

INTENCIÓN DE USO

El kit Alfa Fetoproteína (AFP) ELISA se utiliza para la determinación cuantitativa de la (AFP) en suero humano.

RESUMEN Y APLICACIÓN

La Alfa Fetoproteína (AFP) es una glicoproteína con un peso molecular aproximado de 70.000 Daltons. La AFP es producida normalmente durante el desarrollo fetal y neonatal por el hígado, por el saco gestacional y, en menor medida, por el tracto gastrointestinal. Luego del nacimiento la concentración de AFP decrece rápidamente y, a partir del segundo año de vida, solo pequeñas trazas de AFP son detectables en suero. Concentraciones elevadas de AFP en suero generalmente ocurren en diversas enfermedades malignas tales como Cáncer Testicular no Seminoma y Carcinoma Hepatocelular Primario. En el caso del Cáncer Testicular, ha sido observada una relación directa entre la incidencia de valores elevados de AFP y el estado de la enfermedad. Niveles elevados de AFP han sido observados en pacientes diagnosticados con Seminoma y no Seminoma, aunque no en pacientes con Seminoma puro. Además, altos niveles de AFP en suero han sido medidos en pacientes con enfermedades no cancerosas tales como Ataxia-Telangiectasia, Tirosinemia Hereditaria, Ictericia Neonatal, Hepatitis Viral Aguda, Hepatitis Crónica Activa y Cirrosis. Se han observado elevados niveles de AFP en mujeres embarazadas. Por lo tanto, no se recomiendan las mediciones de AFP para su uso como procedimiento de detección de cáncer en la población general.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

El kit AFP es un método ELISA en fase sólida basado en la técnica de sándwich directo. Las muestras y el conjugado enzimático Anti-AFP diluido son agregados a los micropozos recubiertos con anticuerpo monoclonal a la subunidad Beta. La AFP presente en la muestra del paciente se une al anticuerpo monoclonal Anti-AFP en el micropozo, luego el segundo anticuerpo anti-AFP se une al AFP. La proteína y el conjugado enzimático HRP no unidos son lavados por la Solución de Lavado. Con la adición del sustrato, la intensidad del color es proporcional a la concentración de AFP en las muestras. Se genera una curva estándar relacionando la intensidad del color y la concentración de AFP.

MATERIALES PROVISTOS	96 Pruebas
1. Micropozos recubiertos estreptavidina	12x8x1
2. Estándares de AFP: 6 viales (listos para su uso)	0.5 ml
3. Conjugado Enzimático anti-AFP: 1 frasco (listo para su uso)	12 ml
4. Solución anti-AFP-biotina: 1 bote	12 ml
5. Sustrato TMB: 1 frasco (listo para su uso)	12 ml
6. Solución de Frenado: 1 frasco (listo para su uso)	12 ml
7. Solución de Lavado Concentrado 20X: 1 frasco	25 ml

MATERIALES REQUERIDOS PERO NO PROVISTOS

1. Agua destilada o desionizada.
2. Pipetas de precisión.
3. Puntas de pipetas desechables.
4. Lector Microelisas con lente a 450 nm de longitud de onda con una banda de amplitud de 10nm o menor y un rango de densidad óptica de 0-2 OD o mayor
5. Papel absorbente o toalla de papel.
6. Papel cuadrículado.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. Potencial de los materiales de riesgo biológico: Los calibradores contienen componentes de origen humano, que se han sido probados y encontrados no reactivos para el antígeno de superficie de hepatitis B y anticuerpos contra el VIH Aprobado por la FDA. Sin embargo no hay método de prueba que puede ofrecer completa seguridad de que el virus VIH, Hepatitis B u otros agentes infecciosos estén presentes. Estos reactivos deben ser manejados según el Nivel de Bioseguridad 2, como se recomienda en los Centros para el Control de Enfermedades / Institutos Nacionales de Salud manuales. "Bioseguridad en laboratorios microbiológicos y biomédicos" 1984.
2. No pipetee con la boca. No fume, coma, o beba en el área donde maneje este equipo.
3. Los componentes en este equipo son para uso como una unidad integral. Los componentes de diferentes lotes no se deben mezclar.
4. Es recomendable que los estándares, controles y muestras de suero se corran por duplicado
5. Para obtener óptimos resultados, debe apegarse estrictamente al protocolo. Pipeteado exacto y preciso, así como después de la hora exacta y requerimientos de temperatura prescritos son esenciales. Cualquier desviación de este pueden dar datos no válidos.

RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA

1. Recolectar la sangre por venopunción y separar el suero de inmediato.
2. En caso de no llevar a cabo el examen inmediatamente, refrigerar la muestra a (2-8°C) por cinco días. En caso de exceder dicho plazo, congelar a -20°C hasta un mes.
3. Evitar múltiples ciclos de congelación - descongelación.
4. Previo al ensayo, la muestra deberá ser debidamente descongelada y mezclada.
5. Evitar utilizar muestras con exceso de lípidos.

PREPARACIÓN DEL REACTIVO

Solución de Lavado: Preparar una solución de lavado a 1X, adicionando el contenido de la botella (25 ml, 20 X) a 475 ml de agua destilada o des ionizada. Conservar a temperatura ambiente (18-23°C).

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

Previo al ensayo, todas las muestras y reactivos deben ser llevados a temperatura ambiente (18-23°C). Mezclar gentilmente todos los reactivos previos a su uso.

1. Corte el número de pozos a utilizar. Cierre y selle el resto de los pozos no utilizados y refrigérelos a 2-8°C.
2. Dispensar 25 µl de estándares, muestras y controles en los micropozos designados.
3. Agregar 100 µl de anti-AFP-biotina en cada pozo y mezclar por 20-30 segundos.
4. Cubrir e incubar a temperatura ambiente (18-23°C) por 30 minutos.
5. Remover el líquido de los pozos. Lavar en tres tiempos con 300 µl de solución de lavado a 1x. Golpear los pozos sobre una toalla o papel absorbente.
6. Agregar 100 µl de Conjugado enzimático a todos los micropozos. Cubrir e incubar por 30 minutos
7. Remover el líquido de todos los pozos y repetir el paso número 5.
8. Agregar 100 µl de sustrato TMB en cada pozo.
9. Incubar a temperatura ambiente (18-26°C) por 15 minutos.
10. Frenar la reacción agregando 50 µl de Solución de Frenado a cada pozo. Agitar gentilmente por 15-20 segundos para facilitar el mezclado.
11. Leer la densidad óptica a 450 nm con un lector de placa de micro valoración en un plazo de 15 minutos después de haber agregado la solución de frenado.

ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

1. Almacene el kit a 2 - 8°C.
2. Mantenga las tiras de los pocillos selladas en la bolsa de aluminio.
3. Todos los compuestos son estables hasta su fecha de expiración siempre y cuando las condiciones de almacenaje sean estrictamente llevadas a cabo como aquí se indica.
4. No exponga los reactivos al calor, luz solar o intensa luz eléctrica.

CÁLCULO DE RESULTADOS

La curva estándar se construye de la siguiente manera:

1. Calcular el valor de AFP estándar en cada vial estándar. Este valor puede variar de lote a lote. Asegúrese de chequear los valores en cada kit. Tomar el ejemplo de estándar adjunto como referencia.
2. Para la construcción de la curva trazar la lectura de absorbancia de los estándares AFP en eje vertical contra su concentración de AFP estándar en eje horizontal en papel grafico lineal, dibujar la curva de mejor manera posible uniendo los puntos.
3. Leer la concentración (ng/ml) para los controles y para cada muestra desconocida de la curva. Registrar el valor de cada control o muestra desconocida.

Ejemplo de curva estándar

	OD 450 nm	Conc. ng/ml
Std 1	0.020	0
Std 2	0.072	5
Std 3	0.282	25
Std 4	0.462	50
Std 5	1.878	250
Std 6	2.447	500

VALORES ESPERADOS Y SENSIBILIDAD

Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios rangos normales sobre la base de una muestra representativa de la población local. Sin embargo en base a estudios publicados sobre adultos aparentemente sanos se obtuvieron los siguientes resultados de AFP. El rango normal de AFP en individuos sanos es de menos de 20 mg/L.

LIMITACIONES DE LA PRUEBA

1. Los resultados obtenidos por medio presente test solo deben ser utilizados como ayuda en el diagnóstico y deben ser interpretados en relación a la historia clínica del paciente, pruebas físicas y otros procesos de diagnóstico.
2. No utilice acido de sodio como preservante ya que inhibe la actividad de la enzima HRP.

PERFORMANCE

1. Correlación con un kit ELISA de referencia:

Un total de 125 muestras de suero fueron analizadas utilizando el presente kit ELISA y otro kit de referencia. Los resultados se resumen en la siguiente tabla:

Correlación	Pendiente	Intercepción
0.9	1.2	- 15.6

2. Precisión:

Estudio Intra Ensayo

Suero	No. de Réplicas	Media mIU/ml	Desvío Estandar	Coefficiente de Variación (%)
1	16	204	11	5.39
2	16	142	9	6.33
3	16	20	1.5	7.50

2. Precisión:

Estudio Intra Ensayo

Suero	No. de Réplicas	Media mIU/ml	Desvío Estandar	Coefficiente de Variación (%)
1	16	204	11	5.39
2	16	142	9	6.33
3	16	20	1.5	7.50

3. Sensibilidad:

La sensibilidad fue determinada al calcular la media más 2 desvíos estándar del cero estándar testeados 20 veces en la misma prueba:

Suero	No. de Replicas	Media ng/ml	Desvío Estandar	Media + 2SD (Sensibilidad)
Cero Estandar	20	0.098	0.125	0.348 ng/ml

4. Recuperación:

Cantidades controladas de AFP fueron agregadas a un suero con baja concentración de AFP.

Valor Esperado	Recuperado	Porcentaje de Recupero
247	242	98
75	78	104
27	24	88

5. Linealidad:

Tres muestras diferentes fueron diluidas con el calibrador "0" a 1:2, 1:4, 1:8. Fueron calculados los valores de AFP y los resultados corregidos con el factor de dilución.

Valor Original		Porcentaje de Recupero		
Suero	(ng/ml)	1:2	1:4	1:8
1	33	93	97	102
2	110	102	107	98
3	244	110	98	94

REFERENCIAS

1. Bates SE. Clinical applications of serum tumor markers. Ann Intern Med 1991; 115:623-8.
2. Wu JC, Lee SD, Hsiao KJ, et al. Mass screening of primary hepatocellular carcinoma by alpha-fetoprotein in a rural area of Taiwan-a dried blood spot method. Liver 1988; 8:100-4.
3. Lee H-S, Chung YH, Kim CY. Specificities of serum alpha-fetoprotein in HBSAg+ and HBSAg- patients in the diagnosis of hepatocellular carcinoma. Hepatology 1991; 14:68-72.
4. Di Bisceglie AM, Rustgi VK, Hoofnagle JH, Dusheiko GM, Lotze MT. Hepatocellular carcinoma. Ann Intern Med 1988; 108:390-401.
5. Sato Y, Nakata K, Kato Y, et al. Early recognition of hepatocellular carcinoma based on altered profiles of alpha-fetoprotein. N Engl J Med 1993;328:1802
6. Deutch HF. Chemistry and biology of alpha-fetoprotein. Adv Cancer Res 1991;56:253-312