

# PATHOZYME<sup>®</sup> ALPHA-FETOPROTEIN Ref OD307

## Immunoenzymatyczny test (EIA) do ilościowego oznaczania AFP w ludzkiej surowicy. Przechowywać w temp. 2°C - 8°C. NIE ZAMRAŻAĆ. Do diagnostyki "in vitro".

### WPROWADZENIE

Alfa fetoproteina jest produkowana przez płód w wątrobie i pęcherzyku żółtkowym. Po urodzeniu poziom AFP w surowicy spada do ledwie oznaczalnego poziomu w ciągu pierwszego roku życia. Wzrost poziomu AFP w surowicy u kobiet nie będących w ciąży może być wskaźnikiem nowotworu wątroby lub jądra. W czasie ciąży poziom AFP w surowicy matki wzrasta na skutek produkcji AFP przez płód.

AFP jest glikoproteiną o masie cząsteczkowej 70000 Da. We wszystkich przypadkach przerzutów nowotworów wątroby występuje wzrost poziomu AFP. Wzrost poziomu AFP występuje również w 50% przypadków z nienasiennikowatym nowotworem jądra. W innych nowotworach takich jak: trzustki, żołądka, okrężnicy i płuc może wystąpić podwyższony poziom AFP. W niewielkiej ilości nowotworów złośliwych (5-10%) takich jak zapalenie wątroby i marskość wątroby poziom AFP w surowicy może być również podwyższony.

Najwyższy poziom AFP występuje w 30 tygodniu ciąży. Po tym okresie stężenie AFP gwałtownie spada i w 36 tygodniu nie przekracza 2% powyżej wartości prawidłowej. Szczególnie wysoki wzrost poziomu AFP może wskazywać na ciążę mnogą, martwy płód czy wady rozwojowe. Natomiast jego niski poziom wskazuje na obecność zespołu Down'a, samoistne poronienie czy łańszad gromadzący w macicy.

### PRZEZNACZENIE

**PATHOZYME AFP** jest testem, w którym wykorzystano metodę immunoenzymatyczną (EIA) do ilościowego oznaczania alfa-fetoproteiny (AFP) w ludzkiej surowicy. Do użytku w laboratorium.

### ZASADA

Kubeczki mikroplastyki opłaszczane są specyficznymi, króliczymi przeciwciałami anti-AFP. Do testu należy użyć surowicy, która na wstępie jest inkubowana z buforem zero. Następnie dodawane są monoklonalne przeciwciała anti-AFP znakowane peroksydazą chrzanową (koniugat enzymatyczny). AFP obecna w surowicy badanego pacjenta wiąże się z przeciwciałami opłaszczonymi na ściankach kubeczka. Dodany do kubeczka koniugat enzymatyczny, również ulega przyłączeniu, tworząc tzw. kanapkę. Po inkubacji, nadmiar koniugatu zostaje odpłukany. Dodanie substratu (TMB) inicjuje reakcję barwną, która pojawia się w tych kubeczkach, w których obecny jest związany koniugat enzymatyczny, wskazujący na obecność AFP w badanej próbce. Zatrzymanie reakcji enzymatycznej następuje po dodaniu rozcieńzonego kwasu solnego, a pomiar absorbancji dokonywany jest przy długości fali 450 nm. Stężenie AFP jest wprost proporcjonalne do intensywności powstałego zabarwienia.

Test został wykalibrowany względem wewnętrznego standardu. Nie ma międzynarodowego wzorca dla tego testu.

### SKŁAD ZESTAWU

Ref  
OD307



Microtitre Plate	12 X 8 wells x 1
Dzielną mikroplastyką z kubeczkami opłaszczonymi specyficznymi przeciwciałami, umieszczoną w foliowej torebce ze środkiem pochłaniającym wilgoć.	
Cal A 0 ng/ml	0.5 ml
Standard referencyjny: ludzka surowica pozbawiona AFP. Gotowy do użycia. (Bezbarwny).	
Cal B 5 ng/ml	0.5 ml
Standard referencyjny: AFP rozpuszczone w ludzkiej surowicy. Gotowy do użycia. (Bezbarwny).	
Cal C 20 ng/ml	0.5 ml
Standard referencyjny: AFP rozpuszczone w ludzkiej surowicy. Gotowy do użycia. (Bezbarwny).	
Cal D 50 ng/ml	0.5 ml
Standard referencyjny: AFP rozpuszczone w ludzkiej surowicy. Gotowy do użycia. (Bezbarwny).	
Cal E 150 ng/ml	0.5 ml
Standard referencyjny: AFP rozpuszczone w ludzkiej surowicy. Gotowy do użycia. (Bezbarwny).	
Cal F 300 ng/ml	0.5 ml
Standard referencyjny: AFP rozpuszczone w ludzkiej surowicy. Gotowy do użycia. (Bezbarwny).	
Conj	17 ml
Anti-AFP HRP Koniugat: koniugat anti-AFP znakowany HRP. Gotowy do użycia. (Różowy)	
Buf AS	11 ml
Bufor zero: bufor fosforanowy zawierający #stabilizatory białkowe. Gotowy do użycia. (Żółty)	
Subs TMB	11 ml
Roztwór substratu: 3,3', 5,5' tetrametylobenzidyna w buforze octanowym. Gotowy do użycia. (Bezbarwny)	
Soln Stop HCl 1M	11ml
Odczynnik zatrzymujący reakcję: kwas solny rozcieńczony w czystej wodzie. Gotowy do użycia. (Bezbarwny)	

Instrukcja i druk protokołu 1 + 1

### MATERIAŁY WYMAGANE DO WYKONANIA OZNACZENIA, NIE ZAŁĄCZONE DO ZESTAWU

Pipety: 100µl, 200µl i 1000µl.  
Końcówki do pipet.  
Papier absorbacyjny.  
Czytnik mikroplastyk z filtrem 450 nm.  
Papier milimetry.  
Dokładnie umyte szkło laboratoryjne.

### ŚRODKI OSTROŻNOŚCI

Zestaw **PATHOZYME AFP** zawiera materiał pochodzenia ludzkiego. Wykonano badania na obecność przeciwciał HCV, HIV I i II – wynik negatywny oraz HBsAg zgodnie z zatwierdzonymi przez FDA procedurami. Ponieważ żadne znane procedury nie dają całkowitej pewności, iż pozyskany materiał pochodzenia ludzkiego nie zawiera innych czynników zakaźnych, produkt należy traktować jako potencjalnie zakaźny i zaleca się obchodzić z nim ze szczególną ostrożnością i uwagą. Zaleca się również zachowanie środków ostrożności przy wykonywaniu oznaczenia traktując wszystkie odczynniki jako potencjalnie zakaźne. Nie spożywać.

Zestaw **PATHOZYME AFP** nie zawiera substancji niebezpiecznych sklasyfikowanych przez aktualne, brytyjskie regulacje dotyczące substancji chemicznych. Jednakże zaleca się aby wszystkie odczynniki traktować jako potencjalny materiał niebezpieczny. Wszystkie zalecenia muszą być zgodne z lokalnymi rozporządzeniami.

Zestaw **PATHOZYME AFP** zawiera rozcieńczony kwas solny jako odczynnik zatrzymujący reakcję – środek żrący. Używać z zachowaniem środków ostrożności. W przypadku kontaktu splukać obficie wodą.

Odczynniki wchodzące w skład zestawu **PATHOZYME AFP** zawierają 1% Proclin™ 300\* jako konserwant, który może być środkiem toksycznym jeśli zostanie spożyty. W przypadku kontaktu splukać obficie wodą i udać się do pomocy medycznej.

\*Proclin™ 300 jest chroniony znakiem towarowym firmy ROHM & HAAS Limited.

### PRZECHOWYWANIE

Odczynniki muszą być przechowywane w temperaturze 2°C - 8°C.

Test będzie spełniał standardy jakości podane w specyfikacji do końca daty ważności, która jest podana na zestawie i poszczególnych składnikach. Data ważności to ostatni dzień miesiąca podany na buteleczce i etykiecie zestawu. Nie używać odczynników przeterminowanych.

Nie poddawać odczynników działaniu zbyt wysokiej temperatury. Unikać wystawiania na bezpośrednie działanie światła słonecznego.

NIE ZAMRAŻAĆ ODCZYNNIKÓW (z wyjątkiem standardów) – zamrożenie powoduje nieodwracalny rozkład.

### PRZYGOTOWANIE I PRZECHOWYWANIE PRÓBK

Pobrać próbkę krwi żyłnej, odstawić do wykrzepnięcia i oddzielenia surowicy. Odwirować wykrzepioną krew i odciągnąć surowicę. Zaleca się używać świeżą surowicę.

Nie używać do badania próbek zhemolizowanych, mętnych lub lipemicznych, powyższe może fałszować wyniki.

Próbki mogą być przechowywane do 48 godzin w temperaturze 2°C - 8°C. W przypadku dłuższego przechowywania, próbkę zamrozić w temp. - 20°C (możliwość przechowywania do 1 roku). Rozmrożoną próbkę wymieszać przed wykonaniem oznaczenia.

Nie używać azydki sodowej jako konserwantu, może hamować aktywność enzymu peroksydazy.

Unikać wielokrotnego zamrażania i rozmrażania próbek, powyższe może fałszować wyniki.

### PRZYGOTOWANIE ODCZYNNIKÓW

Przed użyciem wszystkie odczynniki doprowadzić do temperatury pokojowej (20°C - 25°C) i delikatnie wymieszać. Unikać spienienia.

### OGRANICZENIA

Test jest nieważny jeżeli do badania użyto innego materiału niż surowica. Żadna modyfikacja procedury nie jest dozwolona. Interpretacja uzyskanych wyników powinna być przeprowadzona w oparciu o wywiad lekarski. Diagnostyka nie może być oparta wyłącznie o jedno badanie kliniczne.

## PROCEDURA

1. Przed wykonaniem oznaczenia wszystkie odczynniki i próbki badane doprowadzić do temperatury pokojowej (20°C - 25°C).
2. Do każdej serii badań należy nastawić nową krzywą kalibracyjną. Umieścić odpowiednią ilość kubeczków w ramce mikropyłki. Zanotować pozycje standardów i próbek badanych na druku protokołu załączonym do zestawu.
3. Nie używane kubeczki umieścić w szczelnie zamkniętej foliowej torebce ze środkami pochłaniającymi wilgoć i ponownie włożyć do lodówki (2°C - 8°C).
4. Do odpowiednich kubeczków odpipetować po 20µl standardów i próbek badanych.
5. Do każdego kubeczka dodać po 100µl buforu zero i mieszać delikatnie przez 30 sekund. Ten etap jest ważny dla procedury.
6. Inkubować 30 minut w temperaturze pokojowej (20°C - 25°C).
7. Po zakończeniu inkubacji wylać zawartość z kubeczków do pojemnika na odpady. Osuszyć kubeczki kładąc je do góry dnem na papierze absorbującym. Upewnić się czy w pojemniku na zlewki znajduje się odpowiedni środek odkazający.
8. Ręczne płukanie: napełnić kubeczki wodą destylowaną, do każdego kubeczka nalać minimum 300µl. Wyrzucić zawartość z kubeczków do pojemnika na odpady. Osuszyć kubeczki kładąc je do góry dnem na papierze absorbującym. Przemyc puste kubeczki 5-krotnie wodą destylowaną.
9. Energicznie uderzać kubeczkami na papierze absorbującym lub papierowym ręczniku, tak aby usunąć resztki wody.
10. Płukanie przy użyciu płuczki automatycznej: upewnić się, że płuczka dozuje 300µl płynu na każdy kubeczek oraz czy do pojemnika na zlewki został dodany odpowiedni środek odkazający. Przemyc puste kubeczki 5-krotnie wodą destylowaną. Po zakończeniu płukania usunąć resztki płynu poprzez energiczne uderzenie kubeczkami na papierze absorbującym lub papierowym ręczniku.
11. Do każdego kubeczka dodać po 150µl anti-AFP koniugatu i delikatnie mieszać przez 5 sekund.
12. Inkubować 30 minut w temperaturze pokojowej (20°C - 25°C).
13. Przemyc kubeczki jak podano powyżej.
14. Do wszystkich kubeczków dodać po 100 µl roztworu substratu i delikatnie mieszać przez 5 sekund.
15. Inkubować 20 minut w ciemnym miejscu w temperaturze pokojowej (20°C - 25°C).
16. Zatrzymać reakcję przez dodanie do każdego kubeczka po 100 µl odczynnika zatrzymującego reakcję.
17. Delikatnie mieszać przez 30 sekund. Upewnić się, że barwa niebieska całkowicie uległa zmianie na barwę żółtą.
18. Natychmiast odczytać wartości absorbancji (w czasie nie dłuższym niż 10 minut) na czytniku mikropyłek przy długości fali 450 nm.

## WYKRYWANIE I USUWANIE BŁĘDÓW

Test jest przeznaczony do użycia przez laboranta z minimum doświadczenia analitycznego.

Nie używać rozłożonych lub zanieczyszczonych odczynników.

Do pipetowania surowic używać jednorazowych końcówek w celu uniknięcia wzajemnego zanieczyszczenia próbek.

Zalecane jest nastawianie kalibratorów i próbek badanych w dubletach, chociaż nie koniecznie wymagane.

Próbki badane i kalibratory powinny być pipetowane z zachowaniem jednakowych warunków przeprowadzenia analizy.

Zaleca się nastawianie jednorazowo nie więcej niż 32 kubeczków w przypadku ręcznego pipetowania, pipetowanie standardów i próbek badanych powinno być zakończone w ciągu 3 minut. Nastawienie całej mikropyłki (96 kubeczków) jest możliwe w przypadku automatycznego pipetowania.

Po użyciu każdego odczynnika natychmiast zamknąć buteleczkę odpowiednią nakrętką.

Unikać wielokrotnego pipetowania (wielokrotnego otwierania) odczynników pobranych z magazynu – może to być przyczyną ich zanieczyszczenia.

Nie mieszać odczynników lub opłaszczonych kubeczków mikropyłki z różnych zestawów. Zachować szczególną uwagę aby nie dotykać ścian kubeczków w trakcie ich rozdzielania.

Nie dopuścić aby odczynniki podczas pipetowania spływały po ściankach kubeczków. Przed wykonaniem oznaczenia przenieść wszystkie odczynniki do temperatury pokojowej (20°C - 25°C). Delikatnie wymieszać wszystkie odczynniki poprzez delikatne odwracanie lub obracanie.

Raz rozpoczęta procedura powinna być kontynuowana tak, aby podczas wykonywania oznaczenia kubeczki nie zostały wysuszone.

Nie zanieczyszczać roztworu substratu, może to spowodować, że cały zestaw nie będzie aktywny.

Sprawdzić precyzję i dokładność sprzętu laboratoryjnego używanego podczas procedury wykonania oznaczenia tak, aby być pewnym odzwierciedlenia wyników.

Nie używane paski, przed ponownym włożeniem do lodówki (temp. 2°C - 8°C), powinny być szczelnie zamknięte (zamknięcie typu zip-lock) w foliowej torebce ze środkiem pochłaniającym wilgoć

## OBLICZANIE WYNIKÓW

Obliczyć średnią wartość absorbancji ( $A_{450}$ ) dla każdego kalibratora i próbek badanych. Wykreślić krzywą kalibracyjną na papierze milimetrowym odkładając na osi X: stężenia poszczególnych kalibratorów wyrażone w jednostkach ng/ml, a na osi Y: odpowiadające im wartości absorbancji. Z wykresu krzywej kalibracyjnej odczytać wartości AFP dla próbek badanych. Do odczytu użyć wyliczone wartości średnie. Jeżeli wyniki kontroli lub znanych próbek badanych nie dają oczekiwanych wartości test należy uznać za nieważny.

Jeśli do obliczeń używamy aparatury z oprogramowaniem wówczas krzywą kalibracyjną obliczyć w oparciu o krzywą regresji.

## WARTOŚCI OCZEKIWANE I CZUŁOŚĆ

Uzyskana krzywa kalibracyjna powinna mieć kształt hiperboliczny zależny proporcjonalnie od uzyskanych wartości absorbancji w stosunku do odpowiednich wartości stężeń kalibratorów. Test można uznać za ważny jeżeli wartość absorbancji kalibratora A jest mniejsza niż 0,75, a wartość absorbancji kalibratora F jest większa niż 1,5.

U pacjentów wysokiego ryzyka, wartości AFP pomiędzy 100ng/ml a 350 ng/ml wskazują na nowotwór komórek wrotobowych a poziom powyżej 350ng/ml zwykle wskazuje na chorobę. U około 97% zdrowych ludzi poziom AFP jest niższy niż 8.5 ng/ml. Zalecane jest aby każde laboratorium ustaliło własne zakresy wartości prawidłowych. Minimalne wykrywane testem **PATHOZYME AFP** stężenie AFP wynosi 2.0 ng/ml.

## OCENA WYNIKÓW

Test kalibrowano względem innych uznanych testów konkurencyjnych oraz względem wewnętrznych standardów.

Współczynnik zmienności dla testu **PATHOZYME AFP** jest mniejszy lub równy 10%.

Dla porównania testów Omega Pathozyme AFP kit i Abbott AxSym Kit użyto próbek o wartościach AFP pomiędzy 15.6 ng/ml a 330 ng/ml i uzyskano następujące wyniki.

Liczba próbek badanych	79
Współczynnik zmienności	0.965
Wartość nachylenia krzywej	1.038
Punkt przecięcia z osią OY	0.729
Wartość średnia testem Omega	55.12 ng/ml
Wartość średnia testem Abbott	52.24 ng/ml

Testy wykazują dobrą korelację.

## PIŚMIENNICTWO

- (1) **Abelev, G. I.** Alpha-fetoprotein as a marker of embryo-specific differentiation in normal and human tissues. *Transplant. Rev.* 1974;20:3-37.
- (2) **Hirai, H.** Alpha-fetoprotein, in: Chu, T. M. (ed.). *Biochemical markers for Cancer.* New York: Marcel Dekker 1982;23-59.
- (3) **Chan, D. W., Miao, Y. C.** Affinity chromatographic separation of alpha-fetoprotein variants: Development of a mini-column procedure and application to cancer patients. *Clin. Chem.* 1986;32:2143-2146.
- (4) **Sell, L. S.** Cancer markers of the 1990s. *Clin. Lab. Med.* 1990;10:1-37.
- (5) **Hirai, H., Nishi, S., Watabe H. et al.** Some chemical, experimental and clinical investigations on alpha-fetoprotein. In: Hirai, H., Miyaji, T. (eds.). *Alpha-fetoprotein and hepatoma.* Gann. Monogr. 1973;14:19-34.

## SKRÓCONA WERSJA WYKONANIA OZNACZENIA

1. Do odpowiednich kubeczków odpipetować po 20µl standardów oraz próbek badanych i po 100µl buforu zero. Delikatnie mieszać przez 30 sekund.
2. Inkubować 30 minut w temperaturze pokojowej (20°C - 25°C).
3. Wylać zawartość z kubeczków i przemyc 5-krotnie wodą destylowaną.
4. Do każdego kubeczka dodać po 150µl koniugatu anti-AFP. Delikatnie mieszać przez 5 sekund.
5. Inkubować 30 minut w temperaturze pokojowej (20°C - 25°C).
6. Wylać zawartość z kubeczków i przemyc 5-krotnie wodą destylowaną.
7. Do każdego kubeczka dodać po 100µl roztworu substratu i delikatnie mieszać przez 5 sekund.
8. Inkubować 20 minut w ciemnym miejscu w temperaturze pokojowej (20°C - 25°C).
9. Do każdego kubeczka dodać po 100µl odczynnika zatrzymującego reakcję i delikatnie mieszać przez 30 sekund.
10. Natychmiast odczytać wartość absorbancji (w czasie nie dłuższym niż 10 minut) przy użyciu czytnika płytek przy długości fali 450 nm.

8080 ISSUE 5 Revised March 2011

© Omega Diagnostics Ltd 2011. **POLISH**



OMEGA DIAGNOSTICS LTD  
Omega House, Hillfoots Business Village  
Alva, FK12 5DQ, Scotland, United Kingdom  
odl@omegadiagnostics.co.uk  
www.omegadiagnostics.com  
AN ISO 9001 AND 13485 CERTIFIED COMPANY