

INTENCIÓN DE USO

El equipo AFP CLIA se destina para la determinación cuantitativa de concentración de AFP en suero humano.

RESUMEN Y APLICACIÓN

La alfa-feto proteína (AFP) es una glicoproteína con un peso molecular de aproximadamente 70.000 Daltons. La AFP es producida principalmente por el saco vitelino fetal y el hígado del feto y en menor medida por el tracto gastrointestinal. La elevación de suero de AFP a los valores anormalmente altos se produce en varias enfermedades malignas, sobre todo cáncer testicular no seminomatoso y el carcinoma hepatocelular primario.

Aproximadamente el 70% de pacientes con carcinoma hepatocelular primario muestran niveles elevados de AFP. En el caso de los testículos teratoma, una relación directa se ha observado entre la incidencia de niveles elevados de AFP y la etapa de disease3. No hay aumento de los niveles de AFP se encuentran en los testículos seminomas. La aplicación de las AFP medida a la gestión de pacientes con carcinoma no ha sido bien documentada. Además, la elevación de las concentraciones séricas de AFP se ha medido en pacientes con otras enfermedades no cancerosas, como la ataxia telangiectasia tirosinemia hereditaria y, neonatal hiperbilirrubinemia, hepatitis viral aguda, hepatitis crónica activa y cirrosis. Niveles elevados de AFP sérica también son observados en mujeres embarazadas. Debido a esto las mediciones de AFP no son recomendados para proceso de la detección de cáncer en la población en general.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

Este ensayo está basado en el método de tipo sándwich de un paso. La muestra, los micropozos marcados con Anti-AFP y la enzima conjugada con Anti-AFP son combinados. Durante la incubación, el AFP presente en la muestra se lleva a reacción simultáneamente con los dos anticuerpos, resultando en que la AFP queda emparejada entre la fase sólida y la enzima ligada a anticuerpos. Después de los lavados, un complejo es generado entre la fase sólida, la AFP de la muestra y la enzima ligada a anticuerpos por reacciones inmunológicas. El sustrato A y el sustrato B son entonces agregados y catalizados por este complejo. La reacción quimioluminiscente resultante es medida como RLU's. Los RLU's son proporcionales a la cantidad de AFP en la muestra.

MATERIALES SUMINISTRADOS

1. 96 Micropozos recubiertos con Anti- AFP
2. Enzima Conjugada: 12 ml
3. Estándares de Referencia: 10, 20, 50, 100, 250 y 500 ng/ml AFP (6 viales, liofilizados)
4. CLIA Sustrato A: 6.0 ml
5. CLIA Sustrato B: 6.0 ml
6. Control 1: Liofilizado
7. Control 2: Liofilizado
8. PBS-T en Polvo (buffer de Lavado ,2 bolsas 5 gr.)

MATERIALES REQUERIDOS PERO NO SUMINISTRADOS

1. Agua destilada.
2. Pipetas de precisión 20 µl-200 µl, 100 µl-1000 µl (se recomienda el uso de puntillas desechables)
3. Luminómetro.
4. Mezclador Vórtex o Equivalente.
5. Lavador de Micropozos.
6. Papel absorbente o una toalla de papel.
7. Sueros para el control de calidad.
8. Incubadora.

ALMACENAMIENTO DE EQUIPO E INSTRUMENTACIÓN

1. El Equipo de prueba sin abrir deben almacenarse a 2-8°C a la recepción. El equipo se puede utilizar a lo largo de la fecha de caducidad del kit (12 meses a partir de la fecha de fabricación).
2. Estándares reconstituidos deben ser usados dentro de 14 días y congelarse a -20°C para el largo plazo de almacenamiento. Evitar la congelación y descongelación repetida. Los micropozos, deben mantenerse en una bolsa sellada con desecantes para minimizar la exposición a la humedad del aire. Otros componentes abiertos se mantendrán estables durante al menos 2 meses, siempre que se almacenen en forma descrita anteriormente.

RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

1. El suero es el tipo de muestra recomendado para este ensayo. Las muestras de plasma con EDTA, heparina u oxalato pueden interferir con los procedimientos de prueba y debe ser evitado.
2. Recoger todas las muestras de sangre y observar las precauciones universales para la venopunción.
3. Permita que la muestra se coagule antes de la centrifugación.
4. Evite muestras excesivamente hemolíticas, lipémicas o turbias.
5. Las muestras pueden almacenadas hasta 48 horas de 2 – 8°C. Durante más tiempo de almacenamiento congelar a -20°C. Las muestras descongeladas deben mezclarse antes de la prueba.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. Para uso diagnóstico in vitro.
2. Manejo de reactivos, las muestras de suero deben estar de acuerdo con los procedimientos de seguridad local.
3. Los estándares contienen componentes de origen humano, se han probado y no reaccionaron para el antígeno de superficie de hepatitis B, así como anticuerpos contra el VIH. Todos los productos de origen animal y derivados han sido recogidos de animales sanos. Componentes de la especie bovina originarios de países en los que la EEB no ha sido reportada. Sin embargo, estándares y los componentes que contienen sustancias animales deben ser tratados como potencialmente infecciosos.
4. Evitar cualquier contacto de los reactivos con la piel.
5. No fumar, comer, beber o aplicar cosméticos en la zona de trabajo. No pipetear con la boca. Uso de ropa protectora y guantes desechables.

PREPARACIÓN DEL REACTIVO

1. Todos los reactivos deben estar a temperatura ambiente (18-25°C) antes de su uso.
2. Reconstituir cada estándar con 1 ml de agua destilada. Deje el material reconstituido en reposo durante al menos 10 minutos. Los estándares reconstituidos deben ser almacenados 2 ~ 8 °C.
3. Reconstituir cada control con 1 ml de agua destilada y mezclar bien con vórtex durante 1 minuto. Permita que el material reconstituido repose durante al menos 10 minutos.
4. Para preparar Buffer de Lavado: añadir una bolsa de PBS-T en Polvo a 500 ml de agua destilada y mezclar. El buffer de lavado es estable a temperatura ambiente durante dos meses.
5. Determinar la cantidad que de la solución de sustrato necesario y preparar mezclando volúmenes iguales de sustrato A y B en un recipiente limpio. Por ejemplo, añadir 1 ml de sustrato A y 1 ml de sustrato B por 2 tiras de ocho pocillos (quedará un ligero exceso de material preparado). Deseche la porción no utilizada si no se utiliza dentro de 20 minutos después de la mezcla.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

1. Asegure el número deseado de pozos cubiertos en el soporte.
2. Dispense 20 µl de los estándares de AFP, las muestras y los controles en los pozos apropiados.
3. Dispense 100 µl del reactivo de enzima conjugada en cada pocillo.
4. Mezclar bien durante 30 segundos. Es importante tener una mezcla completa en este paso.
5. Se incuba a 37°C durante 60 minutos.
6. Retire la mezcla de incubación vaciando el contenido de la placa en un recipiente de residuos. Enjuague los pocillos 5 veces con agua destilada. Golpee los pozos energícamente sobre papel absorbente para eliminar las gotas de agua residual. El volumen del micropozo es de 300 µl.
7. Dispense 50 µl del sustrato A, y 50 µl de sustrato B en cada pocillo. Mezclar suavemente durante 10 segundos.
8. Ponga la microplaca en la cámara de detección de Luminómetro durante 5 minutos, a continuación, lea el RLU con un Luminómetro.

NOTAS IMPORTANTES

1. No utilizar los reactivos después de la fecha de caducidad
2. No mezclar o usar componentes con diferentes lotes.
3. Se recomienda que no se monten más de 32 micropozos en cada ensayo, si el pipeteado es manual, ya que todas los estándares, muestras y controles deben ser completados dentro de 5 minutos. Un plato de 96 pozos puede ser utilizado si la pipeta es automática.
4. Vuelva a colocar las tapas de los reactivos inmediatamente.
5. El procedimiento de lavado es crítico. Un lavado insuficiente producirá una mala precisión y resultados inválidos.

CÁLCULO DE RESULTADOS

1. Calcule el valor medio de los reactivos duplicado. En su caso, los valores medios se deben utilizar para el trazado.
2. El gráfico logarítmico papel cuadrículado el log10RLU (ordenadas) obtenidos a partir de cada estándar de referencia contra el logaritmo decimal de la concentración correspondiente de la AFP en ng / ml (eje de abscisas) y dibujar una curva de calibración a través de los puntos de referencia estándar mediante la conexión del trazado puntos con una línea curva.
3. Lea la concentración de cada control y la muestra por interpolación en la curva de calibración.
4. El uso de la computadora simplifica estos cálculos. Si el proceso de resultado automático se utiliza, una logística de regresión lineal de función de ajuste de la curva se recomienda.
5. Cualquier muestra diluida deben ser corregidos por el factor de dilución.

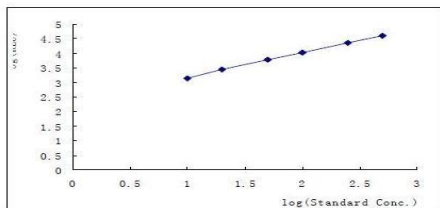
VALORES DE REFERENCIA

Cada laboratorio debe establecer su propio rango normal. La siguiente información se da sólo para orientación. Aproximadamente el 97-98% de la población sana normal tiene los niveles de AFP menos de 20 ng/ml. Pacientes en alto riesgo, valores de AFP entre 100 y 400 ng/ml sugieren carcinoma hepatocelular. Concentraciones de más de 400 ng/ml generalmente son indicio de la enfermedad.

EJEMPLO DE CURVA ESTÁNDAR

Una curva típica estándar se muestra a continuación es para fines de ilustración solamente, y nunca debe ser en lugar de la curva de calibración de la hora real.

AFP (ng/ml)	RLU
10	1403.30
20	2700.12
50	6198.76
100	10477.90
250	23136.30
500	40394.90



PERFORMANCE

1. Sensibilidad:

El límite de detección se calcula a partir de la curva estándar mediante la identificación de la concentración correspondiente a la media de RLU diluyente estándar (basado en 10 análisis repetidos), además de SD 2. Por lo tanto, la sensibilidad de AFP CLIA kit es menor que 2.5 ng/ml.

2. Especificidad:

Lo se detectó interferencia con el desempeño AFP CLIA con la adición de grandes cantidades de las sustancias siguientes a un pool de suero humano.

3. Precisión:

Intra-ensayo de precisión Intra-ensayo de precisión se determinó analizando 20 repeticiones de cada uno de los sueros de control.

Suero	Número	Media	SD	CV (%)
Titulo bajo	20	26.93	1.83	6.80
Titulo alto	20	193.02	8.88	4.60

Inter-ensayo de precisión se determinó analizando duplicados de cada uno de los sueros de control en 10 carreras por separado.

Suero	Número	Media	SD	CV (%)
Titulo bajo	10	31.08	2.24	7.21
Titulo alto	10	186.22	9.16	4.92

4. Altas de dosis:

Efecto gancho.

No hay efecto gancho, esto ocurrió con la concentración de AFP hasta 10000 ng/ml. Sin embargo, desde pacientes con enfermedad avanzada de carcinoma hepatocelular pueden mostrar niveles extremadamente altos, falsos resultados bajos debido a un efecto gancho de altas dosis pueden ser vistos en muestras de estos pacientes.

LIMITACIONES

1. Resultados confiables y reproducibles serán obtenidos cuando el procedimiento de ensayo se lleva a cabo con una comprensión completa del prospecto y con el cumplimiento de laboratorio la práctica.
2. Anticuerpos heterófilos en el suero humano pueden reaccionar con el reactivo de inmunoglobulinas, lo que interfiere con ensayos de inmunidad in vitro. Los pacientes expuestos rutinariamente a los animales o productos de origen animal pueden ser propensos a esta interferencia por lo tanto los valores anómalos pueden ser observados. Información adicional puede ser necesaria para el diagnóstico.
2. Muestras de suero con lipemia, hemólisis o turbidez no debe ser utilizado con esta prueba.
3. Para el diagnóstico, los resultados obtenidos con esta prueba se debe utilizar siempre en conjunto con el examen clínico, la historia médica del paciente, y otros hallazgos.

CONTROL DE CALIDAD

Buenas prácticas de laboratorio requiere que las muestras de control de calidad deben procesarse con cada curva de calibración para verificar el rendimiento del ensayo. Para asegurar el funcionamiento adecuado, un número estadísticamente significativo de los controles deben ser analizados para establecer los valores medios y rangos aceptables. Controles que contengan ácido de sodio no debe ser utilizado.

REFERENCIAS

1. Mackiewicz, A., Breborowicz, I, la producción in vitro de variantes de alfa-fetoproteína en humanos los órganos fetales. *Oncodev. Biol. Medicina* 1:251, 1980.
2. Waldmann, TA, McIntire, KR, el uso de un radioinmunoanálisis-ensayo de alfa-fetoproteína en el diagnóstico de malignidad. *Cáncer* 34:1510, 1974.
3. Masseyeff, RF, alfa-fetoproteína: El uso en el cribado. En el inmunodiagnóstico de Cáncer. Herberman, RB, y McIntire, RK, (Eds) Marcell Dekker Inc. de Nueva York p117-129, 1979.
4. Scardino, RT, Cox, HD, Waldmann, los conocimientos tradicionales, McIntire, KP, Mittemeyer, B., Javadpour, N., Elvalor de los marcadores tumorales séricos en la clasificación y el pronóstico de los tumores de células germinales de los testículos. *J. Urol.* 118:994, 1977.
5. Lange, PH, McIntire, KR, Waldmann, TA, Hakala, TR, Fraley, EE, concentración de alfa-fetoproteína y gonadotropina coriónica humana en el diagnóstico y tratamiento de los no seminomatosos células germinales de cáncer de testículo. *New Engl. J. Med.* 295:1237, 1976.