в аналізі. Вони повинні зберігатися до досягнення остаточного рішення. Після цього вони повинні бути знищені згідно з офіційними правилами.

### 5. ЗАБІР ТА ПІДГОТОВКА ЗРАЗКІВ

У даному дослідженні слід використовувати сироватку.

**Примітка:** не використовувати зразки, що містять азид натрію. Не рекомендується використовувати гемолітичні, іктеричні або ліпемічні зразки. Для додаткової інформації дивитися розділ «Інтерферуючі речовини».

**ПРИМІТКА:** Якщо необхідний амніоцентез, забір зразків слід виконати перед пункцією. Після амніотичної пункції визначаються підвищені значення АФП.

#### 5.1 Забір Зразків

##### Сироватка:

Зібрати кров венепункцією (наприклад, Sarstedt Monovette для сироватки), дати згорнутися і відокремити сироватку шляхом центрифугування при кімнатній температурі. Не центрифугувати, поки не відбулося повне згортання. Для зразків крові пацієнтів, що проходять антикоагуляційну терапію, може знадобитися більше часу для згортання.

#### 5.2 Зберігання зразків

Перед дослідженням зразки повинні зберігатися закритими до 7 днів при температурі 2-8 °C. Зразки, що зберігаються протягом тривалого періоду, перед дослідженням необхідно заморозувати тільки один раз при -20 °C. Розморожені зразки перед дослідженням необхідно кілька разів інвертувати.

#### 5.3 Розведення зразків

Якщо в початковому аналізі виявилось, що зразки мають концентрацію більше, ніж найвищий стандарт, їх можна розвести *Стандартом 0* і повторно проаналізувати, як описано в Процедурі аналізу.

Для обчислення концентрацій необхідно враховувати цей додатковий коефіцієнт розведення.

#### Наприклад:

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

### 6. ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗУ

#### 6.1 Загальні зауваження

- Приведіть всі реагенти до кімнатної температури перед початком тесту. Всі реагенти змішуйте не утворюючи піни.
- Після початку тесту всі кроки повинні виконуватися без затримки.
- Використовуйте нові насадки для піпеток перед кожним використанням.
- Оптична щільність залежить від температури і часу інкубації. Тому, перед початком тесту необхідно прослідкувати, щоб все було готовим: ковпачки зняті, реагенти приготовлені, лунки закріплені на тримачі та ін. Це дозволить проводити всі етапи піпетування за однаковій інтервали часу без перерви.
- В загальному, ферментативна реакція лінійно пропорційна часу і температурі.

#### 6.2 Процедура аналізу

Кожна процедура повинна включати калібрувальну криву.

1. Закріпіть необхідну кількість Мікротитрових лунок в тримачі.
2. Піпеткою внеси **25 мкл** кожного **Стандарту, контролю і зразків новими одноразовими наконечниками** у відповідні лунки.
3. Додати **100 мкл Ферментного Кон'югату** в кожен лунку. Ретельно перемішати протягом 10 секунд. Важливо домогтися повного змішування на цьому етапі.
4. Інкубувати **30 хвилин** при кімнатній температурі.
5. Різко витрусити вміст лунок. Промити дистильованою водою **5 разів** (400 мкл на лунку). Різко струсіть лунки над фільтрувальним папером, щоб видалити залишки вологи.  
**Важливе зауваження:** Чутливість і точність цього аналізу залежать від правильного виконання процедури промивання!
6. Додати **100 мкл Розчину Субстрату** в кожен лунку.
7. Інкубувати протягом **10 хвилин** при кімнатній температурі.
8. Зупинити ферментативну реакцію, додавши **50 мкл Стоп-Розчину** в кожен лунку.
9. Виміряти оптичну щільність розчину у кожній лунці при **450 нм (зчитування) та при 620 нм - 630 нм (фонове віднімання, рекомендується)** за допомогою мікротитрового зчитувача планшетів. Рекомендується, щоб лунки зчитати **протягом 10 хвилин** після додавання *Стоп Розчину*.

#### 6.3 Обчислення результатів

1. Обчисліть значення середньої оптичної щільності для кожного набору стандартів, контролів і зразків пацієнтів.
2. Побудуйте стандартну криву, відкладаючи середню абсорбцію на осі Y, отриману для кожного стандарту, проти його концентрації на осі X.
3. Використовуючи середнє значення ОЩ для кожного зразка визначте відповідну концентрацію зі стандартної кривої. Можна використовувати інші методи обробки даних.
4. Автоматичний метод: комп'ютерні програми, що використовують кубічний Сплін, 4 ПЛ або лінійно-логіфімічну. Інші функції зменшення даних можуть дати дещо інші результати.
5. Концентрація зразків може зчитуватися прямо зі стандартної кривої. Зразки з концентрацією вище найвищого стандарту необхідно далі розбавити. Для обчислення концентрації, необхідно враховувати цей фактор розведення.

#### 6.3.1 Приклад типової стандартної кривої

Наступні дані тільки для демонстрації і **не можуть** бути використані замість даних аналізу.

Стандарт	Оптична щільність (450 нм)
Стандарт 0 (0 МО/мл)	0.07
Стандарт 1 (10 МО/мл)	0.21
Стандарт 2 (40 МО/мл)	0.69
Стандарт 3 (80 МО/мл)	1.29
Стандарт 4 (160 МО/мл)	1.97

### 7. ОЧІКУВАНІ НОРМАЛЬНІ ЗНАЧЕННЯ

Настійливо рекомендується, щоб кожна лабораторія визначала свої нормальні і патологічні показники.

У дослідженні, проведеному з використанням DRG AFP ELISA, спостерігаються такі значення:

## 7.1 Нормальні здорові дорослі, невагітні

Нижня межа концентрації АФП в нормальній сироватці становить менше 1 МО/мл; верхня межа становить приблизно 10 МО/мл.

## 7.2 Значення під час вагітності

Тижні вагітності	АФП (МО/мл)	Тижні вагітності	АФП (МО/мл)
10	9-24	19	32-103
11	10-27	20	42-121
12	10-30	21	48-139
13	10-34	22-24	56-224
14	11-45	25-27	95-357
15	14-60	28-30	135-435
16	16-69	31-33	141-423
17	17-78	34-36	121-380
18	22-93	37-40	93-321

## КЛІНІЧНА ВАЖЛИВІСТЬ

- Вміст АФП у материнській сироватці на 16-18 тижнів вагітності перевищував нормальні величини у 2,5 раз в 88% аненцефалії і в 79% відкритої вродженої спинномозкової грижі.
- Концентрація АФП при гепатоцелюлярній карциномі 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.
- АФП може визначатись у сироватці хворих з неонатальним гепатитом і не гепатогенними неоплазмами.

Самі по собі результати не повинні бути єдиною підставою для будь-яких терапевтичних висновків. Результати повинні бути співвіднесені з іншими клінічними спостереженнями і діагностичними тестами.

## 8. КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Хороша лабораторна практика вимагає, щоб контролю виконувались з кожної каліброваною кривою. Статистично значуща кількість контролів повинна аналізуватись для встановлення середніх значень і прийнятних діапазонів для забезпечення належного функціонування.

Рекомендується використовувати контролю згідно державних і федеральних правил. Використання контролю дає можливість щоденної оцінки достовірності результатів. Використовуйте контролю 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 границі 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 помилок, зверніться до Вашого постачальника.

## 9. ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛІЗУ

### 9.1 Динамічний діапазон аналізу

Діапазон аналізу знаходиться в межах 1.78-160 МО/мл.

### 9.2 Специфічність антитіл (Перехресна реактивність)

Наступні речовини були перевірені на перехресну реактивність аналізу:

Білок	Додана концентрація	Перехресна реактивність
HSA	20 мг/мл	0%
Пролактин	200 нг/мл	3.0%
ХГЛ	2000 нг/мл	2.4%
SP-1	2000 нг/мл	0.3%
ПЛ	2,011 мг/мл	3.2%

### 9.3 Чутливість

Аналітична чутливість була вирахована із середнього значення з додаванням двох стандартних відхилень 20 копій Стандарту 0 і становить 1.78 МО/мл.

## 9.4 Точність

### 9.4.1 В аналізі

Варіабельність в межах аналізу наведено нижче:

Зразок	К-сть	Середнє (МО/мл)	КВ (%)
1	20	25.63	3.82
2	20	105.78	5.39
3	20	77.63	3.50

### 9.4.2 Між аналізами

Варіабельність між аналізами (між запусками) наведено нижче:

Зразок	К-сть	Середнє (МО/мл)	КВ (%)
1	32	25.31	3.64
2	32	109.34	6.54
3	32	84.10	6.74

## 9.5 Відновлення

Відновлення набору DRG ELISA було визначено шляхом додавання зростаючої кількості аналіту до трьох сироваток вагітних жінок. Відсотки відтворення визначені шляхом порівняння очікуваних і отриманих значень зразків.

	Зразок 1	Зразок 2	Зразок 3
Концентрація (МО/мл)	11.99	26.96	73.88
Середнє відновлення (%)	91.4	90.7	94.4
Діапазон відновлення (%)	від 88.7	89.0	91.3
	до 94.3	92.7	99.3

## 9.6 Лінійність

Три зразки (сироватки) з різними кількостями аналіту були послідовно розбавлені (до 1:16) нульовим стандартом і проаналізовані набором DRG ELISA. Відсотки відновлення визначені шляхом порівняння очікуваних і отриманих значень для аналіту.

	Зразок 1	Зразок 2	Зразок 3
Концентрація (МО/мл)	39.7	75.6	128.4
Середнє відновлення (%)	102.4	95.7	96.8
Діапазон відновлення (%)	від 92.7	86.2	92.8
	до 114.9	110.1	101.2

## 10. ОБМЕЖЕННЯ ВИКОРИСТАННЯ

Надійні і відтворювані результати будуть отримані, коли процедура аналізу виконується з повним розумінням інструкції і з дотриманням належної лабораторної практики.

Будь-яке неправильне поводження зі зразками або модифікація даного тесту можуть вплинути на результати.

### 10.1 Інтерферуючі речовини

Не впливають на результати гемоглобін (до 4 мг/мл), білірубін (до 0.5 мг/мл) і тригліцериди (до 30 мг/мл).

### 10.2 Вплив лікарських речовин

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

### 10.3 Хук-ефект високої дози

При тестуванні не було виявлено хук-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 контролю знаходяться в указаних межах і якщо інші тестові параметри також відповідають тестовій специфікації. У разі будь-яких сумнівів або занепокоєння, будь ласка, зв'яжіться з DRG.

### 11.2. Терапевтичні висновки

Терапевтичні наслідки ніколи не повинні базуватися лише на лабораторних результатах, навіть якщо всі результати тестів

узгоджуються з предметами, як зазначено в пункті 11.1. Будь-який лабораторний результат - це лише частина загальної клінічної картини пацієнта.

Лише у випадках, коли лабораторні результати узгоджуються із загальною клінічною картиною пацієнта, слід робити терапевтичні висновки.

Сам результат тесту ніколи не повинен бути єдиним фактором, для визначення терапевтичних висновків.

### 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.

Претензії, подані через неправильне тлумачення замовником лабораторних результатів відповідно до пункту 11.2, також є недійсними.

Незалежно від того, у випадку будь-якої претензії, відповідальність виробника не повинна перевищувати вартість тестового набору. Виробник не несе відповідальність за будь-які пошкодження набору під час транспортування.



#### ВИРОБНИК

DRG Інструментс ГмБХ  
вул. Фраунберг 18, 35039  
м. Марбург, Німеччина  
Тел: +49(0)64 21/170 00  
Факс: +49(0)64 21/17 00 50  
[www.drq-diagnostics.de](http://www.drq-diagnostics.de)  
e-mail: [drq@drq-diagnostics.de](mailto:drq@drq-diagnostics.de)



#### УПОВНОВАЖЕНИЙ ПРЕДСТАВНИК

ТОВ «ДІАМЕБ ТРЕЙД»  
вул. Симона Петлюри, 25  
м. Івано-Франківськ, 76014  
тел.: +38 (0342) 775 122  
факс: +38 (0342) 775 123  
e-mail: [info@diameb.ua](mailto:info@diameb.ua)  
[www.diameb.ua](http://www.diameb.ua)

