

## کیت اندازه‌گیری Combi Cancer AFP

Combi Cancer AFP ELISA Kit 96t

Cat. No: 1524-96

Brochure Rev: 16 (1399/08/11)

### مقدمه:

آلفا فیتوپروتئین (AFP) گلیکوپروتئینی با وزن مولکولی تقریبی ۷۰۰۰۰ دالتون است. AFP معمولاً در دوران جنینی و تکامل نوزادی توسط کبد، کیسه تخم و در غلظت‌های کمتر توسط دستگاه گوارش ساخته می‌شود. غلظت AFP در سرم در هفته دوازدهم حاملگی به بیشترین مقدار خود (تا ۱۰ mg/ml) می‌رسد. سپس به تدریج کاهش می‌یابد و تا یک سال پس از تولد به کمتر از ۲۵ ng/ml می‌رسد. مقادیر افزایش یافته AFP در بیماری‌هایی نظیر هپاتومای اولیه و تومورهای سلول‌های کیسه زرده مشاهده می‌شود. AFP یک تومورمارکر مهم جهت تشخیص و پیگیری درمان کارسینومای هپاتوسلولار می‌باشد. سطح این پروتئین در سرم خانم‌های باردار نیز افزایش می‌یابد ولی مقادیر بالای غیر طبیعی آن در خانم‌های باردار، به عنوان یک ریسک فاکتور برای سندرم داون در نظر گرفته می‌شود.

### اصول آزمایش:

در این تست، بی‌حرکت سازی و اتصال کمپلکس ایمنی به سطح چاهک‌ها به کمک واکنش بین استرپتاویدین (Streptavidin) کویت شده در سطح پلیت و آنتی‌بادی مونوکلونال ضد AFP بیوتینیل شده صورت می‌گیرد. پس از مخلوط شدن آنتی‌بادی مونوکلونال بیوتینیل شده، آنتی‌بادی متصل به آنزیم و سرم حاوی آنتی‌ژن، واکنش بین آنتی‌ژن و آنتی‌بادی‌ها بدون هیچ رقابتی

صورت می‌گیرد و کمپلکس‌های ساندویچ مخلوط تشکیل می‌شوند.

به موازات واکنش فوق، کمپلکس‌های ایمنی، به دلیل تمایل بسیار بالای بین استرپتاویدین و بیوتین به سطح پلیت متصل می‌شود. پس از به تعادل رسیدن واکنش، آنتی‌بادی‌ها و آنتی‌ژن‌های متصل نشده با آسپیره کردن تخلیه می‌شوند. پس از شستشوی چاهک‌ها، سوبسترای آنزیم HRP (مخلوط رنگزا) درون آنها ریخته می‌شود و محصول آبی رنگی ایجاد می‌شود. پس از اضافه کردن مخلوط متوقف کننده، رنگ زرد پدیدار می‌شود که در طول موج ۴۵۰ نانومتر بیشترین میزان جذب را دارد. شدت رنگ ایجاد شده و در نتیجه مقدار جذب با غلظت AFP سرم ارتباط مستقیم دارد. در نهایت غلظت AFP سرم به کمک منحنی استاندارد (نمودار کالیبراتورها) محاسبه می‌گردد.

### محتویات کیت:

۱. میکرو پلیت Coat شده با استرپتاویدین ۹۶ تستی بسته‌بندی شده در کیسه آلومینیومی همراه با رطوبت گیر.
۲. کالیبراتورهای AFP در مقادیر ۰، ۵، ۲۵، ۵۰، ۲۵۰ و ۵۰۰ ng/ml تهیه شده در سرم انسان. کالیبراتورهای موجود در این کیت مطابق با استاندارد بین‌المللی WHO کد IRP#AFP 1st کالیبره شده است.
۳. کوئزوگه AFP: ۱ و ۱۰ ویال ۸ میلی‌لیتری که حاوی آنتی‌بادی‌های متصل به بیوتین و متصل به آنزیم HRP در بافر است.
۴. مخلوط شستشو (۵۰x): ۱ ویال ۲۰ میلی‌لیتری.
۵. مخلوط رنگزا A: ۱ ویال ۶/۵ میلی‌لیتری.
۶. مخلوط رنگزا B: ۱ ویال ۶/۵ میلی‌لیتری.
۷. مخلوط متوقف کننده واکنش: ۱ ویال ۱۲ میلی‌لیتری.
۸. مخلوط کنترل: ۱ ویال ۰/۵ میلی‌لیتری.

۹. بر چسب مخصوص پلیت: ۱ ورق.

توجه: کلیه محلول‌ها در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شوند. محلول متوقف کننده در دمای اتاق نیز قابل نگهداری است.

### احتیاط در استفاده از کیت:

۱. محتویات این کیت برای استفاده در همین کیت تعبیه گردیده لذا از استفاده مشترک با سایر کیت‌ها و یا شماره‌های ساخت دیگر جدا خودداری نمایید.
۲. کلیه محلول‌ها تا زمان انقضای کیت پایدار هستند. از محلول‌هایی که تاریخ انقضای آنها گذشته است، استفاده ننمایید.
۳. توجه فرمایید محلول‌ها در مجاورت نور و گرما قرار نگیرند.
۴. محتویات کیت منبع انسانی دارد. مواد مورد استفاده در این کیت از نظر منفی بودن HIV1/2، HBsAg و HCV تست شده‌اند. ولی هیچ روشی به طور کامل قادر به تشخیص کردن منفی بودن موارد فوق نیست. بنابراین لازم است به صورت بالقوه آلوده در نظر گرفته شود و کار با آنها طبق دستورالعمل‌های ایمنی انجام شود.
۵. استفاده از دستکش و عینک در هنگام کار الزامی است و در هنگام کار با کیت دقت فرمائید که محتویات به صورت یا سایر نقاط بدن نباشد و از تماس با دهان و سایر مخاط جدا خودداری گردد.

### جمع آوری و آماده‌سازی نمونه:

۱. گرفتن خون باید با استفاده از تکنیک استاندارد خون‌گیری سیاهرگی انجام شود و به سرعت سرم از سلول‌های خونی جدا گردد. از انجام تست بر روی نمونه‌های لیپمیک همراه با کدورت و همولیز خودداری نمایید. نمونه‌های پلاسما جهت انجام این تست مناسب نمی‌باشند.
۲. درب ظروف نمونه باید کاملاً بسته باشد و تا ۵ روز می‌توان آنها را در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد و برای مدت طولانی‌تر حداکثر تا ۱ ماه در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری کرد.

### آماده‌سازی معرف‌ها:

مخلوط شستشو: کل محتویات ویال مخلوط شستشو (۵۰x) را با ۹۸۰ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط کنید.

مخلوط رنگزا: ۱ میلی‌لیتر از مخلوط رنگزا A را با ۱ میلی‌لیتر از مخلوط رنگزا B مخلوط نمایید. مخلوط فوق بعد از ۱۰ دقیقه قابل استفاده و برای ۲ ردیف کافی می‌باشد.

توجه: در صورت مشاهده رنگ آبی در مخلوط رنگزا و یا کدورت و رشد باکتری، از این محلول استفاده نشود

### روش انجام آزمایش:

قبل از شروع آزمایش اطمینان حاصل کنید کلیه معرف‌ها و نمونه‌ها به دمای اتاق (۲۰ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد) رسیده‌اند. کلیه کالیبراتورها را با سر و ته کردن به آرامی مخلوط نمایید.

۱. تعداد چاهک‌های مورد نیاز برای انجام تست را برداشته و بقیه چاهک‌ها را همراه رطوبت گیر در کیسه آلومینیومی قرار داده درب آن را بسته و در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگه دارید.

۲. ۲۵ میکرولیتر از کالیبراتورها، نمونه‌ها و کنترل را در چاهک‌های مورد نظر بریزید. بهتر است که از هر نمونه، کنترل یا کالیبراتور به صورت دوتایی (Duplicate) در چاهک‌ها ریخته شود.

توجه: حتماً چاهک اول به عنوان بلانک در نظر گرفته شود. در این چاهک نمونه و یا کالیبراتور ریخته نشود. بقیه مراحل با سایر چاهک‌ها یکسان می‌باشد.

۳. ۱۰۰ میکرولیتر مخلوط آنزیم کوئزوگه (Enzyme Conjugate) به هر چاهک اضافه کنید و پلیت را به مدت ۳۰ ثانیه روی سطح میز به آرامی تکان دهید.

۴. چاهک‌ها را با چسب مخصوص پلیت بپوشانید و به مدت ۶۰ دقیقه (± ۱۰ دقیقه) در دمای اتاق انکوبه نمایید.

۵. محتویات چاهک‌ها را با وارونه کردن پلیت تخلیه کنید. سپس چاهک‌ها را ۵ مرتبه و هر مرتبه با ۳۰۰ میکرولیتر مخلوط شستشو

**Sensitivity**

بر اساس جمع میانگین جذب نوری کالیبراتور صفر و سه برابر انحراف معیار، حداقل غلظت قابل تشخیص در این کیت ۰/۶ ng/ml می‌باشد.

**Hook effect**

غلظت AFP تا ۱۰۰۰۰ ng/ml بررسی گردید و اثر هوک مشاهده نشد.

**References:**

- Engall, E., Methods in Enzymology, Volume 70, Van Vunakis, H. and Langone, J. J. (eds.), Academic Press, New York, 41492 (1980).
- Uotila, M., Ruoslahti, E. and Engvall, E., J. Immunol. Methods, 42, 11-15 (1981).
- belev G I. Alpha-fetoprotein as a marker of embryo-specific differentiation in normal and human tissues. Transplant Rev; 20:3-37 (1974).
- Wild D, The Immunoassay Handbook, Stockton Press, 445 (1994).

در صورت بروز هرگونه مشکل خواهشمند است با شماره‌های مندرج بر روی جعبه (بخش پشتیبانی) تماس بگیرید.

**Recovery**

در این تست دو نمونه سرم به نسبت مساوی با یکدیگر ترکیب شد و به عنوان یک نمونه، غلظت AFP در آن سنجش گردید.

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	9.68	98.7
3	11.6	31.4	21.5	20.45	95.1
4	9.5	21.1	15.3	15.63	102.1

**Linearity**

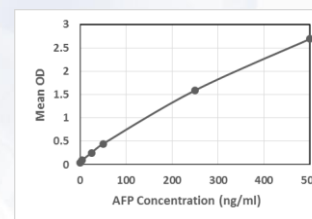
در این تست غلظت AFP در رقت‌های مختلف نمونه سرم برای تعیین خطی بودن کیت اندازه‌گیری شد.

NO.	Sample	1/2	1/4	1/8	1/16
		Bias %			
1	12.9	-2.3	-1.4	-0.5	-1.8
2	17.5	-3.2	-2.6	-1.5	-3.4
3	22.1	2.3	3	-3	-2.3
4	27.3	-0.6	-0.7	-1.3	0

**Specificity**

اختصاصیت این آزمایش به کمک اضافه کردن غلظت‌های مختلفی از مواد مداخله‌گر به سرم، مورد سنجش قرار گرفت. واکنش متقاطع با اندازه‌گیری نسبت بین مقدار ماده مداخله‌گر به مقدار AFP مورد نیاز برای ایجاد همان مقدار جذب، سنجش شد.

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
hTSH	ND	10 IU/ml
hLH	ND	100 mIU/ml
hPRL	ND	100 µg/ml

**مقادیر مورد انتظار برای تست الایزای AFP****Expected value****< 8.5 ng/ml****پارامترهای کنترل کیفی****Intra - Assay**

دقت داخلی با ارزیابی تکرارپذیری سه نمونه سرم در یک نوبت تست انجام گردید.

Serum sample	1	2	3
No. of Repeats	20	20	20
Mean AFP (ng/ml)	2.9	10.3	25.91
S.D (ng/ml)	0.14	0.42	1.2
C.V (%)	4.8	4	4.6

**Inter - Assay**

ارزیابی دقت بین‌تستی با سه نمونه متفاوت سرم در ۳ نوبت هر نوبت ۵ بار انجام شد.

Serum sample	1	2	3
No. of Repeats	15	15	15
Mean AFP (ng/ml)	3.5	8.6	22.8
S.D (ng/ml)	0.19	0.51	1.3
C.V (%)	5.4	5.9	5.8

بشوید. اگر شستشو به صورت دستی انجام می‌شود در انتها شستشو به آرامی پلیت را بر روی دستمال رطوبت‌گیر بزنید.

۶. ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رنگزا درون تمام چاهک‌ها 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 آمده، می‌توانید زمان انکوباسیون محلول رنگزا را به مدت ۱۰ دقیقه افزایش دهید.

۷. ۵۰ میکرولیتر محلول متوقف کننده به کلیه 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 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.

Calibrators	Well Number	Abs.	Mean Abs	Value (ng/ml)
Cal	A1	0.051	0.049	0
	A	B1		
Cal	C1	0.101	0.101	5
	B	D1		
Cal	E1	0.246	0.255	25
	C	F1		
Cal	G1	0.444	0.446	50
	D	H1		
Cal	A2	1.609	1.591	250
	E	B2		
Cal	C2	2.755	2.691	500
	F	D2		