

# MONOKIT

کیت اندازه‌گیری AFP در سرم انسان  
**AFP ELISA Kit 96t**  
Cat. No: 1134-96 / Rev: A1 (1402/09/25)

## مقدمه:

آلفا فیتوپروتئین (AFP) گلیکوپروتئینی با جرم مولکولی تقریبی ۷۰ کیلودالتون است که معمولاً در دوران جنینی توسط کبسه زرده، کبد و با غلظت‌های کمتر توسط دستگاه گوارش ساخته می‌شود. AFP یک تومورمارکر مهم جهت تشخیص و پیگیری درمان کارسینومای هیپاتوسلولار است و مقادیر افزایش یافته آن در بیماری‌هایی نظیر هیپاتومی اولیه و تومور سلول‌های کبسه زرده مشاهده می‌شود. سطح این پروتئین در سرم خانم‌های باردار نیز افزایش می‌یابد و در سه ماهه سوم بارداری به بیشترین حد می‌رسد. حیطة کاربرد این کیت، اندازه‌گیری کمی سطح AFP در نمونه سرم انسان به روش الایزا است.

## اصول آزمایش:

این آزمایش بر اساس الایزای ساندویچ طراحی شده است. بی‌حرکت سازی کمپلکس ایمنی توسط واکنش بین **استرپتاویدین** تثبیت شده در سطح چاهک و آنتی‌بادی بیوتینیله مونوکلونال ضد AFP صورت می‌گیرد. با قرار گرفتن سرم حاوی آنتی‌ژن در معرض آنتی‌بادی بیوتینیله و آنتی‌بادی متصل به آنزیم (HRP)، واکنش بین آنتی‌ژن و آنتی‌بادی‌ها بدون هیچ رقابتی صورت می‌گیرد و کمپلکس‌های ایمنی به سطح چاهک متصل می‌شوند. پس از به تعادل رسیدن واکنش و شستشوی چاهک‌ها، با افزودن محلول رنگزا (سوبسترای آنزیم HRP) و سپس محلول متوقف‌کننده، محصول نهایی تولید می‌شود 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 محاسبه می‌گردد.

## محتویات کیت:

- ۱) میکروپلیت ۹۶ تستی حاوی استرپتاویدین تثبیت شده.
  - ۲) کالیبراتورها (AFP Cal A-F): شش ویال با غلظت‌های ۰، ۵، ۲۵، ۵۰، ۲۵۰ و ۵۰۰ ng/mL، تهیه شده از سرم انسان.
  - ۳) محلول کونژوگه آنزیمی (AFP Enzyme Conjugate): یک ویال ۱۱ میلی‌لیتری حاوی آنتی‌بادی متصل به بیوتین و آنتی‌بادی متصل به آنزیم HRP.
  - ۴) محلول شستشو (Wash Solution - 50X): یک ویال ۲۰ میلی‌لیتری.
  - ۵) محلول رنگزا A (Substrate Solution A): یک ویال ۶/۵ میلی‌لیتری.
  - ۶) محلول رنگزا B (Substrate Solution B): یک ویال ۶/۵ میلی‌لیتری.
  - ۷) محلول متوقف‌کننده (Stop Solution): یک ویال ۱۲ میلی‌لیتری.
  - ۸) محلول کنترل (AFP Control): ویال(های) ۰/۵ میلی‌لیتری.
  - ۹) برچسب مخصوص پلیت: یک ورق.
- توجه ۱: تمام محلول‌ها در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شوند. محلول متوقف‌کننده در دمای اتاق نیز قابل نگهداری است.
- توجه ۲: مقادیر کنترل(ها) در برگه COA درج شده 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 کیت‌ها و یا شماره‌های ساخت دیگر جداً خودداری نمایید.
- ۲) کلیه محلول‌ها تا زمان انقضای کیت پایدار هستند. از محلول‌هایی که تاریخ انقضای آن‌ها گذشته است استفاده نکنید.
- ۳) توجه فرمایید محلول‌ها در معرض نور مستقیم قرار نگیرند.
- ۴) محتویات کیت با منشاء انسانی از نظر منفی بودن HBSAg، HIV1/2 و HCV بررسی شده‌اند؛ ولی تشخیص قطعی در مورد منفی بودن تمام عوامل عفونی بیماری‌زا با استفاده از روش‌های متداول آزمایشگاهی امکان‌پذیر نیست. بنابراین، با در نظر گرفتن احتمال

آلودگی و بیماری‌زایی محتویات کیت، تمام مراحل آزمایش باید مطابق دستورالعمل‌های 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 جلوگیری نمایید.

۶) نمونه بیماران، کنترل‌ها، چاهک‌ها و سر سمپلرهای استفاده شده باید به‌عنوان پسماندهای عفونی در نظر گرفته شوند و مطابق با الزامات دفع پسماندهای عفونی امحاء گردند.

## جمع‌آوری، آماده‌سازی و نگهداری نمونه:

۱) نمونه مناسب برای این آزمایش سرم است. ناشتا بودن فرد به هنگام نمونه‌گیری در درستی نتایج به‌دست آمده تأثیرگذار خواهد بود. نمونه خون با استفاده از تکنیک استاندارد خون‌گیری سپاهرگی تهیه شود و سرم بعد از لخته شدن کامل خون (۳۰ تا ۶۰ دقیقه) از سلول‌های خونی جدا گردد. حتی الامکان از نمونه‌های ایکتریک، لیپمیک و همولیز استفاده نشود.

۲) در افرادی که دوز بالایی از بیوتین (>5 mg/day) را دریافت می‌کنند، نمونه‌گیری باید حداقل ۸ ساعت پس از دریافت آخرین دوز بیوتین انجام شود.

۳) درب ظرف نمونه‌ها باید کاملاً بسته باشد. نمونه‌ها تا ۵ روز در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد و حداکثر تا ۱ ماه در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قابل نگهداری و استفاده هستند. از منجمد و ذوب کردن مکرر نمونه‌ها خودداری نمایید.

## آماده‌سازی و نگهداری معرف‌ها:

۱) آماده‌سازی و نگهداری محلول شستشو: حجم ۲۰ میلی‌لیتر از محلول شستشو (50X) را به ۹۸۰ میلی‌لیتر آب مقطر دیونیزه اضافه و پس از آماده‌سازی در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری کنید. در صورت مشاهده رسوب در محلول شستشو، آن را در بن ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار دهید تا رسوب حل شود. در صورت مشاهده کدورت در محلول شستشو، از مصرف آن خودداری نمایید.

۲) آماده‌سازی محلول رنگزا: محلول‌های رنگزا A و B را با حجم‌های مساوی (۱:۱) مخلوط کنید (به‌عنوان مثال، برای تهیه ۲ میلی‌لیتر محلول آماده مصرف، ۱ میلی‌لیتر از محلول رنگزا A را به ۱ میلی‌لیتر از محلول رنگزا B اضافه کنید) و به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی آنکوبه 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 دمای تمام اجزاء کیت و نمونه‌ها به دمای اتاق (۲۲ تا ۲۸ درجه سانتی‌گراد) رسیده‌اند. کالیبراتورها، نمونه‌ها و کنترل‌ها را با ۵ بار سر و ته کردن به‌آرامی یکنواخت کنید.

۱) تعداد چاهک‌های مورد نیاز برای انجام تست را بردارید و بقیه چاهک‌ها را همراه رطوبت‌گیر در کیسه آلومینیومی قرار دهید، درب آن را بسته و در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری نمایید.

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

۳) حجم ۱۰۰ میکرولیتر محلول کونژوگه آنزیمی به هر چاهک اضافه کنید و پلیت را به‌مدت ۳۰ ثانیه روی سطح میز به آرامی تکان دهید.

۴) چاهک‌ها را با برچسب مخصوص پلیت ببوشانید و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق آنکوبه نمایید.

۵) محتویات چاهک‌ها را با وارونه کردن یا آسپیراسیون تخلیه کنید. سپس چاهک‌ها را ۳ مرتبه و هر مرتبه با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشو آماده شده، (بخش آماده‌سازی معرف‌ها را مطالعه فرمایید) بشویید. اگر شستشو به‌صورت دستی انجام می‌شود در انتهای شستشو به آرامی پلیت را بر روی دستمال رطوبت‌گیر بزنید. به‌منظور انجام شستشوی مناسب و استاندارد چاهک‌ها، مطابق با فیلم قرار داده شده در وب‌سایت شرکت اقدام نمایید.

۶) حجم ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رنگزا آماده مصرف (بخش آماده‌سازی معرف‌ها را مطالعه فرمایید) درون تمام چاهک‌ها بریزید و پلیت را به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی آنکوبه کنید. از تکان دادن پلیت در این مرحله خودداری کنید.

توجه: اگر بالاترین میزان جذب نوری کالیبراتور کمتر از ۲ به‌دست آمد، می‌توانید زمان آنکوباسیون 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 به‌عنوان نمونه در زیر آورده شده است.

1. <http://www.samantajhiz.com/Support.aspx>

## علائم استفاده شده در پرچسب کالاها

<b>EC REP</b>	Authorized representative in the European community
	Manufacturer
	Use-by date
<b>LOT</b>	Batch code
<b>IVD</b>	In vitro diagnostic medical device
<b>CE</b>	European conformity
<b>OBL</b>	Own brand Labeling
	Contains sufficient for tests
	Temperature limit
	Date of manufacture

## ۶) 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

## ۷) بررسی اثر هوک (Hook Effect)

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

## ۸) بررسی پایداری (Stability)

**Accelerated Stability Test:** بررسی پایداری کیت به مدت ۴ هفته در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد.  
**In Use Stability Test:** بررسی پایداری کیت پس از باز کردن درب محلول‌ها به مدت ۸ هفته در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد.  
**Shelf Stability Test:** بررسی پایداری ۸ عدد کیت به مدت ۲ سال در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و ارزیابی نتایج به صورت هر سه ماه یک بار می‌باشد.  
 مطالعات مختلف بررسی پایداری نشان می‌دهد که کیت مورد نظر در زمان‌های مشخص شده پایدار است. معیار پذیرش در آزمایش‌های مربوط به تعیین پایداری، تغییر نتایج کمتر از ۲۰ درصد است.

## ۲) بررسی دقت-آزمون دقت بین‌دور (Between-Run)

دقت بین‌تستی 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  $CV < 21.78\%$  است.

Serum Sample	1	2	3
No. of Repeats	20	20	20
Mean AFP (ng/mL)	4.52	10.20	19.71
SD (ng/mL)	0.24	0.51	0.80
CV (%)	5.3	5.0	4.1

## ۳) بررسی درستی-آزمون بازیابی (Recovery)

در این آزمایش به ازاء هر آزمون، دو نمونه سرم به نسبت مساوی با یکدیگر ترکیب شد و به‌عنوان یک نمونه، غلظت AFP در آن سنجش گردید. معیار پذیرش در این آزمایش،  $Bias < 11.22\%$  نسبت به نتیجه مورد انتظار است.

No.	Sample (ng/mL)	Added (ng/mL)	Exp. (ng/mL)	Obs. (ng/mL)	% Rec.
1	5.41	14.73	10.07	10.60	105.3
2	16.80	47.32	32.06	31.25	97.5
3	3.51	27.44	15.47	15.17	98.1

## 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  $Bias < 11.22\%$  است.

No	Sample (ng/mL)	1/2	1/4	1/8	1/16
		% Bias			
1	10.84	0.6	-1.7	1.8	-3.8
2	19.5	-1.2	-1.4	-2.1	-3.4
3	26.8	-0.7	-1.2	-2.7	-3.0

## ۵) بررسی حساسیت (Sensitivity)

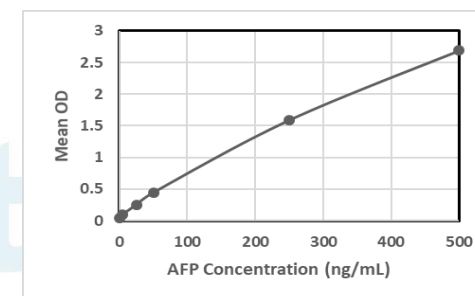
حساسیت کیت بر اساس Limit of Detection (LOD) و Limit of Blank (LOB) با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد و برابر با  $ng/mL \pm 0.5$  تعیین گردید.

$$LOD = LOB + 1.645 SD_s$$

$$LOB = Mean_b + 1.645 SD_b$$

(s: Diluted sample & b: Blank)

Calibrator	Well Number	OD	Mean OD	Conc. (ng/mL)
Cal. A	A1	0.049	0.052	0
	B1	0.055		
Cal. B	C1	0.106	0.110	5
	D1	0.114		
Cal. C	E1	0.263	0.274	25
	F1	0.285		
Cal. D	G1	0.452	0.468	50
	H1	0.484		
Cal. E	A2	1.453	1.476	250
	B2	1.499		
Cal. F	C2	2.681	2.779	500
	D2	2.878		



## 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 باید برای آنالیت مورد نظر توسط آزمایشگاه تعیین گردد.

<b>Normal Range (ng/mL)</b>
< 8.5

## پارامترهای کنترل کیفی

## ۱) بررسی دقت-آزمون دقت درون‌دور (Within-Run)

دقت داخلی 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  $CV < 21.78\%$  است.

Serum Sample	1	2	3
No. of Repeats	20	20	20
Mean AFP (ng/mL)	3.81	8.33	24.15
SD (ng/mL)	0.18	0.36	0.92
CV (%)	4.7	4.3	3.8

www.samantajhiz.com

تهران- بزرگراه آبخناسان- سردار جنگل شمالی- خیابان

پنج تن- بلوار قدس- کوچه دوم شرقی- پلاک ۸

تلفن: ۰۲۱۸۵۵۱۸۰۰۰