

PATHOZYME[®] ALPHA-FETOPROTEIN Ref OD307

Test Imuno-Enzimatic (EIA) pentru determinarea cantitativă a alfafetoproteinei (AFP) în serul uman

Depozitați la 2°C - 8°C . NU CONGELAȚI.

Doar pentru diagnostic in-vitro.

INTRODUCERE

Alfafetoproteina este produsă de făt în ficat și în sacul amniotic. După naștere, nivelurile serice de AFP scad până când ajung la niveluri abia detectabile în decursul primului an de viață. O creștere în nivelurile serice de AFP la femeile non-gravide și la bărbați poate indica prezența cancerului hepatic sau testicular. În sarcină, nivelurile serice maternale de AFP sunt crescute datorită producției fetale de AFP.

Alfa-Fetoproteina este o glicoproteină cu o greutate moleculară de aproximativ 70.000 daltoni. În toate cazurile de carcinom hepatic metastatic nivelurile serice de AFP sunt crescute. La 50% din cancerul testicular non-seminomatos, nivelurile de AFP vor fi de asemenea crescute. Alte cancere precum cel de pancreas, stomac, colon și plămân, pot determina niveluri crescute de AFP. Într-o mai mică proporție, afecțiuni non-maligne (5-10%) precum hepatita și ciroza hepatică pot determina niveluri crescute de AFP.

În serul matern, AFP ajunge la valoarea maximă într-un interval de 30 de săptămâni. După acest punct, AFP scade rapid, în așa fel încât în cea de-a 36 săptămână nivelul de AFP este mai mic de 2% din nivelul maxim. Niveluri deosebit de mari de AFP pot indica o sarcină multiplă, moarte fetală, defecte de tub neural și altele. Niveluri scăzute de AFP matern pot indica un sindrom Down, avort spontan, sarcină molară sau alte afecțiuni.

UTILIZARE

PATHOZYME AFP este un test Imuno-Enzimatic (EIA) pentru determinarea cantitativă a Alfa-Fetoproteinei (AFP) în serul uman. A fi folosit doar de personalul medical.

PRINCIPIUL TESTULUI

Anticorpii de iepure specifici anti-AFP sunt pregătiți, purificați și fixați de godeuri de microtitrare. Serul de testat este aplicat și incubat cu Tampon Zero. Dacă în probă este prezentă AFP umană, se va lega de anticorpii din godeuri. Materialul nelegat este spălat și se adaugă anticorpi de soarece monoclonali anti-AFP marcați cu peroxidază de hrean (conjugat). Conjugatul se leagă de AFP care la rândul său este legat de anticorpi. Materialul nelegat este spălat.

La adăugarea substratului (TMB), va apare o modificare de culoare în godeurile în care este prezentă enzima, indicând astfel prezența AFP. Reacția enzimatică este oprită prin adăugarea de acid clorhidric diluat, iar absorbanta este apoi măsurată la 450nm. Concentrația de AFP este direct proporțională cu intensitatea culorii probelor de testat. Acest test a fost calibrat pe baza standardelor interne. Nu există un Standard Internațional pentru acest test.

CONȚINUT

Ref
OD307



12 x 8 godeuri x 1

| Microtitre Plate | | |
|--|------|--------------------|
| Godeuri detașabile "invelite" cu anticorpi specifici, ambalate într-o pungă de folie împreună cu un desiccant. | | 12 x 8 godeuri x 1 |
| Cal | A | 0 ng/ml |
| Referință Standard: Ser uman fără AFP. Gata de lucru (Incolor) | | |
| Cal | B | 5 ng/ml |
| Referință Standard: AFP diluat în ser uman. Gata de lucru (Incolor) | | |
| Cal | C | 20 ng/ml |
| Referință Standard: AFP diluat în ser uman. Gata de lucru (Incolor) | | |
| Cal | D | 50 ng/ml |
| Referință Standard: AFP diluat în ser uman. Gata de lucru (Incolor) | | |
| Cal | E | 150 ng/ml |
| Referință Standard: AFP diluat în ser uman. Gata de lucru (Incolor) | | |
| Cal | F | 300 ng/ml |
| Referință Standard: AFP diluat în ser uman. Gata de lucru (Incolor) | | |
| Conj | | |
| Conjugat HRP, Anticorpi anti-AFP conjugați de HRP. Gata de utilizare (Roz). | | |
| Buf | AS | |
| Tampon Zero: Tampon pe bază de fosfat conținând proteine de stabilizare. Gata de lucru. (Galben) | | |
| Subs | TMB | |
| Soluție Substrat: 3,3', 5,5' Tetrametil Benzidină în tampon citrat. Gata de lucru (Incolor) | | |
| Solin | Stop | HCl |
| Soluție stopare: Acid clorhidric diluat în apă purificată. Gata de lucru. (Incolor). | | |
| Broșură instrucțiuni și Fișa de Înregistrare date EIA: | | |
| | | 1 + 1 |

MATERIALE NECESARE DAR CARE NU SUNT PREZENTE ÎN KIT

Micropipete: 100μl, 200μl și 1000μl
Vîrfuri de pipetă de unică folosință
Hîrtie absorbantă
Cititor microplăci cu filtru de 450nm.
Hîrtie pentru grafic (milimetrică)
Sticlărie de laborator foarte curată.

PRECAUȚIUNI

PATHOZYME AFP conține materiale de origine umană care au fost testate și confirmate negative prin proceduri aprobate de FDA pentru anticorpi HCV, HIV 1 și II și pentru HbsAg, la nivel de donor unic. Deoarece nici un test nu poate oferi o garanție completă că produsele derivate din surse umane nu vor transmite agenți infecțioși, se recomandă ca reactivii din acest kit să fie manipulați cu grijă și atenția corespunzătoare atât în timpul utilizării cit și sunt deșeuri. Nu ingerați.

Reactivii PATHOZYME AFP nu conțin substanțe periculoase așa cum sunt definite de legislația Chimică a Marii Britanii (Informații și Ambalare substanțe periculoase pentru Furnizare). Toți reactivii trebuie totuși tratați ca substanțe cu potențial risc biologic atât cînd sunt folosite cit și cînd sunt deșeuri. Rezolvarea finală a deșeurilor trebuie făcută în conformitate cu legislația locală.

Soluția de Stopare PATHOZYME AFP este acid clorhidric diluat și este deci corozivă. Manipulați cu grijă. În caz de contact cu tegumentul spălați cu grijă cu apă.

Reactivii PATHOZYME AFP conțin Proclin™ 300* în concentrație de 1% ca și conservant. Este toxică atunci cînd este ingerată. În caz de contact, spălați bine cu apă de la robinet și consultați un medic.
* Proclin™ 300 este o marcă înregistrată a ROHM & HAAS Limited.

DEPOZITARE

Reactivii trebuie depozitați la temperaturi de 2°C - 8°C.

Data expirării este ultima zi a lunii menționată pe eticheta recipientului și pe ambalajul kit-ului. Performanța kit-ului va fi cea specificată pînă la data expirării menționată așa cum este determinată de la data producerii și după cum este menționat pe kit și componentele acestuia. Nu folosiți reactivii după data expirării.

Evitați expunerea reactivilor la temperatură excesivă. Nu expuneți reactivii la lumina directă a soarelui.

NU CONGELAȚI NICI UN REACTIV (cu excepția depozitării standardelor) deoarece acesta va fi iremediabil alterat.

RECOLTAREA ȘI PREGĂTIREA PROBEI

Recoltați o probă de sînge venos de la pacient și lăsați să se formeze și retracte cheagul. Centrifugați proba de sînge coagulat și colectați serul limpede. Este nevoie de ser proaspăt.

Nu folosiți pentru testare ser hemolizat, contaminat sau lipemic deoarece acestea va influența nedorit rezultatele.

Serul poate fi depozitat la 2°C - 8°C timp de 48 de ore înainte de testare. Dacă este nevoie de o depozitare pe durată mai lungă, puteți păstra serul la -20°C pe o durată de 1 an. Probele decongelate trebuie amestecate bine înainte de a fi utilizate.

Nu folosiți ca și conservant Azida sodică deoarece aceasta va inhiba sistemul enzimatic Peroxidază.

Nu congelați-decongelați în mod repetat probele – veți obține rezultate false.

PREGĂTIREA REACTIVILOR

Toți reactivii trebuie lăsați să ajungă la temperatura camerei (20°C-25°C) și amestecați ușor pentru a resuspenda latex-ul înainte de utilizare. Evitați formarea spumei.

LIMITELE PROCEDURII

Folosirea altor tipuri de probe, altele decît serul nu a fost validată pentru acest test. Nu există protocol de reutilizare pentru acest produs. Atunci cînd faceți interpretarea testului este recomandat să luați în considerare toate datele clinice. Diagnosticul nu trebuie să fie stabilit doar pe baza rezultatelor unui singur test clinic.

PROCEDURA DE TESTARE

1. Aduceți toate componentele kit-ului și serul de testat la temperatura camerei (20°C-25°C) înainte de a începe testarea.
2. Se recomandă rularea unui set de standarde la fiecare procesare de probe. Fixați numărul dorit de godeuri în stativ. Înregistrați poziția standardelor și a serului de testat pe Fișa de Înregistrare a Datelor EIA.
3. Stripurile nefolosite trebuie resigilate în punga de folie conținând desicant și plasate apoi la 2°C - 8°C.
4. Pipetați 20μl de ser de testat și de standarde în godeurile stabilite.
5. Pipetați 100μl de Tampon Zero în fiecare godeu și amestecați viguros timp de 30 de secunde. Este foarte important să amestecați complet.
6. Incubați placa timp de 60 de minute la temperatura camerei (20°C-25°C).
7. La sfârșitul perioadei de incubare, aruncați conținutul godeurilor răsturnând brusc conținutul plăcii cu partea superioară în jos deasupra unui container de deșeuri cu risc biologic și apoi loviți placa (cu partea superioară în jos) pe o bucată de hirtie absorbantă. Aveți grijă ca în recipientul pentru deșeuri să se afle un dezinfectant corespunzător.
8. Spălare Manuală. Umpleți godeurile cu minimum 300μl de apă distilată pentru fiecare godeu. Întoarceți brusc placa deasupra recipientului de deșeuri biologice. Loviți placa de hirtie absorbantă. Spălați godeurile goale de 5 ori cu apă distilată.
9. Loviți din nou placa (cu partea superioară în jos) de o bucată de hirtie absorbantă pentru a îndepărta toate picăturile de apă reziduală.
10. Spălare Automată: controlați ca 300μl de apă distilată să fie pipetați în fiecare godeu și că în recipientul cu deșeuri este adăugat un dezinfectant potrivit. Spălați godeurile de 5 ori. După ce spălați, îndepărtați excesul de lichid lovind placa inversată de o hirtie absorbantă.
11. Pipetați 150μl de conjugat anti-AFP HRP în fiecare godeu și amestecați ușor timp de 5 secunde.
12. Incubați timp de 30 de minute la temperatura camerei (20°C-25°C).
13. Spălați godeurile așa cum se descrie mai sus.
14. Pipetați 100μl de soluție substrat în fiecare godeu și amestecați ușor timp de 5 secunde.
15. Incubați la întuneric timp de 20 de minute la temperatura camerei (20°C-25°C).
16. Opriți reacția adăugând 100μl de Soluție Stopare în fiecare godeu.
17. Amestecați ușor timp de 30 de secunde până când culoarea albastră se modifică în galben.
18. Citiți imediat densitatea optică (nu mai târziu de 10 minute) folosind un cititor de microplăci cu un filtru de 450nm.

EVITAREA ERORILOR

Poate fi folosit de personalul cu minimă pregătire bazică de laborator.

Nu folosiți componente ale kit-ului care sunt deteriorate sau contaminate.

Deși nu este necesară se recomandă rularea probelor și standardelor în duplicat.

Probele și standardele trebuie rulate simultan pentru a avea condiții de testare similare.

Se recomandă să nu folosiți mai mult de 32 de godeuri odată atunci când pipetați manual, deoarece pipetarea Standardelor și probelor trebuie să fie completă în decurs de 3 minute. Se poate folosi o placă completă de 96 de godeuri doar dacă este disponibilă pipetarea automată.

Folosiți un vîrf de pipetă de unică folosință pentru fiecare probă pentru a preveni contaminarea încrucișată.

Puneți la loc capacul pe recipientele cu reactivi imediat după utilizare.

Evitați pipetarea repetată din reactivii de stoc, deoarece se poate produce contaminare.

Nu amestecați reactivii sau stripurile provenind de la kit-uri diferite. Atunci când pipetați aveți grijă să nu atingeți suprafața godeului. Nu pipetați reactivul pe partea laterală a godeului. Înainte de începutul testării, lăsați reactivii să ajungă la temperatura camerei (20° - 25°C). Amestecați ușor toți reactivii cu mișcări blinde de rotație.

Odată testarea pornită, godeurile nu trebuie să se usuce în cursul derulării testului.

Nu contaminați Soluția Substrat deoarece kit-ul va deveni nefuncțional.

Controlați precizia și acuratețea echipamentului de laborator folosit în timpul procedurii pentru a asigura rezultate reproductibile.

Strip-urile nefolosite ar trebui re-sigilate în punga de folie care conține desicant și apoi depozitate la 2°C - 8°C.

CALCULAREA REZULTATELOR

Calculați valoarea absorbantei medii (A_{550}) pentru fiecare set de standarde și probe. Creați o curbă standard făcînd un grafic cu absorbanta medie pentru fiecare Standard în funcție de concentrația în ng/ml pe hirtie milimetrică. Folosiți valorile absorbantei medii pentru fiecare probă pentru a determina concentrația corespunzătoare de AFP în ng/ml plecînd de la curba standard. Dacă nivelurile controalelor sau ale probelor cu valori cunoscute nu dau rezultatele scontate, rezultatele testului trebuie considerate invalide. Dacă folosiți un pachet software alegeți o curbă de regresie quadratică care să se potrivească.

VALORI PREDICȚIONATE ȘI SENSIBILITATE

Graficul produs de calibratori trebuie să aibă o formă hiperbolică cu densitatea optică (DO) citită la 450 nm proporțională cu concentrația lor. DO a calibratorului A trebuie să fie mai mică de 0,75 iar DO a calibratorului F mai mare de 1,5 pentru ca rezultatele testului să fie valide.

La pacienții cu risc mare, valorile AFP cuprinse între 100ng/ml și 350ng/ml sugerează un diagnostic de carcinom hepatocelular iar nivelurile peste 350ng/ml de obicei indică boala. Aproximativ 97% din pacienții sănătoși au niveluri AFP mai mici de 8,5ng/ml. Se recomandă ca fiecare laborator să stabilească valorile sale normale. Concentrația minimum detectabilă de **PATHOZYME AFP** este estimată a fi 2,0 ng/ml.

DATE DE EVALUARE

Rezultate calibrate cu doi competitori importanți și cu standarde interne. Coeficientul de variație al **PATHOZYME AFP** este mai mic sau egal cu 10%.

Într-o evaluare dintre kit-ul **PATHOZYME AFP** produs de Omega și kit-ul AxSym produs de Abbott pentru probele cu niveluri cuprinse între 15,6ng/ml și 330ng/ml au fost obținute următoarele date:

| | |
|--------------------------|-------------|
| Număr de probe | 79 |
| Coefficient de Corelație | 0.985 |
| Pantă | 1.038 |
| Intercept | 0.729 |
| Medie Omega | 55.12 ng/ml |
| Medie Abbott | 52.24 ng/ml |

S-a dovedit că între kit-uri există o bună corelație

BIBLIOGRAFIE

- (1) **Abelev, G. I.** Alpha-fetoprotein as a marker of embro-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.

GHID RAPID AL PROCEDURII DE TESTARE

1. Pipetați 20μl de Standard sau probe și 100μl de Tampon Zero în fiecare godeu și apoi amestecați bine timp de 30 de secunde.
2. Incubați timp de 30 de minute la temperatura camerei (20°C-25°C)
3. Aruncați conținutul godeurilor și spălați de cinci ori cu apă distilată.
4. Adăugați 150μl de Conjugat Anti-AFP HRP în fiecare godeu. Amestecați bine timp de 5 secunde.
5. Incubați timp de 30 de minute la temperatura camerei (20°C-25°C)
6. Aruncați conținutul godeurilor și spălați de cinci ori.
7. Adăugați 100μl de Soluție Substrat în fiecare godeu și amestecați ușor timp de 5 secunde.
8. Incubați la întuneric timp de 20 de minute la temperatura camerei (20°C-25°C)
9. Adăugați 100μl de Soluție de Stopare în fiecare godeu și amestecați ușor timp de 30 de secunde.
10. Citiți Densitatea Optică imediat (nu mai târziu de 10 minute) folosind un cititor de microplăci cu un filtru de 450nm.

8080 ISSUE 5 Revised March 2011 **ROMANIAN**
© Omega Diagnostics Ltd 2011



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 ISO 13485 CERTIFIED COMPANY