

1. WSTĘP

1.1. Zastosowanie

Zestaw DRG AFP ELISA jest testem immunoenzymatycznym do oznaczania alfa fetoproteiny (AFP) w surowicy

2. ZASAD TESTU

Zestaw DRG ELISA AFP jest testem immunoenzymatycznym fazy stałej (ELISA), opierającej się na zasadzie kanapkowej (sandwich). Mikrostudzienki są opłaszczane przeciwciałem monoklonalnym skierowanym przeciwko rzadkiemu miejscu antygenowemu na cząsteczce AFP. Próbkę pacjenta zawierającą endogenną AFP jest inkubowana w opłaszczonej studzience z roztworem sprzężonym enzymu, który jest surowicą anti-AFP sprzężoną z peroksydazą chrzanową. Po inkubacji wypłukiwany zostaje niezwiązany roztwór sprzężony. Ilość związanej peroksydazy jest proporcjonalna do stężenia AFP w próbce. Po dodaniu roztworu substratu, natężenie otrzymanego koloru jest proporcjonalne do stężenia AFP w próbce pacjenta.

3. OSTRZEŻENIA

- Niniejszy zestaw przeznaczony jest wyłącznie do zastosowania diagnostycznego w warunkach in vitro.
- Wszystkie odczynniki niniejszego zestawu testowego, które zawierają ludzką surowicę lub osocze, przebadano z wynikiem ujemnym na obecność HIV I/II, antygenu HBs i HCV

procedurami zatwierdzonymi przez FDA. Mimo tego, wszystkimi odczynnikami należy posługiwać się i wyrzucać je jak substancje potencjalnie niebezpieczne.

- Przed rozpoczęciem oznaczenia należy uważnie przeczytać całą instrukcję obsługi. Należy posługiwać się aktualną wersją ulotki informacyjnej, dołączonej do zestawu. Należy upewnić się, że wszystko jest zrozumiałe.
- Nigdy nie pipetować ustami i unikać kontaktu odczynników i próbek ze skórą i błonami śluzowymi.
- Nie palić, nie jeść, nie pić i nie stosować kosmetyków w miejscach, gdzie stosuje się próbki i odczynniki zestawu.
- Przy posługiwaniu się próbkami i odczynnikami stosować jednorazowe rękawiczki lateksowe. Zanieczyszczenie odczynników lub próbek drobnoustrojami może prowadzić do uzyskania fałszywych wyników.
- Próbkami i odczynnikami należy posługiwać się zgodnie z procedurami określonymi w odpowiednich krajowych wytycznych i regulacjach dotyczących bezpieczeństwa biologicznego.
- Nie stosować odczynników po upływie terminu ważności podanego na etykietach zestawu.
- przestrzegać wszystkich objętości podanych w protokole. Optymalne wyniki oznaczenia można uzyskać tylko przy stosowaniu kalibrowanych pipet.
- Nie mieszać i nie stosować elementów zestawów o różnych numerach serii. Zaleca się nie wymienianie studzienek z różnych płytek nawet w obrębie tej samej serii. Zestawy mogą być transportowane lub przechowywane w różnych warunkach i charakterystyki wiązania płytek mogą się nieznacznie różnić.

- Unikać kontaktu z roztworem zatrzymującym reakcję, zawierającym 0,5 M H₂SO₄. Może powodować podrażnienie skóry i oparzenia.
- Karty Charakterystyk Substancji Niebezpiecznych dostępne są na żądanie w DRG

4. ZAWARTOŚĆ ZESTAWU

- 1) **Mikrostudzienki**, 12x8 (odłamywane), 96 studzienek;
Studzienki opłaszczane przeciwciałem monoklonalnym anti-AFP
- 2) **Standardy** (Standard 0-4), 5 fiolek
Stężenia: 0, 10; 40; 80; 160 IU/ml
Przeliczenie: 1IU/ml = 1,21ng/ml

Standardy są skalibrowane wg NIBSC 1 International Standard for Alphafoetoprotein AFP (AFP 1th IRP 72/225)

Patrz „Przygotowanie Odczynników”

* Zawierają 0.03% Proclin 300, 0.015% BND i 0.010% MIT jako środki konserwujące

- 3) **Roztwór sprzężony enzymu**, 11 ml, gotowy do użycia
Surowica anti-AFP sprzężona z peroksydazą chrzanową.
* Zawiera 0.03% Proclin 300, 0.015% BND i 0.010% MIT jako środki konserwujące
- 4) **Roztwór substratu** – 1 fiołka, 14 ml, gotowy do użycia
Tetrametylbenzydyna (TMB)

5) Roztwór zatrzymujący reakcję – 1 fiolka, 14 ml, gotowy do użycia

Zawiera 0,5M H₂SO₄

Unikać kontaktu z roztworem zatrzymującym. Może powodować podrażnienia i oparzenia skóry.

* BND = 5-bromo-5-nitro-1,3-dioxane

MIT = 2-methyl-2H-isothiazol-3-one

Uwaga: Dodatkowy Standard zero do rozcieńczania próbek jest dostępny na życzenie.

4.1.1. Sprzęt i materiały niezbędny, ale niezawarty w zestawie

- Kalibrowany czytnik mikroplamki (450±10 nm)
- Kalibrowane nastawne precyzyjne mikropipety.
- Bibuła.
- Woda destylowana.

4.2. Przechowywanie i stabilność zestawu

Nieotwarte odczynniki, przechowywane w temperaturze 2 - 8°C, zachowują reaktywność do upływu terminu ważności. Nie stosować odczynników po tej dacie. Otwarte odczynniki muszą być przechowywane w temperaturze 2 - 8°C. Mikrostudzienki muszą być przechowywane w temperaturze 2 - 8°C. Po otwarciu torebki foliowej należy uważnie zamknąć ją szczelnie ponownie.

Otwarte zestawy zachowują aktywność przez 6 tygodni, jeżeli są przechowywane w wyżej opisanych warunkach.

4.3. Przygotowanie odczynników

Przed użyciem pozostawić wszystkie odczynniki oraz wymaganą liczbę pasków, do osiągnięcia temperatury pokojowej.

Standardy

Rozpuścić liofilizowaną zawartość fiolek ze standardem w 0,5 ml wody destylowanej.

***Uwaga:** Rozpuszczone standardy zachowują stabilność przez 2 miesiące w temperaturze 2-8°C.*

Przy dłuższym przechowywaniu należy je zamrozić w temperaturze -20°C

4.4. Utylizacja zestawu

Zestaw należy utylizować zgodnie z krajowymi przepisami prawnymi. Specjalne informacje dotyczące niniejszego produktu zawarte są w Karcie Charakterystyki Substancji Niebezpiecznej (patrz punkt 13).

4.5. Uszkodzone zestawy testowe

W przypadku każdego poważnego uszkodzenia zestawu testowego lub jego elementów należy poinformować o tym na piśmie DRG[®], nie później niż jeden tydzień po otrzymaniu zestawu. Nie należy w oznaczeniu stosować poważnie uszkodzonych pojedynczych elementów zestawu. Należy je przechowywać do momentu uzgodnienia ostatecznego rozwiązania. Następnie należy się ich pozbyć zgodnie z obowiązującymi przepisami prawnymi.

5. PRÓBKİ

W tym teście należy stosować wyłącznie próbki surowicy.

Nie stosować próbek z makroskopową hemolizą, żółtaczkowych ani lipemicznych.

Uwaga: W tym teście nie należy stosować próbek zawierających azydek sodu.

Uwaga: Jeżeli jest niezbędna amniopunkcja, próbki powinny być pobrane przed nakłuciem. Po nakłuciu owodni obserwuje się podwyższone wartości AFP.

5.1. Pobieranie próbek

Surowica:

Pobrać krew z żyły (np. przy użyciu Sarstedt Monovette nr 02.1388.001), pozostawić do wytworzenia skrzepu i oddzielić surowicę przez wirowanie w temperaturze pokojowej. Nie wirować próbek przed wytworzeniem skrzepu. U pacjentów otrzymujących leki przeciwkrzepliwie czas powstawania skrzepu może być wydłużony.

5.2. Przechowywanie próbek

Próbki należy zamknąć korkiem i można je przechowywać przed oznaczeniem przez maksymalnie 5 dni w temperaturze 2 - 8°C. Próbki przechowywane przez dłuższy czas przed oznaczeniem należy zamrozić, jednorazowo, w temperaturze -20°C. Rozmrożone próbki przed oznaczeniem należy kilkakrotnie odwrócić.

5.3. Rozcieńczenie próbek

Jeżeli wynik pierwszego oznaczenia wskazuje, że próbka zawiera wyższe stężenie AFP niż najwyższy standard, próbkę taką można rozcieńczyć Standardem zero i oznaczyć ponownie, jak opisano w Procedurze oznaczenia.

Przy obliczaniu stężenia estronu w oznaczanej próbce należy wziąć pod uwagę współczynnik rozcieńczenia.

Przykład:

- a) Rozcieńczenie w stosunku 1:10: 10 µl surowicy + 90 µl Standardu zero (dobrze wymieszać)
- b) Rozcieńczenie w stosunku 1:100: 10 µl rozcieńczenia a) 1:10 + 90 µl Standardu zero (dobrze wymieszać).

6. PROCEDURA TESTU

6.1. Uwagi ogólne

- Przed użyciem wszystkie odczynniki i próbki należy pozostawić do osiągnięcia temperatury pokojowej. Wszystkie odczynniki należy wymieszać bez wytwarzania piany.
- Po rozpoczęciu oznaczenia wszystkie jego etapy należy wykonywać bez przerw.
- Dla uniknięcia zanieczyszczenia krzyżowego, należy stosować nowe jednorazowe plastikowe końcówki pipet do pipetowania każdego standardu, kontroli i próbki.
- Absorbancja jest funkcją czasu inkubacji i temperatury. Przed rozpoczęciem oznaczenia zaleca się przygotowanie wszystkich odczynników, zdjęcie korków, umieszczenie wszystkich potrzebnych zagłębień w statywie, itp. Dzięki temu każdy etap pipetowania zajmie taką samą ilość czasu i nie będzie pomiędzy nimi żadnych przerw.
- Zgodnie z ogólną zasadą, reakcja enzymatyczna jest liniowo proporcjonalna do czasu i temperatury.

- Pipetowanie wszystkich standardów, próbek i kontroli należy wykonać w ciągu 6 minut (Szczególnie należy o tym pamiętać przy pipetowaniu manualnym).

6.2. Procedura oznaczenia

- 1) W statywie umieścić pożądaną liczbę mikrostudzienek.
- 2) Do odpowiednich studzienek odmierzyć po **25 µl standardu, kontroli i próbek, nowymi jednorazowymi końcówkami do pipet.**
- 3) Do każdej studzienki odmierzyć **100 µl Roztworu sprzężonego enzymu.**

Dobrze wymieszać przez 10 sekund. Ważne jest, aby w tym etapie dokładnie wymieszać zawartość studzienki.

- 4) Inkubować przez **30 minut** w temperaturze pokojowej.
- 5) Energicznie wytrząsnąć zawartość studzienek.

5-krotnie płukać studzienki wodą destylowaną (400 µl na studzienkę). Energicznie uderzyć studzienkami o bibułę w celu usunięcia resztek ich zawartości.

Ważna uwaga: czułość i precyzja tego oznaczenia w dużym stopniu zależą od właściwego wykonania procedury płukania!

- 6) Do każdej studzienki dodać **100 µl Roztworu substratu.**
- 7) Inkubować przez **10 minut** w temperaturze pokojowej.
- 8) Zatrzymać reakcję enzymatyczną przez dodanie do każdej studzienki **50 µl Roztworu zatrzymującego reakcję.**

- 9) Odczytać absorbancję (OD) każdej studzienki przy długości fali **450 ± 10 nm** przy użyciu czytnika płytek. Zaleca się odczytanie studzienek w ciągu **10 minut** od dodania *roztworu zatrzymującego reakcję*

6.3. Obliczanie wyników

- 1) Dla każdego zestawu standardów, kontroli i próbek pacjenta obliczyć średnią wartość absorbancji.
- 2) Skonstruować krzywą wzorcową przez naniesienie średniej absorbancji uzyskanej dla każdego standardu wobec podanego stężenia AFP w danym standardzie, przy czym wartość absorbancji należy nanieść na osi pionowej (Y), a stężenie na osi poziomej (X).
- 3) Przy użyciu średniej wartości absorbancji dla każdej próbki, z krzywej wzorcowej określić odpowiednie stężenie AFP.
- 4) Metoda automatyczna: Wyniki w IFU można obliczyć automatycznie przy użyciu dopasowania 4 PL (4-parametrowego logistycznego). Zalecaną metodą jest dopasowanie 4-parametrowe logistyczne. Inne funkcję obróbki danych mogą dać nieco inne wyniki.
- 5) Stężenie AFP w próbkach można odczytać bezpośrednio z tej krzywej wzorcowej. Próbki, w których stężenie AFP jest wyższe od stężenia najwyższego standardu, należy dodatkowo rozcieńczyć standardem zero. Przy obliczaniu wyników stężenia FSH należy uwzględnić ten współczynnik rozcieńczenia.

6.3.1. Przykład Typowej Krzywej Standardowej

Standard	Jednostki gęstości optycznej (450 nm)
Standard 0 (0 IU/mL)	0,07
Standard 1 (10 IU/mL)	0,16
Standard 2 (40 IU/mL)	0,26
Standard 3 (80 IU/mL)	0,44
Standard 4 (160 IU/mL)	0,92

7. KONTROLA JAKOŚCI

Dobra praktyka laboratoryjna wymaga oznaczania kontroli przy okazji sporządzania każdej krzywej wzorcowej. Należy oznaczyć statystycznie istotną liczbę kontroli w celu wyznaczenia wartości średnich i dopuszczalnych przedziałów wartości dla zagwarantowania właściwej charakterystyki testu.

Zaleca się stosowanie próbek kontrolnych, zgodnie ze stanowymi i federalnymi przepisami prawnymi. Zaleca się stosowanie próbek kontrolnych w celu zagwarantowania codziennej wiarygodności wyników oznaczenia. Należy oznaczać próbki kontrole zawierające zarówno prawidłowe, jak i patologiczne stężenia analizowanej substancji.

W certyfikacie kontroli jakości dołączonym do zestawu podano stężenia FSH w odpowiednich kontrolach. Podane wartości i przedziały wartości zawarte w certyfikacie kontroli jakości zawsze dotyczą zestawu o danym numerze serii i nie należy posługiwać się nimi do bezpośredniego porównywania wyników.

Zaleca się także uczestnictwo w krajowych lub międzynarodowych programach oceny jakości w celu zagwarantowania dokładności wyników.

Należy stosować odpowiednie metody statystyczne do analizy wartości kontrolnych. Jeżeli wyniki oznaczenia nie mieszczą się w ustalonych dopuszczalnych przedziałach wartości dla próbek kontrolnych, wyniki uzyskane dla próbek pacjenta należy uznać za niewiarygodne.

W takim przypadku proszę sprawdzić następujące kwestie: przyrządy do pipetowania i stoper, czytnik, daty ważności odczynników, warunki przechowywania i inkubacji, metody aspiracji i płukania.

Po sprawdzeniu wspomnianych wyżej kwestii i nie znalezieniu błędu, proszę skontaktować się ze swoim dystrybutorem lub bezpośrednio z firmą DRG

8. ASPEKTY PRAWNE

8.1. Wiarygodność wyników

Oznaczenie musi być wykonane ściśle według instrukcji użytku producenta. Dodatkowo użytkownik musi ściśle przestrzegać zasad GLP (Dobrej Praktyki Laboratoryjnej) i innych mających zastosowanie standardów krajowych i/lub przepisów prawnych. Ma to szczególne znaczenie w zakresie stosowania kontrolnych odczynników. Ważne jest, aby w procedurze oznaczenia zawsze uwzględnić wystarczającą liczbę kontroli dla zweryfikowania dokładności i precyzji oznaczenia.

Wyniki oznaczenia są wiarygodne tylko wtedy, gdy wyniki oznaczenia wszystkich kontroli mieszczą się w określonym przedziale wartości i jeżeli wszystkie inne parametry testu są zgodne z podaną specyfikacją oznaczenia. W przypadku wątpliwości proszę kontaktować się z firmą DRG.

8.2. Odpowiedzialność

Wszystkie modyfikacje niniejszego zestawu testowego i/lub wymiana lub wymieszanie jakichkolwiek składników z różnych serii testów mogą mieć niekorzystny wpływ na uzyskane wyniki i wiarygodność całego testu. Takie modyfikacje i/lub wymiany czynią każde żądanie wymiany zestawu testowego bezzasadnym.

W przypadku każdego roszczenia odpowiedzialność producenta nie będzie przekraczać wartości zestawu testowego. Producent nie ponosi odpowiedzialności za żadne uszkodzenie zestawu testowego w czasie transportu.

9. BIBLIOGRAFIA

1. Ruoslahti, E. and Seppala, M., Studies of Carcino-Fetal Proteins: Physical and Chemical Properties of Human Alpha-Fetoprotein. *Int. J. Cancer* 7:218, 1971.
2. Gitlin, D., Perricelli, A. and Gitlin, G. M., Synthesis of Alpha-Fetoprotein by Liver, Yolk Sac, and Gastrointestinal Tract of the Human Conceptus. *Cancer Res.* 32:979, 1972.
3. Masseyeff, R., Gilli, G., Krebs, B., Bonet, C. and Zrihen, H., Evolution en Fonction de l'Age du Taux Serique Physiologique de l'Alpha-Foetoproteine chez l'Homme et le Rat. (French) in *Alpha-Feto-Protein* (Masseyeff, R., ed.) p.313. INSERM, Paris, 1974.
4. Silver, H. K. B., Gold, P., Feder, S., Freedman, So. O. and Shuster, J., Radioimmunoassay for human alphafetoprotein. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 70:526, 1973.
5. Waldmann, T. A. and McIntire, K. R., The use of a radioimmunoassay for alpha-fetoprotein in the diagnosis of malignancy. *Cancer* 34:1510, 1974.
6. Kohn, J., Orr, A.H. McElwain, T.J., Bentall, M. and Peckham, M. J., Serum alpha-fetoprotein in patients with testicular tumors. *Lancet* 2:433, 1976.
7. Abelev, G.I., Alpha-fetoprotein in ontogenesis and its association with malignant tumors. *Adv. Cancer Res.* 14: 295, 1971.

8. Scardino, P. T., Cox, H. D., Waldermann, T. A., McIntire, K. R., Mitemeyer, B. and Javadpour, N., The value of the serum tumor markers in the staging and prognosis of germ cell tumors of the testis. J. Urol. 118:994, 1977.
9. Bosl, G.J., Lange, P. H., Fraley, E. E., Goldman, A., Nochomovitz, L. E., Rosai, J., et al., Human chorionic gonadotropin and alpha-fetoprotein in the staging of nonseminomatous testicular cancer. Cancer 47:328, 1981
10. Lange, P.H., McIntire, K.R. and Waldmann, T. A., Hakala, T.R. and Fraley, E. E., Serum alpha-fetoprotein and human chorionic gonadotropin in the diagnosis and management of nonseminomatous germ-cell testicular cancer. Medical Intelligence 259:1237, 1976.
11. Javadpour, N., McIntire, K. R. and Waldmann, T. A., Human chorionic gonadotropin (HCG) and alpha-fetoprotein (AFP) in sera and tumor cells of patients with testicular seminoma. Cancer 42:2768, 1978.
12. Waldmann, T.A. and McIntire, K. R., Serum Alpha-Fetoprotein Levels in Patients with Ataxia-Telangiectasia. Lancet 2:1112, 1972.
13. Belanger, L., Tyrosinémie Héritaire et Alpha-1-Fetoprotéine. II. Recherche Tissulaire Comparée de l'Alpha-Foetoprotéine dans Deux Cas de Tyrosinémie Héritaire. Considérations sur l'Ontogenèse de la Foetoprotéine Humain (French). Pathol. Bio.21:457, 1973.
14. Kew, M. C., Purves, L.R. and Bersohn, I., Serum Alpha-Fetoprotein Levels in Acute Viral Hepatitis. Gut 14:939, 1973.
15. Endo, Y., Kanai, K., Oda, T., Mitamura, K., Iino, S. and Suzuki, H., Clinical Significance of alpha-Fetoprotein in Hepatitis and Liver Cirrhosis. Ann. N. Y. Acad. Sci. 259:234, 1975.
16. Purves, L. R. and Purves M., Serum Alpha-Fetoprotein. VI. The Radioimmunoassay Evidence for the Presence of AFP in the Serum of Normal People and During Pregnancy. S. Afr. Med. J. 46:1290, 1972

DRG



DRG[®] AFP (Alpha Fetoprotein) (EIA-1468)



USA: The RUO mark, consisting of the letters 'RUO' inside a square border.

Revised 1 Dec. 2011 rm (Vers. 7.1)

17. Sepalla, M. and Ruoslahti, E., Alpha-Fetoprotein: Physiology and Pathology During Pregnancy and Application to Antenatal Diagnosis. J. Perinat. Med. 1:104, 1973.

18. Engvall, E., Methods in Enzymology, Volume 70, Van Vunakis, H. and Langone, J.J. (eds.) Academic Press, New York, NY, 419 (1980).

19. Uotila, M., Ruoslahti, E. and Engvall, E., J. Immunol. Methods, 42, 11 (1981).