

کیت اندازه گیری AFP در سرم انسان
AFP ELISA Kit 96t
Cat. No: 1124-96 / Rev: A2 (1402/04/17)

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 کارسینومای 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 ه 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 (سوبسترای 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 (نمودار کالیبراتورها) 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، ۲۵۰ و ۵۰۰ 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 سمپلرهای 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 بالای 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 حداکثر 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: محلول های رنگزای A و B را با حجم های مساوی (۱:۱) مخلوط کنید (به عنوان مثال، برای تهیه ۲ میلی لیتر محلول آماده مصرف، ۱ میلی لیتر از محلول رنگزا A را به ۱ میلی لیتر

از محلول رنگزا B اضافه کنید) و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه کنید. 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. کالیبراتورها، 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 کالیبراتورها، 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. توجه: چاهک اول به عنوان بلانک در نظر گرفته شود. در این چاهک نمونه، کنترل و یا کالیبراتور ریخته نشود. بقیه مراحل با سایر چاهک ها یکسان می باشد.
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 بزنید. به منظور انجام شستشوی مناسب و استاندارد چاهک ها، مطابق با فیلم قرار داده شده در وب سایت 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.

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

No	Sample (ng/mL)	1/2	1/4	1/8	1/16
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 $100 \pm 10\%$ 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

(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.

پارامترهای کنترل کیفی

(۱) بررسی دقت - آزمون دقت درون دور (Within Run)

دقت درون دور با ارزیابی تکرارپذیری نتایج حاصل از سه نمونه سرم با غلظت‌های متفاوت در یک نوبت کاری (۲۰ بار تکرار برای هر نمونه) بررسی 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)	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 بین دور (Between Run)

دقت بین دور با ارزیابی تجدیدپذیری نتایج حاصل از سه نمونه سرم با غلظت‌های متفاوت در ۴ نوبت کاری (۵ بار تکرار برای هر نمونه در هر نوبت کاری) 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 به عنوان 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)

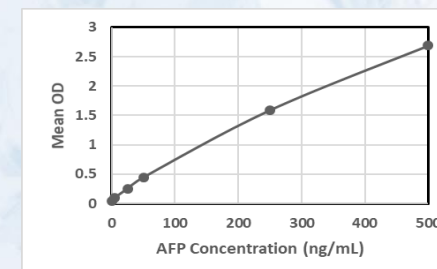
در این تست غلظت AFP در رقت‌های مختلف نمونه سرم برای تعیین خطی بودن کیت اندازه‌گیری شد. معیار پذیرش در این آزمایش $\text{Bias} < 11.22\%$ است.

توجه: اگر بالاترین میزان جذب نوری کالیبراتور کمتر از ۲ به دست آمد، می‌توانید زمان انکوباسیون محلول رنگزا را به مدت ۱۰ دقیقه افزایش دهید.

(۷) حجم ۵۰ میکرولیتر محلول متوقف‌کننده به تمام چاهک‌ها اضافه کنید و پلیت را به مدت ۲۰ ثانیه به آرامی تکان دهید تا تمام رنگ آبی آن به زرد تبدیل شود.

(۸) مقدار جذب نوری را برای هر چاهک در طول موج ۴۵۰ نانومتر با استفاده از متد Point to Point حداکثر تا ۱۵ دقیقه بعد از متوقف کردن واکنش بخوانید. از طول موج ۶۲۰ تا ۶۳۰ نانومتر استفاده کنید. میزان جذب و نمودار کالیبراتورهای این کیت به عنوان 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 مصرف کننده تعیین گردد.

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