



DCM012-13

Ed. 07/2024

AFP ELISA

per analisi di routine

Determinazione immunoenzimatica diretta dell'AFP nel siero o plasma umano

IVD

LOT

Vedere etichetta esterna

2°C 8°C

 $\Sigma = 96$ test

REF DKO012

DESTINAZIONE D'USO

Metodo immunoenzimatico colorimetrico per la determinazione quantitativa della concentrazione dell'AFP in siero o plasma umano.

Il kit AFP ELISA è destinato al solo uso di laboratorio.

1. SIGNIFICATO CLINICO

L'alfa Fetoprotein (AFP) è una glicoproteina di 68 kDa, che normalmente è prodotta soltanto nel feto durante lo sviluppo. È prodotto dal sacco vitellino e dal fegato del feto.

I livelli di AFP diminuiscono presto dopo la nascita e probabilmente non ha alcuna funzione in adulti normali. Lega l'estradiolo per impedirne l'accesso al cervello fetale. La misurazione durante la gravidanza è utile per rilevare determinate anomalie – in particolare, se sono presenti livelli elevati di AFP nel liquido amniotico, questi possono indicare un difetto inerente allo sviluppo nel bambino.

In pazienti non gravide un tumore può produrre AFP, quindi può essere usato come tumour marker. AFP è l'indicatore principale (con HCG) del cancro testicolare e i livelli durante il trattamento possono influenzare la cura.

Come tutti gli indicatori del tumore, la rilevazione di AFP da solo non diagnostica un tumore; in questo caso, se è rilevato è certamente consigliabile indagare la malattia che induce la presenza di AFP. Gli indicatori tumorali sono impiegati per valutare il successo del trattamento (ad esempio chemioterapia), se i livelli di AFP diminuiscono, è un'indicazione che la malattia sta regredendo. Nuove ricerche segnalano, che un'isoforma di AFP che lega l'agglutinina *Lens culinaris* (AFP-L3) può essere particolarmente utile nell'identificazione precoce dei tumori aggressivi connessi con il carcinoma epatocellulare (HCC).

2. PRINCIPIO DEL METODO

L'AFP ELISA test è basato sulla cattura simultanea dell'AFP umana da parte di due anticorpi monoclonali, uno immobilizzato nella micropiastra, l'altro coniugato con la perossidasi di rafano (HRP).

Dopo un determinato periodo di incubazione, la separazione libero-legato si ottiene mediante semplice lavaggio della fase solida.

Successivamente l'enzima HRP presente nella frazione legata, reagendo con il Substrato (H₂O₂) ed il

TMB Substrate, sviluppa una colorazione blu che vira al giallo dopo aggiunta dello Stop Solution (H₂SO₄).

L'intensità del colore sviluppato è proporzionale alla concentrazione di AFP presente nel campione.

La concentrazione dell'AFP nel campione è calcolata in base ad una curva di calibrazione.

3. REATTIVI, MATERIALI E STRUMENTAZIONI

3.1. Reattivi e materiali forniti nel kit

1. Calibrators (5 flaconi, 1 mL ciascuno)

ProClin >0,0015% e BSA 0,1%

CAL0

REF DCE002/1206-0

CAL1

REF DCE002/1207-0

CAL2

REF DCE002/1208-0

CAL3

REF DCE002/1209-0

CAL4

REF DCE002/1210-0

2. Control (1 flacone, 1 mL)

ProClin >0,0015% e BSA 0,1%

La concentrazione del Controllo è indicata sul

Certificato di Analisi

REF DCE045/1203-0

3. Incubation Buffer (1 flacone, 50 mL)

Phosphate buffer 50 mM pH 7.4, BSA 1 g/L. ProClin >0,0015%

REF DCE001/1401-0

4. Conjugate (1 flacone, 1 mL)

Anticorpo anti AFP monoclonale coniugato a perossidasi di rafano (HRP). ProClin >0,0015% e BSA 0,1%

REF DCE002/1202-0

5. Coated Microplate (1 micropiastra breakable)

Anticorpo anti AFP monoclonale adsorbito sulla micropiastra

REF DCE002/1203-0

6. TMB Substrate (1 flacone, 15 mL)

H₂O₂-TMB (0,26 g/L) (evitare il contatto con la pelle).

ProClin <0,0015% REF DCE004-0

7. Stop Solution (1 flacone, 15 mL)

Acido Solforico 0,15 mol/L (evitare il contatto con la pelle)

REF DCE005-0

8. 50X Conc. Wash Solution (1 flacone, 20 mL)

NaCl 45 g/L; Tween-20 55 g/L. ProClin >0,0015%

REF DCE006-0

3.2. Reattivi necessari non forniti nel kit

Acqua distillata.

3.3. Materiale e strumentazione ausiliare

Dispensatori automatici.

Letture per micropiastre (450 nm, 620-630 nm).

Note

Conservare tutti i reattivi a 2-8°C, al riparo dalla luce.

Aprire la busta del Reattivo 5 (Coated microplate) solo dopo averla riportata a temperatura ambiente e chiuderla subito dopo il prelievo delle strips da utilizzare; una volta aperta è stabile fino alla data di scadenza del kit.

4. AVVERTENZE

- Questo test kit è per uso in vitro, da eseguire da parte di personale esperto. Non per uso interno o esterno su esseri Umani o Animali.
- Usare i previsti dispositivi di protezione individuale mentre si lavora con i reagenti forniti.
- Seguire le Buone Pratiche di Laboratorio (GLP) per la manipolazione di prodotti derivati da sangue.
- Alcuni reagenti (calibrators, control, incubation buffer, conjugate e wash solution) contengono piccole quantità di ProClin™ 300 (>0,0015%, <0,06%) come conservante. Evitare il contatto con pelle o mucose.
- Classificazione secondo il regolamento (CE) n. 1272/2008 [CLP]
Sensibilizzazione cutanea, categoria 1



Attenzione

Contiene: ProClin 300

Indicazioni di pericolo:

H317 - Può provocare una reazione allergica cutanea.

Consigli di prudenza:

P261 - Evitare di respirare la polvere / i fumi / i gas / la nebbia / i vapori / gli aerosol.

P280 - Indossare guanti/indumenti protettivi / proteggere gli occhi / proteggere il viso / proteggere l'udito.

P321 - Trattamento specifico (vedere istruzioni supplementari di pronto soccorso su questa etichetta).

P333+P313 - In caso di irritazione o eruzione della pelle: Consultare un medico.

P362+P364 - Togliere tutti gli indumenti contaminati e lavarli prima di indossarli nuovamente.

- Materiali di origine animale usati per la preparazione di questo kit sono stati ottenuti da animali sani e le proteine bovine sono state ottenute da paesi non affetti da BSE, ma comunque questi materiali dovrebbero essere usati come potenzialmente contagiosi.
- Tutti i reattivi di origine umana usati nella preparazione dei reagenti sono stati testati e sono risultati negativi per la presenza di anticorpi anti-HIV 1&2, per HbsAg e per anticorpi anti-HCV. Tuttavia nessun test offre la certezza completa dell'assenza di HIV, HBV, HCV o di altri agenti

infettivi. Pertanto, i reattivi devono essere maneggiati come materiali potenzialmente infettivi.

- Il TMB Substrato contiene un irritante, che può essere dannoso se inalato, ingerito o assorbito attraverso la cute. Per prevenire lesioni, evitare l'inalazione, l'ingestione o il contatto con la cute e con gli occhi.
- La Stop Solution è costituita da una soluzione di acido solforico diluito. L'acido solforico è velenoso e corrosivo e può essere tossico se ingerito. Per prevenire possibili ustioni chimiche, evitare il contatto con la cute e con gli occhi.
- Evitare l'esposizione del reagente TMB/H₂O₂ a luce solare diretta, metalli o ossidanti. Non congelare la soluzione.
- Questo metodo consente di determinare concentrazioni di AFP da 5 ng/mL a 200 ng/mL.

5. PRECAUZIONI

- Si prega di attenersi rigorosamente alla sequenza dei passaggi indicata in questo protocollo. I risultati presentati qui sono stati ottenuti usando specifici reagenti elencati in queste Istruzioni per l'Uso.
- Tutti i reattivi devono essere conservati a temperatura controllata di 2-8°C nei loro contenitori originali. Eventuali eccezioni sono chiaramente indicate. I reagenti sono stabili fino alla data di scadenza se conservati e trattati seguendo le istruzioni fornite.
- Prima dell'uso lasciare tutti i componenti dei kit e i campioni a temperatura ambiente (22-28°C) e mescolare accuratamente.
- Non scambiare componenti dei kit di lotti diversi. Devono essere osservate le date di scadenza riportate sulle etichette della scatola e di tutte le fiale. Non utilizzare componenti oltre la data di scadenza.
- Qualora si utilizzi strumentazione automatica, è responsabilità dell'utilizzatore assicurarsi che il kit sia stato opportunamente validato.
- Un lavaggio incompleto o non accurato dei pozzetti può causare una scarsa precisione e/o un'elevato background. Per migliorare le prestazioni del kit su strumentazione automatica, si consiglia di aumentare il numero di lavaggi.
- Per la riproducibilità dei risultati, è importante che il tempo di reazione di ogni pozzetto sia lo stesso. Per evitare il time shifting durante la dispensazione degli reagenti, il tempo di dispensazione dei pozzetti non dovrebbe estendersi oltre i 10 minuti. Se si protrae oltre, si raccomanda di seguire lo stesso ordine di dispensazione. Se si utilizza più di una piastra, si raccomanda di ripetere la curva di calibrazione in ogni piastra.
- L'aggiunta del TMB Substrato dà inizio ad una reazione cinetica, la quale termina con l'aggiunta della Stop Solution. L'aggiunta del TMB Substrato e della Stop Solution deve avvenire nella stessa sequenza per evitare tempi di reazione differenti.
- Osservare le linee guida per l'esecuzione del controllo di qualità nei laboratori clinici testando controlli e/o pool di sieri.
- Osservare la massima precisione nella ricostituzione e dispensazione dei reagenti.

- Non usare campioni microbiologicamente contaminati, altamente lipemici o emolizzati.
- I lettori di micropiastre leggono l'assorbanza verticalmente. Non toccare il fondo dei pozzetti.

6. PROCEDIMENTO

6.1. Preparazione dei Calibratori (C₀...C₄)

I Calibratori sono pronti all'uso, sono calibrati contro il WHO 1st IS 72/225, ed hanno le seguenti concentrazioni:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄
ng/mL	0	5	20	80	200

I Calibratori sono stabili fino alla data di scadenza riportata in etichetta. Una volta aperti i Calibratori sono stabili per 6 mesi a 2-8°C.

6.2. Preparazione del Coniugato Diluito

Preparare immediatamente prima dell'uso.

Aggiungere 10 µL di Conjugate (reattivo 4) a 1 mL di Incubation Buffer (reattivo 3). La quantità di coniugato da preparare è proporzionale al numero dei test da eseguire.

Mescolare delicatamente lasciando almeno 5 minuti su agitatore rotante.

Stabile per 3 ore a temperatura ambiente (22÷28°C).

6.3. Preparazione del Campione

La determinazione dell'AFP si effettua su siero o plasma umano.

I campioni possono essere conservati a 2-8°C per brevi periodi (massimo due giorni). Per tempi di conservazione più lunghi congelare i campioni a -20°C. Evitare cicli di congelamento e scongelamento.

Per campioni con concentrazione superiore a 200 ng/mL diluire il campione con Incubation buffer.

Il Controllo è pronto all'uso.

6.4. Preparazione della Wash Solution

Prima dell'uso, diluire il contenuto di ogni fiala di "50X Conc. Wash Solution" con acqua distillata fino al volume di 1000 mL. Per preparare volumi minori rispettare il rapporto di diluizione di 1:50. La soluzione di lavaggio diluita è stabile a 2÷8°C per almeno 30 giorni.

6.5. Procedimento

- **Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (22-28°C) per almeno 30 minuti.** Al termine del dosaggio riporre immediatamente tutti i reagenti a 2-8°C: evitare lunghi periodi a temperatura ambiente.
- Le strisce di pozzetti non utilizzate devono essere rimesse immediatamente nella busta richiudibile contenente il materiale essiccante e conservate a 2-8°C.
- Per evitare potenziali contaminazioni microbiche e/o chimiche non rimettere i reagenti inutilizzati nei flaconi originali.
- Al fine di aumentare l'accuratezza dei risultati del test è necessario operare in doppio, allestendo due pozzetti per ogni punto della curva di calibrazione

(C₀-C₄), due per ogni Controllo, due per ogni Campione ed uno per il Bianco

Reagente	Calibratori	Campione /Controllo	Bianco
Calibratori C ₀ -C ₄	25 µL		
Campione /Controllo		25 µL	
Coniugato Diluito	50 µL	50 µL	
Incubare 1 h a temperatura ambiente (22÷28°C). Allontanare la miscela di reazione; lavare 3 volte aggiungendo in ogni pozzetto 0,3 mL di soluzione di lavaggio diluita.			
Nota importante: ad ogni step di lavaggio, agitare delicatamente la piastra per 5 secondi e successivamente rimuovere l'eccesso di soluzione di lavaggio sbattendo delicatamente la micropiastra capovolta su fogli di carta assorbente.			
Lavaggi automatici: se si utilizza strumentazione automatica effettuare almeno 5 lavaggi.			
TMB Substrate	100 µL	100 µL	100 µL
Incubare 15 minuti a temperatura ambiente (22÷28°C), al riparo dalla luce			
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL
Agitare delicatamente la micropiastra. Leggere l'assorbanza (E) a 450 nm contro una lunghezza d'onda di riferimento di 620-630 nm oppure contro il Bianco entro 5 minuti.			

7. CONTROLLO QUALITA'

Ogni laboratorio dovrebbe analizzare i campioni nella gamma dei livelli elevati, normali e bassi di AFP per il controllo delle prestazioni dell'analisi. Questi campioni dovrebbero essere trattati come ignoti ed i valori determinati in ogni test effettuato. Le tabelle di controllo qualità dovrebbero essere effettuate per seguire le prestazioni dei reagenti forniti. Metodi statistici adeguati dovrebbero essere impiegati per accertare il trend. Il laboratorio dovrebbe fissare i limiti di accettabilità di prestazioni dell'analisi. Altri parametri che dovrebbero essere controllati includono le intercette di 80, 50 e 20% della curva di calibrazione per valutare la riproducibilità. In più, la capacità di assorbimento massima dovrebbe essere costante con l'esperienza precedente. Deviazioni significative rispetto alle prestazioni stabilite possono indicare un inosservato cambio di condizioni sperimentali o una degradazione dei reagenti kit. Devono essere usati reagenti freschi per determinare la ragione delle variazioni.

8. RISULTATI

8.1. Estinzione Media

Calcolare l'estinzione media (Em) di ciascun punto della curva di calibrazione (C₀-C₄) e di ogni campione.

8.2. Curva di calibrazione

Tracciare sul grafico delle assorbanze i valori calcolati delle estinzioni medie (E_m) di ciascun calibratore (C_0 - C_4) in funzione delle concentrazioni. Tracciare la miglior curva passante per i punti di calibrazione (es: Four Parameter Logistic).

8.3. Calcolo dei risultati

Interpolare, dal grafico, i valori di assorbanza relativi a ciascun campione e leggerne la corrispondente concentrazione in ng/mL.

9. VALORI DI RIFERIMENTO

In uno studio condotto su adulti apparentemente sani usando l'AFP Dia.Metra, sono stati riscontrati i seguenti risultati:

Popolazione	0-10 ng/mL	20 ng/mL	30 ng/mL
Uomini	82	2	1
Donne	55	1	1

In uno studio condotto con il kit AFP Dia.Metra in pazienti con Neoplasia ai testicoli sono stati osservati i seguenti valori:

Popolazione	0-10 ng/mL	10-100 ng/mL	>100 ng/mL
Uomini	4	5	3

È importante tenere presente che la determinazione di un range di valori attesi in un dato metodo per una popolazione "normale" è dipendente da molteplici fattori, quali la specificità e sensibilità del metodo in uso, e la popolazione in esame. Perciò ogni laboratorio dovrebbe considerare i range indicati dal Fabbricante come un'indicazione generale e produrre range di valori attesi propri basati sulla popolazione indigena dove il laboratorio risiede.

10. PARAMETRI CARATTERISTICI

10.1. Precisione

10.1.1. Intra-Assay

La variabilità all'interno dello stesso kit è stata determinata replicando (16x) la misura di tre differenti sieri di controllo. La variabilità intra-assay è $\leq 6,4\%$.

10.1.2. Inter-Assay

La variabilità tra kit differenti è stata determinata replicando (16x) la misura di tre differenti sieri di controllo con kit appartenenti a lotti diversi. La variabilità inter-assay è $\leq 6,5\%$.

10.2. Specificità

La cross-reattività del kit AFP ELISA è stata calcolata sulla base dei rapporti di masse:

AFP	100 %
β HCG	0,01 %
HCG	0,01 %
hLH	0,01 %
hFSH	0,01 %
hTSH	0,01 %

10.3. Accuratezza

La prova di recupero condotta su campioni arricchiti con 12,5 – 25 – 50 ng/mL di AFP, ha dato un valore medio (\pm SD) di $98,33\% \pm 4,43\%$.

10.4. Sensibilità

La concentrazione minima di AFP misurabile che può essere distinta dal Calibratore 0 è 0,35 ng/mL con un limite di confidenza del 95%.

10.5. Correlazione con il dosaggio RIA

Il kit Dia.Metra AFP ELISA è stato comparato con un kit disponibile in commercio. Sono stati testati i campioni di siero di 32 donne e 4 uomini.

La curva di regressione è :

$$y = 1,04 x - 0,41$$

$$r = 0,99 \quad (r^2 = 0,98)$$

10.6. Effetto "Hook"

In questo metodo non è stato osservato effetto Hook fino a 400 ng/mL.

Per i campioni di pazienti sospettati di essere affetti da condizioni oncologiche, si raccomanda di diluire il campione 1:10 e 1:100 nel tampone di incubazione. Se i risultati con queste diluizioni non sono coerenti, si dovrebbe eseguire un'ulteriore diluizione di 1:1000 per determinare il livello di AFP nel campione del paziente.

11. DISPOSIZIONI PER LO SMALTIMENTO

I reagenti devono essere smaltiti in accordo con le leggi locali.

BIBLIOGRAFIA

1. Wisdom, G.B. Clin. Chem. 22/8 1243 - 1255 (1976)
2. Shome, B, J. Clin. Endocr. Metab.,39, 199–202 (1974)
3. Uotila, M, J. Immunol. Methds, 42, 11-15 (1981)
4. Acosta, A.A.M.D, J. of Clinical Immunoassays, 6, 41 (1983)
5. Jacobsen Acta Path Microb. Immun. Scand. 91 183- 190 (1983)
6. Kohn J Orr AH, McElwain TJ Lancet 2: 433 – 436 (1976)
7. Waaldmann Cancer 34 1510 – 1515, 1974

Ed. 07/2024

DCM012-13



DCM012-13
Ed. 07/2024

AFP ELISA

for routine analysis

Direct immunoenzymatic determination of AFP in human serum or plasma

IVD

LOT

See external label

2°C 8°C

Σ $\Sigma = 96$ tests

REF DKO012

INTENDED USE

Immunoenzymatic colorimetric method for quantitative determination of AFP concentration in human serum or plasma.

AFP ELISA kit is intended for laboratory use only.

1. CLINICAL SIGNIFICANCE

Alpha Fetoprotein (AFP) is a 68 kDa glycoprotein, which is normally only produced in the fetus during its development. It is a normally produced by the liver and yolk sac of the fetus.

AFP levels decrease soon after birth and probably has no function in normal adults. It binds the hormone estradiol to keep it from affecting the fetal brain. Its measurement during pregnancy has been useful to detect certain abnormalities - specifically, if high levels of AFP are found in amniotic fluid, it can indicate a developmental defect in the baby.

In some patients who are not pregnant a tumor can produce AFP, thus it can be used as a tumour marker. AFP is the main tumour marker (along with HCG) to diagnose testicular cancer and its values over time can have significant effect on the treatment plan.

Like all tumour markers, the detection of AFP by itself is not diagnostic of anything, although if it is detected it is certainly advisable to rule out the diseases could cause levels to rise. The primary reason tumor markers are used are to measure the success of a treatment (e.g. chemotherapy), if levels of AFP are going down, it is an indication that a disease is improving. New research exhibits that an isoform of AFP which binds *Lens culinaris* agglutinin (AFP-L3) can be particularly useful in early identification of aggressive tumors associated with hepatocellular carcinoma (HCC).

2. PRINCIPLE

AFP ELISA test is based on simultaneous binding of human AFP to two monoclonal antibodies, one immobilized on microwell plates, the other conjugated with horseradish peroxidase (HRP).

After incubation, the separation bound-free is obtained with a simple solid-phase washing.

Then the enzyme HRP in the bound-fraction reacts with the Substrate (H₂O₂) and the TMB Substrate and

develops a blue color that changes into yellow when the Stop Solution (H₂SO₄) is added.

The colour intensity is proportional to the AFP concentration in the sample.

The AFP concentration in the sample is calculated through a calibration curve.

3. REAGENTS, MATERIALS AND INSTRUMENTATION

3.1. Reagents and materials supplied in the kit

1. Calibrators (5 vials, 1 mL each)

ProClin >0.0015% and BSA 0.1%

CAL0

REF DCE002/1206-0

CAL1

REF DCE002/1207-0

CAL2

REF DCE002/1208-0

CAL3

REF DCE002/1209-0

CAL4

REF DCE002/1210-0

2. Control (1 vial, 1 mL)

ProClin >0.0015% and BSA 0.1%

Concentration of Control is indicated on the Certificate of Analysis

REF DCE045/1203-0

3. Incubation Buffer (1 vial, 50 mL)

Phosphate buffer 50 mM pH 7.4; BSA 1 g/L. ProClin >0.0015%

REF DCE001/1401-0

4. Conjugate (1 vial, 1 mL)

Monoclonal anti AFP antibody conjugated with Horseradish peroxidase (HRP). ProClin >0.0015%

and BSA 0.1%

REF DCE002/1202-0

5. Coated Microplate (1 breakable microplate)

Monoclonal anti AFP antibody adsorbed on microplate

REF DCE002/1203-0

6. TMB Substrate (1 vial, 15 mL)

H₂O₂-TMB 0.26 g/L (avoid any skin contact). ProClin <0.0015%

REF DCE004-0

7. Stop Solution (1 vial, 15 mL)

Sulphuric acid 0.15 mol/L (avoid any skin contact)

REF DCE005-0

8. 50X Conc. Wash Solution (1 vial, 20 mL)

NaCl 45 g/L; Tween-20 55 g/L. ProClin >0.0015%

REF DCE006-0

3.2. Reagents necessary not supplied

Distilled water.

3.3. Auxiliary materials and instrumentation

Automatic dispenser.

Microplates reader (450 nm, 620-630 nm)

Note

Store all reagents at 2-8°C in the dark.

Open the bag of reagent 5 (Coated Microplate) only when it is at room temperature and close it immediately after use; once opened, it is stable until expiry date of the kit.

4. WARNINGS

- This kit is intended for in vitro use by professional persons only. Not for internal or external use in Humans or Animals.
- Use appropriate personal protective equipment while working with the reagents provided.
- Follow Good Laboratory Practice (GLP) for handling blood products.
- Some reagents (calibrators, control, incubation buffer, conjugate and wash solution) contain small amounts of ProClin™ 300 (>0.0015%, <0.06%) as preservative. Avoid contact with skin or mucosa.
- Classification according to Regulation (EC) No. 1272/2008 [CLP]
Skin sensitivity, Category 1



Warning

Contains: ProClin 300

Hazard statements:

H317 - May cause an allergic skin reaction.

Precautionary statements:

P261 - Avoid breathing dust / fume / gas / mist / vapours / spray.

P280 - Wear protective gloves/ protective clothing / eye protection / face protection / hearing protection.

P321 - Specific treatment (see supplemental first aid instruction on this label).

P333+P313 - If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/attention.

P362+P364 - Take off contaminated clothing and wash it before reuse.

- Material of animal origin used in the preparation of the kit has been obtained from animals certified as healthy and the bovine protein has been obtained from countries not infected by BSE, but these materials should be handled as potentially infectious.
- All human source material used in the preparation of the reagents has been tested and found negative for antibody to HIV 1&2, HbsAg, and HCV. No test method however can offer complete assurance that HIV, HBV, HCV or other infectious agents are absent. Therefore, the reagents should be handled in the same manner as potentially infectious material.

- The TMB Substrate contains an irritant, which may be harmful if inhaled, ingested or absorbed through the skin. To prevent injury, avoid inhalation, ingestion or contact with skin and eyes.
- The Stop Solution consists of a diluted sulphuric acid solution. Sulphuric acid is poisonous and corrosive and can be toxic if ingested. To prevent chemical burns, avoid contact with skin and eyes.
- Avoid the exposure of reagent TMB/H₂O₂ to directed sunlight, metals or oxidants. Do not freeze the solution.
- This method allows the determination of AFP from 5 ng/mL to 200 ng/mL.

5. PRECAUTIONS

- Please adhere strictly to the sequence of pipetting steps provided in this protocol. The performance data represented here were obtained using specific reagents listed in this Instruction For Use.
- All reagents should be stored refrigerated at 2-8°C in their original container. Any exceptions are clearly indicated. The reagents are stable until the expiry date when stored and handled as indicated.
- Allow all kit components and specimens to reach room temperature (22-28°C) and mix well prior to use.
- Do not interchange kit components from different lots. The expiry date printed on box and vials labels must be observed. Do not use any kit component beyond their expiry date.
- If you use automated equipment, the user has the responsibility to make sure that the kit has been appropriately tested.
- The incomplete or inaccurate liquid removal from the wells could influence the assay precision and/or increase the background. To improve the performance of the kit on automatic systems is recommended to increase the number of washes.
- It is important that the time of reaction in each well is held constant for reproducible results. Pipetting of samples should not extend beyond ten minutes to avoid assay drift. If more than 10 minutes are needed, follow the same order of dispensation. If more than one plate is used, it is recommended to repeat the dose response curve in each plate
- Addition of the TMB Substrate solution initiates a kinetic reaction, which is terminated by the addition of the Stop Solution. Therefore, the TMB Substrate and the Stop Solution should be added in the same sequence to eliminate any time deviation during the reaction.
- Observe the guidelines for performing quality control in medical laboratories by assaying controls and/or pooled sera.
- Maximum precision is required for reconstitution and dispensation of the reagents.
- Samples microbiologically contaminated, highly lipemic or haemolysed should not be used in the assay.
- Plate readers measure vertically. Do not touch the bottom of the wells.

6. PROCEDURE

6.1. Preparation of the Calibrators (C₀...C₄)

The Calibrators are ready to use, are calibrated against the WHO 1st IS 72/225 and have the following concentrations:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄
ng/mL	0	5	20	80	200

The Calibrators are stable until the expiry date printed on the label. Once opened, the calibrators are stable six months at 2-8°C

6.2. Preparation of Diluted Conjugate

Prepare immediately before use.

Add 10 µL of Conjugate (reagent 4) to 1 mL of Incubation Buffer (reagent 3). The quantity of diluted conjugate is proportional at the number of the tests.

Mix gently for 5 minutes, with a rotating mixer.

Stable for 3 hours at room temperature (22÷28°C).

6.3. Preparation of the Sample

AFP determination should be done in human serum or plasma.

Specimen can be stored at 2÷8°C for at short time (max two days). For longer storage the specimen should be frozen at -20°C. Avoid repeated freezing and thawing.

For sample with concentration over 200 ng/mL dilute the sample with Incubation buffer.

The Control is ready to use.

6.4. Preparation of Wash Solution

Dilute the content of each vial of the "50X Conc. Wash Solution" with distilled water to a final volume of 1000 mL prior to use. For smaller volumes respect the 1:50 dilution ratio. The diluted wash solution is stable for 30 days at 2÷8°C.

6.5. Procedure

- **Allow all reagents to reach room temperature (22-28°C) for at least 30 minutes.** At the end of the assay, store immediately the reagents at 2-8°C: avoid long exposure to room temperature.
- Unused coated microwell strips should be released securely in the foil pouch containing desiccant and stored at 2-8°C.
- To avoid potential microbial and/or chemical contamination, unused reagents should never be transferred into the original vials.
- As it is necessary to perform the determination in duplicate in order to improve accuracy of the test results, prepare two wells for each point of the calibration curve (C₀-C₄), two for each Control, two for each sample, one for Blank.

Reagent	Calibrator	Sample/Control	Blank
Calibrator C ₀ -C ₄	25 µL		
Sample/Control		25 µL	
Diluted Conjugate	50 µL	50 µL	
Incubate at room temperature (22÷28°C) for 1 hour. Remove the contents from each well; wash the wells 3 times with 300 µL of diluted wash solution. Important note: during each washing step, gently shake the plate for 5 seconds and remove excess solution by tapping the inverted plate on an absorbent paper towel. Automatic washer: if you use automated equipment, wash the wells at least 5 times.			
TMB Substrate	100 µL	100 µL	100 µL
Incubate at room temperature (22÷28°C) for 15 minutes in the dark.			
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL
Shake the microplate gently. Read the absorbance (E) at 450 nm against a reference wavelength of 620-630 nm or against Blank within 5 minutes.			

7. QUALITY CONTROL

Each laboratory should assay controls at normal, high and low levels range of AFP for monitoring assay performance. These controls should be treated as unknowns and values determined in every test procedure performed. Quality control charts should be maintained to follow the performance of the supplied reagents. Pertinent statistical methods should be employed to ascertain trends. The individual laboratory should set acceptable assay performance limits. Other parameters that should be monitored include the 80, 50 and 20% intercepts of the calibration curve for run-to-run reproducibility. In addition, maximum absorbance should be consistent with past experience. Significant deviation from established performance can indicate unnoticed change in experimental conditions or degradation of kit reagents. Fresh reagents should be used to determine the reason for the variations.

8. RESULTS

8.1. Mean Absorbance

Calculate the mean of the absorbance (E_m) for each point of the calibration curve (C₀-C₄) and of each sample.

8.2. Calibration curve

Plot the values of absorbance (Em) of the calibrators (C₀-C₄) against concentration. Draw the best-fit curve through the plotted points. (Es: Four Parameter Logistic).

8.3. Calculation of Results

Interpolate the values of the samples on the calibration curve to obtain the corresponding values of the concentrations expressed in ng/mL.

9. REFERENCE VALUES

In a study conducted with apparently normal healthy adults, using Dia.Metra AFP, the following results were observed:

Population	0-10 ng/mL	20 ng/mL	30 ng/mL
Males	82	2	1
Females	55	1	1

In a study conducted with nonseminomatous testicular cancer patient using AFP, the following values were observed:

Population	0-10 ng/mL	10-100 ng/mL	>100 ng/mL
Males	4	5	3

Please pay attention to the fact that the determination of a range of expected values for a "normal" population in a given method is dependent on many factors, such as specificity and sensitivity of the method used and type of population under investigation. Therefore each laboratory should consider the range given by the Manufacturer as a general indication and produce their own range of expected values based on the indigenous population where the laboratory works.

10. PERFORMANCE AND CHARACTERISTICS

10.1. Precision

10.1.1. Intra Assay Variation

Within run variation was determined by replicate (16x) the measurement of three different control sera in one assay. The within assay variability is ≤ 6.4%.

10.1.2. Inter Assay Variation

Between run variation was determined by replicate (16x) the measurements of three different control sera in different lots. The between assay variability is ≤ 6.5%.

10.2. Specificity

The cross reaction of the antibody calculated at 50% according to Abraham are shown in the table:

AFP	100 %
βHCG	0.01 %
HCG	0.01 %
hLH	0.01 %
hFSH	0.01 %
hTSH	0.01 %

10.3. Accuracy

The recovery of 12.5 – 25 – 50 ng/mL of AFP added to sample gave an average value (±SD) of 98.33% ± 4.43% with reference to the original concentrations.

10.4. Sensitivity

The lowest detectable concentration of AFP that can be distinguished from the Calibrator 0 is 0.35 ng/mL at the 95% confidence limit.

10.5. Correlation with RIA

Dia.Metra AFP ELISA was compared to another commercially available AFP assay. Serum samples of 32 females and 4 males were analysed according in both test systems.

The linear regression curve was calculated:

$$y = 1.04 x - 0.41 \quad r = 0.99 \quad (r^2 = 0.98)$$

10.6. Hook Effect

The AFP ELISA shows no Hook Effect up to 400 ng/mL.

For samples from patients suspected to be affected by oncological conditions it is recommended to dilute the sample 1:10 and 1:100 in incubation buffer. If results with these dilutions is not consistent, a further dilution of 1:1000 should be performed to determine AFP level within the patient sample.

11. WASTE MANAGEMENT

Reagents must be disposed off in accordance with local regulations.

BIBLIOGRAPHY

1. Wisdom, G.B. Clin. Chem. 22/8 1243 - 1255 (1976)
2. Shome, B, J. Clin. Endocr. Metab.,39, 199–202 (1974)
3. Uotila, M, J. Immunol. Methds, 42, 11-15 (1981)
4. Acosta, A.A.M.D, J. of Clinical Immunoassays, 6, 41 (1983)
5. Jacobsen Acta Path Microb. Immun. Scand. 91 183- 190 (1983)
6. Kohn J Orr AH, McElwain TJ Lancet 2: 433 – 436 (1976)
7. Waaldmann Cancer 34 1510 – 1515, 1974



DCM012-13
Ed. 07/2024

AFP ELISA

para análisis de rutina

Determinación inmunoenzimática directa de AFP en suero o plasma humano

IVD

LOT

Ver etiqueta externa

2°C 8°C

Σ = 96 ensayos

REF DKO012

USO PREVISTO

Método inmunoenzimático colorimétrico competitivo para la determinación cuantitativa de la concentración de AFP en suero y plasma.

El kit AFP ELISA está destinado al uso en laboratorio exclusivamente.

1. IMPORTANCIA CLÍNICA

La alfa fetoproteína (AFP) es una glicoproteína de 68 kDa, que normalmente se produce sólo durante el desarrollo fetal. Es producida por el saco vitelino y el hígado fetal. Los niveles disminuyen poco después de nacer y, probablemente, no tiene ninguna función en los adultos normales. Se une al estradiol para impedir el acceso al cerebro del feto. La medida es útil durante el embarazo para detectar ciertas anomalías - en particular, si hay un alto nivel de AFP en el líquido amniótico, puede ser indicio de un defecto inherente en el desarrollo del niño. En pacientes no embarazadas, un tumor puede producir AFP, por lo que se puede utilizar como marcadores tumorales. AFP es el principal indicador (con GCH) en el cáncer testicular y los niveles durante el tratamiento pueden indicar si el protocolo terapéutico es adecuado.

Al igual que con todos los indicadores de los tumores, la detección de la AFP por sí misma no diagnostica un tumor; si se detectan valores de AFP elevados se recomienda investigar la causa de la elevación. Los marcadores tumorales se utilizan para evaluar el éxito del tratamiento (por ejemplo, quimioterapia), si los niveles de AFP caen, es una indicación de que la enfermedad está en remisión. Una nueva investigación muestra que la isoforma de la AFP que se une a la aglutinina Lens culinaris (AFP-L3) puede ser particularmente útil en la detección precoz de tumores agresivos asociados con carcinoma hepatocelular (HCC).

2. PRINCIPIO DEL MÉTODO

La prueba se basa en la captura simultánea de la AFP por dos anticuerpos monoclonales humanos, un inmovilizado en placas de microtitulación y el otro conjugado con peroxidasa de rábano (HRP).

Después de un período de incubación la separación de las fracciones libre y unida se obtiene mediante un simple lavado de la fase sólida. Por último, al

reaccionar con el sustrato (H₂O₂) y el sustrato TMB, la enzima presente en la fracción unida desarrolla una coloración azul que se torna amarilla tras añadir la solución de parada (H₂SO₄).

La intensidad del color desarrollado es proporcional a la concentración de AFP en la muestra.

La concentración de AFP en la muestra se calcula a partir de una curva de calibración.

3. REACTIVOS, MATERIALES E INSTRUMENTOS

3.1 Reactivos y materiales incluidos en el kit

1. Calibradores (5 frascos, 1 mL cada uno)

Proclin >0,0015% y BSA 0,1%

CAL0

REF DCE002/1206-0

CAL1

REF DCE002/1207-0

CAL2

REF DCE002/1208-0

CAL3

REF DCE002/1209-0

CAL4

REF DCE002/1210-0

2. Control (1 frasco, 1 mL)

Proclin >0,0015% y BSA 0,1%

La concentración del Control se indica en el certificado de calidad (Certificate of Analysis)

REF DCE045/1203-0

3. Tampón de incubación (1 frasco, 50 mL)

Tampón fosfato 50 mM pH 7.4; BSA 1 g/L. Proclin >0,0015%

REF DCE001/1401-0

4. Conjugado (1 frasco, 1 mL)

Anticuerpo anti AFP monoclonal conjugado con peroxidasa de rábano (HRP). Proclin >0,0015% y BSA 0,1%

REF DCE002/1202-0

5. Microplaca recubierta (1 microplaca divisible)

Anticuerpo anti AFP monoclonal absorbido en la microplaca

REF DCE002/1203-0

6. Sustrato TMB (1 frasco, 15 mL)

H₂O₂-TMB (0,26 g/L) (evítese el contacto con la piel). Proclin <0,0015%

REF DCE004-0

7. Solución de parada (1 frasco, 15 mL)

Ácido sulfúrico 0,15 mol/L (evítese el contacto con la piel)

REF DCE005-0

8. Solución de lavado conc.50X (1 frasco, 20 mL)

NaCl 45 g/L; Tween-20 55 g/L. Proclin >0,0015%

REF DCE006-0

3.2 Reactivos necesarios no incluidos en el kit

Agua destilada

3.3 Material e instrumental auxiliar

Dispensadores automáticos

Lector de microplacas (450 nm, 620-630 nm).

Notas

Conservar los reactivos a oscuras, a temperatura entre 2 y 8 °C.

Llevar a temperatura ambiente la bolsa del reactivo 5 (microplaca recubierta) antes de abrirla; cerrarla de inmediato después de sacar las tiras que se han de utilizar; *una vez abierta, permanece estable hasta la fecha de caducidad del kit.*

4. ADVERTENCIAS

- Este kit de ensayo está previsto para usarse in vitro y por personal experto. No es para uso interno o externo en humanos o animales.
- Usar los equipos de protección individual previstos al trabajar con los reactivos suministrados.
- Siga las Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP) en el manejo de las muestras sanguíneas y sus derivados.
- Algunos reactivos (calibrador, control, tampón de incubación, conjugado y solución de lavado) contienen pequeñas cantidades de ProClin™ 300 (>0,0015%, <0,06%) como conservante. Evite el contacto con la piel o las mucosas.
- Clasificación según Reglamento (UE) n° 1272/2008 [CLP]
Sensibilización cutánea, categoría 1



Atención

Contiene: ProClin 300

Indicaciones de peligro:

H317 - Puede provocar una reacción alérgica en la piel.

Consejos de prudencia:

P261 - Evitar respirar el polvo / el humo / el gas / la niebla / los vapores / el aerosol.

P280 - Llevar guantes / ropa de protección / equipo de protección para los ojos / la cara / los oídos.

P321 - Se necesita un tratamiento específico (ver instrucciones de primeros auxilios en esta etiqueta).

P333+P313 - En caso de irritación o erupción cutánea: Consultar a un médico.

P362+P364 - Quitar las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas.

- Materiales de origen animal utilizados para la elaboración de este kit se obtuvieron a partir de animales sanos y las proteínas de bovino se obtuvieron de los países no afectados por la EEB, aun así estos materiales se deben manejar como potencialmente infecciosos.

- Todos los reactivos de origen humano usados en la preparación de los reactivos se han comprobado y han resultado negativos para la presencia de anticuerpos anti-VIH, para HbsAg y para anticuerpos anti-VHC. Sin embargo, ningún ensayo ofrece seguridad absoluta de la ausencia de VIH, VHB, VHC o de otros agentes infecciosos. Por lo tanto, los reactivos deben manipularse como material potencialmente infeccioso.
- El cromógeno TMB contiene un irritante que puede ser dañino si se inhala, se ingiere o se absorbe a través de la piel. Para prevenir lesiones, evitar la inhalación, la ingestión o el contacto con la piel y con los ojos.
- La solución de parada está formada por una solución de ácido sulfúrico diluido. El ácido sulfúrico es venenoso y corrosivo, y puede ser tóxico si se ingiere. Para prevenir posibles quemaduras químicas, evitar el contacto con la piel y con los ojos.
- Evite la exposición de los reactivos TMB/H₂O₂ a la luz solar directa, metales u oxidantes. No congelar la solución.
- Con este método pueden determinarse cuantitativamente valores de AFP desde 5 hasta 200 ng/mL.

5. PRECAUCIONES

- Respetar rigurosamente la secuencia de los pasos indicados en este protocolo. Los resultados aquí presentados se han obtenido utilizando los reactivos específicos que figuran en estas instrucciones de uso.
- Todos los reactivos deben conservarse a una temperatura controlada de 2-8°C en sus recipientes originales. Todas las excepciones están claramente marcados. Los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad cuando se almacenan y manipulan de acuerdo con las instrucciones proporcionadas.
- Antes del uso, esperar hasta que todos los componentes del kit y las muestras se encuentren a temperatura ambiente (22-28°C) y mezclar cuidadosamente.
- No mezclar componentes de kits de lotes distintos. Se debe observar la fecha de caducidad indicada en la etiqueta de la caja y de todas las ampollas. No usar componentes después de la fecha de caducidad.
- Si utiliza un equipo automático, es responsabilidad del usuario asegurar que la metodología aplicada ha sido debidamente validada.
- Un lavado incompleto o impreciso y la aspiración insuficiente del líquido de los micropozos ELISA pueden causar una precisión pobre y/o un elevado fondo. Para mejorar el rendimiento del kit en los sistemas automatizados, se recomienda aumentar el número de lavados.
- Para la reproducibilidad de los resultados, es importante que el tiempo de reacción sea igual para cada pocillo. El tiempo de dispensación de los pocillos no debe superar los 10 minutos; si se

prolongara más allá de los 10 minutos, respétese el orden de dispensación. Si utiliza más de una placa, se recomienda repetir la curva de calibración en cada placa.

- Al añadir el sustrato TMB inicia una reacción cinética que termina al agregar la solución de parada. Tanto el sustrato como la solución de parada deben agregarse en la misma secuencia para evitar diferentes tiempos de reacción.
- Observar las directrices para la ejecución del control de calidad en los laboratorios clínicos al comprobar controles y/o pool de sueros.
- Observar la máxima precisión en la reconstitución y dispensación de los reactivos.
- No use muestras con contaminación microbiana, altamente lipémicas o hemolizadas.
- Los lectores de microplacas leen las DO verticalmente, por tanto no debe tocarse el fondo de los pocillos.

6. PROCEDIMIENTO

6.1 Preparación de los Calibradores (C₀...C₄)

Los Calibradores son listo para usar, son calibrados frente al estándar internacional WHO 1st IS 72/225, y tienen las siguientes concentraciones de AFP:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄
ng/mL	0	5	20	80	200

Los Calibradores son estables hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta. Una vez abiertos, los Calibradores permanecen estables 6 meses conservados a 2-8 °C.

6.2. Preparación de conjugado diluido

Preparar inmediatamente antes de su uso.

Agregar 10 µL de conjugado (reactivo 3) a 1 mL de tampón de incubación (reactivo 2). Prepare la cantidad de conjugado proporcionalmente al número de test que se deben ejecutar.

Mezclar suavemente, dejando al menos 5 minutos en un agitador rotatorio.

Estable durante 3 horas a temperatura ambiente (22÷ 28°C).

6.3 Preparación de la muestra

La determinación de AFP se puede realizar en plasma o suero humano.

Las muestras pueden ser almacenadas a 2-8°C por periodos cortos (hasta dos días), para periodos superiores congele las muestras a -20°C. Evitar los ciclos de descongelación y congelación.

Para muestras con concentraciones superiores a 200 ng/mL diluir la muestra con tampón de incubación.

El Control está listo para usar.

6.4 Preparación de la solución de lavado

Antes del uso, diluir el contenido de cada ampolla de "Solución de lavado conc. 50X" con agua destilada hasta un volumen de 1000 mL.

Para preparar volúmenes menores, respetar la relación de dilución de 1:50. La solución de lavado diluida se mantiene estable a 2÷8°C durante al menos 30 días.

6.5 Procedimiento

- **Esperar hasta que todos los reactivos se encuentren a temperatura ambiente (22-28°C) durante al menos 30 minutos.** Al final del ensayo inmediatamente poner todos los reactivos a 2-8°C para evitar largos periodos a temperatura ambiente.
- Las tiras de pocillos no utilizados se deben guardar de inmediato en la bolsa desechable que contiene desecantes y almacenarse a 2-8°C.
- Para evitar la contaminación microbiana y/o química no regrese porciones de reactivos no usados en los viales originales.
- Para aumentar la precisión de los resultados de la prueba es necesario trabajar en duplicado: preparar dos pocillos para cada punto de la curva de calibración (C₀-C₄), dos para cada control, dos para cada muestra, uno para el blanco.

Reactivo	Calibrador	Muestra/ Control	Blanco
Calibrador C ₀ -C ₄	25 µL		
Muestra/ Control		25 µL	
Conjugado diluido	50 µL	50 µL	
Incubar 1 h a temperatura ambiente (22÷28°C). Retirar la mezcla de reacción. Lave los pozos 3 veces con 0,3 mL de solución de lavado diluida. Nota importante: agite suavemente la placa durante 5 segundos en cada paso del lavado. Después del último lavado asegúrese haber eliminado completamente la solución de lavado de los pozos, invierta la placa y golpéela repetidas veces contra una servilleta de papel absorbente. Lavados automático: si está utilizando una lavadora automática, lavar los pocillos al menos 5 veces.			
TMB Sustrato	100 µL	100 µL	100 µL
Incubar 15 minutos a temperatura ambiente (22÷28°C), protegida de la luz.			
Solución de parada	100 µL	100 µL	100 µL
Agitar suavemente la placa. Leer la absorbancia (E) a 450 nm frente una segunda lectura de referencia a 620-630 nm o frente al blanco dentro de los 5 minutos.			

7. CONTROL DE CALIDAD

Cada laboratorio debe analizar sueros control para los rangos bajo, medio y alto de AFP para supervisar el rendimiento del análisis. Estas muestras deben tratarse como desconocidas y los valores deben determinarse en cada ensayo realizado. Se deben mantener los gráficos de control de calidad para seguir el rendimiento de los reactivos suministrados. Se deben emplear métodos estadísticos adecuados para determinar las tendencias. El laboratorio debe establecer los límites de aceptabilidad del rendimiento del análisis. Entre otros parámetros que se deben controlar, se incluyen las intersecciones de 80, 50 y 20% de la curva de calibración para evaluar la reproducibilidad. Además, la capacidad de absorción máxima debe ser constante con la experiencia anterior. Una desviación significativa del rendimiento establecido puede indicar un cambio inadvertido en las condiciones experimentales o la degradación de los reactivos del kit. Se deben usar reactivos frescos para determinar la causa de las variaciones.

8 RESULTADOS

8.1 Absorbancia media

Calcular la extinción media (E_m) de cada punto de la curva de calibración (C_0 - C_4) y de cada muestra.

8.2 Curva de calibración

Trazar el gráfico de la absorbancia (E_m) en función de las concentraciones de los Calibradores (C_0 - C_4). Trazar la curva de ajuste óptimo para los puntos de calibración (p. ej.: Logística de cuatro parámetros).

8.3 Cálculo de los resultados

Interpolar del gráfico los valores de absorbancia relativos a cada muestra y leer la concentración correspondiente en ng/mL.

9. VALORES DE REFERENCIA

En un estudio de los adultos sanos utilizando la AFP Dia.Metra, se encontraron los siguientes resultados:

Población	0-10 ng/mL	20 ng/mL	30 ng/mL
Hombres	82	2	1
Mujeres	55	1	1

En un estudio realizado con el kit AFP Dia.Metra en pacientes con tumor testicular se observaron los siguientes valores

Población	0-10 ng/mL	10-100 ng/mL	>100 ng/mL
Hombres	4	5	3

Es importante señalar que la determinación de un rango de valores esperados en un método dado para una población "normal" depende de muchos factores, tales como la especificidad y sensibilidad del método en uso, y la población en estudio. Por lo tanto, cada laboratorio debe considerar el intervalo especificado por el fabricante como una guía general y producir su propio rango de valores calculados en base al estadístico obtenido por el laboratorio, donde reside la población local.

10. CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

10.1 Precisión

10.1.1 Intra ensayo

La variabilidad dentro del mismo kit se determinó repitiendo (16x) tres niveles diferentes de sueros de control. La variabilidad dentro del ensayo es $\leq 6.4\%$.

10.1.2 Entre ensayos

La variabilidad entre kits diferentes se determinó repitiendo (16x) tres niveles diferentes de suero de control con dos kit de lotes diferentes. La variabilidad entre ensayos es $\leq 6.5\%$.

10.2 Especificidad

La reactividad cruzada de los kits de ELISA AFP se calculó sobre la base de las relaciones de las masas:

AFP	100 %
β HCG	0,01 %
HCG	0,01 %
hLH	0,01 %
hFSH	0,01 %
hTSH	0,01 %

10.3 Exactitud

La prueba de recuperación realizada en muestras enriquecidas con 12.5 - 25 - 50 ng/mL de AFP ha dado un valor medio (\pm SE) de $98.33\% \pm 4.43\%$.

10.4 Sensibilidad

La concentración de AFP medida que se puede distinguir de Calibrador 0 es de 0,35 ng/mL, con un límite de confianza del 95%.

10.5 Correlación

El AFP ELISA fue comparado con otro ensayo comercial de AFP. Se analizaron 32 muestras de suero de mujeres y 4 de hombres.

Se calculó la curva de regresión lineal:

$$Y = 1.04 * X - 0.41$$

$$r^2 = 0,98$$

10.6 Efecto "Hook"

Este método no afecta "Hook" se observó hasta 400 ng/mL.

En el caso de muestras de pacientes con sospecha de padecer enfermedades oncológicas, se recomienda diluir la muestra en una proporción de 1:10 y 1:100 en el tampón de incubación. Si los resultados con estas diluciones no son consistentes, se debe realizar una dilución adicional de 1:1000

para determinar el nivel de AFP en la muestra del paciente.

11. INDICACIONES PARA LA ELIMINACIÓN














Eliminar los reactivos conforme con la normativa local sobre la materia.

BIBLIOGRAFÍA

1. Wisdom, G.B. Clin. Chem. 22/8 1243 - 1255 (1976)
2. Shome, B, J. Clin. Endocr. Metab.,39, 199–202 (1974)
3. Uotila, M, J. Immunol. Methds, 42, 11-15 (1981)
4. Acosta, A.A.M.D, J. of Clinical Immunoassays, 6, 41 (1983)
5. Jacobsen Acta Path Microb. Immun. Scand. 91 183- 190 (1983)
6. Kohn J Orr AH, McElwain TJ Lancet 2: 433 – 436 (1976)
7. Waaldmann Cancer 34 1510 – 1515, 1974

Ed. **07/2024**

DCM012-13

	DE <i>In vitro</i> Diagnostikum ES Producto sanitario para diagnóstico <i>In vitro</i> FR Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i> EN <i>In vitro</i> Diagnostic Medical Device IT Dispositivo medico-diagnostico <i>in vitro</i> PT Dispositivos medicos de diagnostico <i>in vitro</i>		DE Hergestellt von ES Elaborado por FR Fabriqué par EN Manufacturer IT Produttore PT Produzido por
	DE Achtung, Begleitedokumente ES Precaución, consulte los documentos adjuntos FR Attention, veuillez consulter les documents d'accompagnement EN Caution, consult accompanying documents IT Attenzione, consultare la documentazione allegata PT Atenção,consultar os documentos de acompanhamento	 yyyy-mm	DE Herstellungs datum ES Fecha de fabricacion FR Date de fabrication EN Date of manufacture IT Data di produzione PT Data de produção
 yyyy-mm-dd	DE Verwendbar bis ES Estable hasta (usar antes de último día del mes) FR Utiliser avant (dernier jour du mois indiqué) EN Use by (last day of the month) IT Utilizzare prima del (ultimo giorno del mese) PT Utilizar (antes ultimo dia do mês)		DE Biogefährdung ES Riesco biológico FR Risque biologique EN Biological risk IT Rischio biologico PT Risco biológico
	DE Gebrauchsanweisung beachten ES Consultar las instrucciones FR Consulter le mode d'emploi EN Consult instructions for use IT Consultare le istruzioni per l'uso PT Consultar instruções para uso		DE Chargenbezeichnung ES Código de lote FR Numero de lot EN Batch code IT Codice del lotto PT Código do lote
 $\Sigma = xx$	DE Ausreichend für "n" Tests ES Contenido suficiente para "n" tests FR Contenu suffisant pour "n" tests EN Contains sufficient for "n" tests IT Contenuto sufficiente per "n" saggi PT Contém o suficiente para "n" testes		DE Inhalt ES Contenido del estuche FR Contenu du coffret EN Contents of kit IT Contenuto del kit PT Conteúdo do kit
 Max Min	DE Temperaturbereich ES Limitación de temperatura FR Limites de température de conservation EN Temperature limitation IT Limiti di temperatura PT Temperaturas limites de conservação		DE Bestellnummer ES Número de catálogo FR Références du catalogue EN Catalogue number IT Numero di Catalogo PT Número do catálogo
	DE Vor direkter Sonneneinstrahlung schützen ES Mantener alejado de la luz solar FR Tenir à l'écart de la lumière du soleil EN Keep away from sunlight IT Tenere lontano dalla luce solare PT Mantenha longe da luz solar		