



ES

# EIA CanAg AFP

REF

600-10

IVD

CE

Instrucciones de uso. 2010-04

|    |                             |
|----|-----------------------------|
| EN | EXPLANATION OF SYMBOLS      |
| BG | ОБЯСНЕНИЕ НА СИМВОЛИТЕ      |
| CS | VÝZNAM SYMBOLŮ              |
| DA | SYMBOLFORKLARING            |
| DE | ERKLÄRUNG DER SYMBOLE       |
| EL | ΕΠΕΞΗΓΗΣΗ ΤΩΝ ΣΥΜΒΟΛΩΝ      |
| ES | SIGNIFICADO DE LOS SÍMBOLOS |
| ET | SÜMBOLITE SELGITUS          |
| FR | EXPLICATION DES SYMBOLES    |
| HR | OBJAŠNJENJE SIMBOLA         |
| HU | JELMAGYARÁZAT               |
| IT | SPIEGAZIONE DEI SIMBOLI     |
| LT | SIMBOLIŲ PAAIŠKINIMAI       |
| LV | SIMBOLU SKAIDROJUMS         |
| NL | VERKLARING DER SYMBOLEN     |
| NO | SYMBOLFORKLARING            |
| PL | OBJAŚNIENIE SYMBOLI         |
| PT | EXPLICAÇÃO DOS SÍMBOLOS     |
| RO | SEMNIȚAȚIA SIMBOLURILOR     |
| RU | ОБОЗНАЧЕНИЯ                 |
| SE | SYMBOLFÖRKLARING            |
| SK | VÝZNAM SYMBOLOV             |
| SL | RAZLAGA SIMBOLOV            |
| SR | OBJAŠNJENJE SIMBOLA         |
| TR | SEMBOLLERİN AÇIKLAMALARI    |



Use By/Годно до/Použitelné do/  
Holdbar til/Verwendbar bis/  
Ημερομηνία λήξης/Fecha  
de caducidad/Kölblik kuni/  
Utiliser jusque/Rok valjanosti/  
Felhasználható/Utilizzare entro/  
Sunautoti iki/Izlietot līdz/Houdbaar  
tot/Brukes innen/Użyç przed/  
Prazo de validade/Expirã la/  
Использовать до/Använd före/  
Použite né do/ Uporabno do/  
Upotrebljivo do/Son Kullanna Tarihi

LOT

Batch code/Номер на партида/  
Číslo šarže/Lotnummer/  
Chargenbezeichnung/Αριθμός  
Παρτίδας/Código de lote/Partii  
kood/Code du lot/Kod serije/  
Sarzsám/Codice del lotto/  
Partijos kodus/Partijas kods/Lot  
nummer/Partikode/Kod partii/  
Código do lote/Număr de lot/  
Номер лота/Lotnummer/Číslo  
šarže/Številka serije/Kod partije/  
Parti Kodu



Date of manufacture/Дата на производство/Datum výroby/  
Produktionsdato/Herstellungsdatum/  
Ημερομηνία παραγωγής/Fecha de fabricación/Valmistamise kuupäev/  
Date de fabrication/Datum proizvodnje/  
Gyártási idő/Data di produzione/  
Pagaminimo data/Ražošanas datums/  
Productiedatum/Fremstillingsdato/  
Data produkcji/Data de fabrico/Data fabricației/Дата производства/  
Tillverkningsdatum/Dátum výroby/Datum izdelave/Datum proizvodnje/Üretim tarihi



Temperature limitation/  
Температурни граници/  
Терлотни омеzeи/  
Temperaturbegrænsning/  
Temperaturbegrenzung/  
Περιορισμοί θερμοκρασίας/  
Limites de temperatura/  
Temperatuuri piirang/  
Limite de température/  
Temperaturno ograničenje/  
Hőmérsékletre vonatkozó korlátozás/  
Limiti di temperatura/  
Temperatūriniai apribojimai/  
Temperatūras ierobežojums/  
Temperaturbepæring/  
Temperaturbegrensninger/  
Temperaturey granične/  
Limite de temperatură/  
Температурный режим/  
Temperaturbegrænsning/  
Teplotné obmedzenie  
Omejitve temperature/  
Temperaturno ograničenje/  
Sıcaklık sınırlaması/

## IVD

In Vitro Diagnostic Medical Device/  
Медицински уред за диагностика  
ин витро/Лéкаřský přístroj pro diagnostiku in vitro/Medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik/In-vitro-Diagnostikum/  
Ιατροτεχνολογικό προϊόν για διάγνωση  
In Vitro/Dispositivo médico para diagnóstico in vitro/In vitro diagnostiline meditsiineasead/Dispositif médical de diagnostic in vitro/Diagnostički medicinski uređaj In Vitro/In vitro orvosdiagnostikai eszköz/Dispositivo medico per test diagnostici in vitro/In Vitro Diagnostinė Medicinos Priemonė/  
Medicinska ierīce in vitro diagnostikai/  
In vitro-diagnostisch medisch instrument/  
In vitro diagnostisk medisinsk utstyr/  
Wyrób medyczny do diagnostyki in vitro/  
Dispositivo Médico de Diagnóstico In Vitro/Dispozitiv medical pentru diagnostic in vitro/Только для диагностики In Vitro/Endast för in vitro-diagnostik/  
Zdravotnička pomôcka na diagnostiku in vitro/In vitro diagnostični pripomoček/  
Diagnostički medicinski uređaj In Vitro/<96> testleri için yeterlilik içerir



Contains sufficient for <96> tests/Съдържа достатъчно количество за тестове <96>/Lze použít pro <96> testů/Ineholder tilstrækkeligt/Inhalt ausreichend für <96> Prüfungen/Πεξεχόμενο επαρκές για «96» εξετάσεις/Contenido suficiente para <96> ensayos/Kogusest piisab <96> testi läbiviimiseks/Contenu suffisant pour «96» tests/Sadržaj dovoljno za <96> testova/A doboz tartalma <96> vizsgálat elvégzéséhez elegendő/Contenuto sufficiente per «96» saggi/Turiny's skirtas atlikti <96> tyrimus/Saturs pietiekams <96> testiem/Inhoud voldoende voor «96» testen/til «96» test/ Tilstrækkelig innhold for <96> prøver/  
Wystarczy na wykonanie <96> testów/  
Conteúdo suficiente para «96» ensaios/  
Conținut suficient pentru 96 de teste/  
Содержит достаточные количества для «96» определений/Innehåller tillräckligt till «96» antal tester/Obsah postačuje na tento počet testov: <96>/Vsebina zadostuje za <96> testov/Sadržina dovoljna za <96> testova/<96> testleri için yeterlilik içerir

## REF

Catalogue number/Каталожен номер/  
Katalogové číslo/Katalognummer/  
Bestellnummer/Αριθμός καταλόγου/  
Número de catálogo/Katalogoi number/  
Numéro de catalogue/Kataloški broj/  
Katalógusszám/Numero di catalogo/  
Katalogo numeris/Numurs katalogā/  
Catalogusnummer/Katalognummer/  
Numer katalogowy/Número do catálogo/  
Număr de catalog/Номер по каталогу/  
Produktnummer/Katalógové číslo/  
Kataloška številka/Kataloški broj/  
Katalog numarası



Consult Instructions for Use/  
Прочетете инструкцията за  
употреба/Konzultujte s návodem  
k použití/Se brugsanvisning/Siehe  
Gebrauchsanweisung/Συμβουλευτείτε  
της Οδηγίες σχετικά με τη χρήση/  
Consulte las instrucciones de uso/  
Vt kasutusjuhendit/Consulter le mode  
d'emploi/Pročítajte upute za uporabu/  
Olvassa el a használati utasítást/  
Consultare le istruzioni per l'uso/Dél  
naudojimo žiūrėkite instrukcijas/Izlasiet  
lietošanas instrukciju/Raadpleeg de  
instructies voor gebruik/Les instruksene  
for bruk/Sprawdzić w instrukcji użycia/  
Consulte as Instruções de Utilização/  
Consultați instrucțiunile de utilizare/  
Обратитесь к инструкции по  
применению/Se bruksanvisning/  
Prečítajte si návod na používanie/  
Pročitajte uputstvo za upotrebu/  
Kullanım Talimatlarını Bakınız



Contents of kit/Съдържание на набора/  
Obsah sady/Kittets inhold/Inhalt des  
Kits/Περιεχόμενα του κιτ/Contenido  
del kit/Komplekt sisaldab/Contenu du  
kit/Sadržaj opreme/A készlet tartalma/  
Contenuto del kit/Rinkinio turinys/  
Komplekta saturs/Inhoud van de set/  
Settets innhold/Zawartość zestawu/  
Conteúdo do kit/Conținutul setului/  
Компоненты набора/Kit innehåll/  
Obsah súpravy/Vsebina kompleta/Sadržaj  
opreme/Kitin içindekiler



Biological risks/Биологическа  
опасност/Biológická rizika/Biologisk  
fare/Biologische Gefahren/Βιολογικοί  
κίνδυνοι/Riesgos biológicos/  
Bioloogilised ohud/Risques biologiques/  
Biolóškli rizici/Biológiai kockázatok/Rischi  
biologici/Biologinis pavojus/Biológiškais  
risks/Biologische risico's/Biologische  
risikoer/Zagroženie biologiczne/Riscos  
biológicos/ Biologisk risk/Pericole  
biologice/Биологическая опасность/  
Biologický rizikové/Biologické riziká/  
Biolóškli rizici/Biyolojik riskler



Human/C човешки производ/Lidské/  
Human/Human/ἄνθρωπος αναφοράς/  
Humano/Inimāritolu/Humaine/Ljudskog  
porjekla/Humán/Origine Umana/  
Žmogaus kilmės/Cilvēku izcelsmes/  
Human/Menneske/Ludzka/Humano/  
Origine umână/Человеческого  
происхождения/Human/Ludské/  
Humanega izvora/Ljudskog porekla/İnsan



From mouse/C миши производ/Myši/  
Fra mus/der Maus/από ποντίκι/de ratón/  
Hiirtelt/De souris/Mišijeg porjekla/  
Egérbdli/Murino/Pelės kilmės/No peles/  
Van muizen/Fra mus/Mysia/Do rato/De  
la șoareci/Мышиного происхождения/  
Från mus/Myšije/Mišijega izvora/Mišijeg  
porekla/Fareden



Bovine/C говежди производ/  
Hovēži/Bovin/Rind/από βοοειδή/  
Bovino/Veistelt/Bovine/Rogate stoke/  
Szarvasmarha/Bovina/Jaučio/No  
liellopa/Bovien/Bovini/Wolowy/Bovino/  
Origine bovină/крупного рогатого  
скота/Från ko/Hovädzie/Rogovega  
izvora/Rogate krupne stoke/Bovin



Reconstitute with/Разтваряне с/  
Rozfeďte pomoci/Rekonstitueres med/  
Rekonstituieren mit/Ανασύσταση με/  
Reconstituir con/Lahjendamine/  
Rekonstituer avec/Rekonstituiraite s/  
Feloldáshoz/Ricostituire con/Atkurti,  
ištirpdant su/Atšķaidīt ar/Rekonstituie  
met/Rekonstitueres med/Odtworzyć  
za pomocą/Reconstituir com/A  
se reconstitui cu/Разтворить в/  
Rekonstituera med/Rozriedte pomocou/  
Rekonstituiraite z/s/Ponovno formiranje  
sa/Yeniden oluşturulur



Manufacturer/Производитель/Výrobce/  
Producent/Hersteller/Κασκευαστής/  
Fabricante/Tootja/Fabricant/Proizvođač/  
Gyártó/Fabbricante/Gamintojas/  
Ražotājs/Fabrikant/Produsent/  
Producent/Fabricante/Producător/  
Производитель/Tilverkare/ Výrobca/  
Izdelovalec/Proizvođač/Üretici

# CanAg AFP EIA

Instrucciones de uso

Kit de ensayo inmunométrico enzimático  
Para 96 determinaciones

## USO PREVISTO

El kit CanAg AFP EIA está destinado a la determinación cuantitativa de  $\alpha$ -fetoproteína (AFP) en suero humano.

## RESUMEN Y EXPLICACIÓN DEL ENSAYO

$\alpha$ -fetoproteína (AFP), el equivalente fetal de la albúmina, es una glucoproteína de 67 kDa producida durante el desarrollo embrionario y que se encuentra en concentraciones elevadas en el suero fetal y el líquido amniótico. En adultos normales que no sean mujeres embarazadas, la AFP se encuentra en concentraciones bajas en el suero. Sin embargo, la AFP puede estar notablemente elevada en el suero de pacientes con cáncer del hígado, testículo u ovario. La determinación cuantitativa de la AFP en el suero podría ser valiosa en el manejo de pacientes con sospecha o diagnóstico de cáncer hepático o tumores de células germinales del testículo o el ovario (1, 2).

## PRINCIPIO DE LA PRUEBA

El EIA CanAg AFP es un inmunoensayo en fase sólida, no competitivo, basado en la técnica de sándwich directa. Los calibradores, los controles y las muestras del paciente se incuban junto con el anticuerpo monoclonal anti-AFP biotinilado y el anticuerpo monoclonal anti-AFP marcado con peroxidasa de rábano (HRP) en microtiras revestidas con estreptavidina. Después del lavado, se añade reactivo tamponado sustrato/cromógeno (peróxido de hidrógeno y 3,3', 5,5' -tetrametilbenzidina) a cada pocillo y se deja que se produzca la reacción enzimática. Si hay antígeno, durante la reacción enzimática se desarrollará un color azul. La intensidad del color es proporcional a la cantidad de AFP presente en las muestras.

Dicha intensidad se determina en un espectrofotómetro de microplacas a 620 nm (o bien a 405 nm tras la adición de solución de parada). Se construyen curvas de calibración para cada ensayo representando el valor de absorbancia frente a la concentración de cada calibrador. Finalmente, se leen las concentraciones de AFP de las muestras de los pacientes a partir de la curva de calibración.

## REACTIVOS

- Cada kit EIA CanAg AFP contiene reactivos para 96 determinaciones.
- La fecha de caducidad del kit viene indicada en la etiqueta de la parte externa de la caja.
- No use el kit después de la fecha de caducidad.
- No mezcle reactivos de diferentes lotes de kits.
- Conserve el kit a una temperatura de 2 °C a 8 °C. No lo congele.
- La estabilidad de los reactivos abiertos se resume en la tabla siguiente, siempre que no estén contaminados, que se conserven en los recipientes originales nuevamente cerrados y que se manipulen como se indica. Vuelva a dejarlos a una temperatura de 2 °C a 8 °C inmediatamente después de su uso.

| Componente | Cantidad | Conservación y estabilidad después de la primera apertura |
|------------|----------|---|
|------------|----------|---|

### MICROPLA

|                   |         |  |
|-------------------|---------|--|
| <b>Microplaca</b> | 1 placa | 2–8 °C hasta la fecha de caducidad<br>caducidad indicada en la placa |
|-------------------|---------|--|

12 x 8 pocillos recubiertos con estreptavidina. Después de abrir el envase, devuelva inmediatamente las tiras no utilizadas a la bolsa de aluminio con desecante. Vuelva a cerrarla cuidadosamente para mantenerlas secas.

|                            |          |  |
|----------------------------|----------|--|
| <b>Calibradores de AFP</b> | 6 viales | 2–8 °C hasta la fecha de caducidad<br>indicada en los viales |
|----------------------------|----------|--|

|     |     |   |        |             |
|-----|-----|---|--------|-------------|
| CAL | AFP | 0 | 0 µg/L | 1 x 0,75 mL |
|-----|-----|---|--------|-------------|

|     |     |   |        |             |
|-----|-----|---|--------|-------------|
| CAL | AFP | 5 | 5 µg/L | 1 x 0,75 mL |
|-----|-----|---|--------|-------------|

|     |     |    |         |             |
|-----|-----|----|---------|-------------|
| CAL | AFP | 25 | 25 µg/L | 1 x 0,75 mL |
|-----|-----|----|---------|-------------|

|     |     |     |          |             |
|-----|-----|-----|----------|-------------|
| CAL | AFP | 100 | 100 µg/L | 1 x 0,75 mL |
|-----|-----|-----|----------|-------------|

|     |     |     |          |             |
|-----|-----|-----|----------|-------------|
| CAL | AFP | 250 | 250 µg/L | 1 x 0,75 mL |
|-----|-----|-----|----------|-------------|

|     |     |     |          |             |
|-----|-----|-----|----------|-------------|
| CAL | AFP | 500 | 500 µg/L | 1 x 0,75 mL |
|-----|-----|-----|----------|-------------|

AFP humana en una solución salina tamponada con Tris-HCl que contiene albúmina sérica bovina, un colorante amarillo inerte y metilisotiazolona (MIT) al 0,01% como conservante. Listo para su uso.

| Componente              | Cantidad    | Conservación y estabilidad después de la primera apertura |
|-------------------------|-------------|---|
| <b>Controles de AFP</b> | 2 viales    | 2-8 °C hasta la fecha de caducidad indicada en los viales |
| <b>CONTROL AFP 1</b>    | 1 x 0,75 mL |   |
| <b>CONTROL AFP 2</b>    | 1 x 0,75 mL |   |

AFP humana en una solución salina tamponada con Tris-HCl que contiene albúmina sérica bovina y metilisotiazolona (MIT) al 0,01% como conservante. Listo para su uso.

|                             |           |  |
|-----------------------------|-----------|--|
| <b>BIOTIN Anti-AFP</b>      |           |  |
| <b>Anti-AFP con biotina</b> | 1 x 15 mL | 2-8 °C hasta la fecha de caducidad indicada en el vial |

Anticuerpo monoclonal anti-AFP de ratón marcado con biotina, aproximadamente 1 µg/mL. Contiene solución salina tamponada con fosfato (pH 7,2), albúmina sérica bovina, inmunoglobulina bovina, agentes bloqueantes, Tween 20, un colorante azul inerte y metilisotiazolona (MIT) al 0,01% como conservante. Para mezclar con trazador, HRP anti-AFP, antes de su uso.

|                                   |             |  |
|-----------------------------------|-------------|--|
| <b>CONJ Anti-AFP</b>              |             |  |
| <b>Marcador, anti-AFP con HRP</b> | 1 x 0,75 mL | 2-8 °C hasta la fecha de caducidad indicada en el vial |

Solución de reserva de anticuerpo monoclonal anti-AFP de ratón con HRP, aproximadamente 20 µg/mL. Contiene conservantes. Para mezclar con biotina anti-AFP antes de su uso.

|                            |           |  |
|----------------------------|-----------|--|
| <b>SUBS TMB</b>            |           |  |
| <b>Sustrato TMB de HRP</b> | 1 x 12 mL | 2-8 °C hasta la fecha de caducidad indicada en el vial |

Contiene peróxido de hidrógeno tamponado y 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB). Listo para su uso.

| Componente | Cantidad | Conservación y estabilidad después de la primera apertura |
|------------|----------|---|
|------------|----------|---|

**STOP**

|                           |           |  |
|---------------------------|-----------|--|
| <b>Solución de parada</b> | 1 x 15 mL | 2–8 °C hasta la fecha de caducidad indicada en el vial |
|---------------------------|-----------|--|

Contiene ácido clorhídrico 0,12 M. Listo para su uso.

**WASHBUF 25X**

|                              |           |  |
|------------------------------|-----------|--|
| <b>Concentrado de lavado</b> | 1 x 50 mL | 2–8 °C hasta la fecha de caducidad indicada en el frasco |
|------------------------------|-----------|--|

Solución salina tamponada con Tris-HCl y estabilizada con Tween 20. Contiene Germall II como conservante. Para diluir con agua 25 veces antes de usar.

### Indicaciones de inestabilidad

La solución de sustrato TMB de HRP debe ser incolora o ligeramente azulada. Un color azul indica que el reactivo se ha contaminado y debe desecharse.

### ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

#### Para uso diagnóstico in vitro.

- Sólo para uso profesional.
- Consulte la publicación número 88-8395 (CDC) del U.S. Department of Health and Human Services (Bethesda, Md., EEUU) sobre procedimientos de seguridad en el laboratorio, o la correspondiente normativa local o nacional.
- Manipule todas las muestras de pacientes como potencialmente infecciosas.
- Siga las directrices locales para la eliminación de todos los materiales de desecho.

#### Advertencia

Los materiales usados en la preparación del reactivo original humano han sido analizados y se ha comprobado que no reaccionan con los anticuerpos anti-VIH-1/2, el anticuerpo anti-VCH y el antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg). Puesto que ningún método puede descartar completamente la presencia de enfermedades transmitidas por la sangre, la manipulación y la eliminación de los reactivos originales humanos de este producto deben realizarse como si fueran potencialmente infecciosos.

## RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

El kit EIA CanAg AFP está diseñado para utilizarse con suero. Recoja la sangre mediante venopunción y separe el suero según los procedimientos habituales. Las muestras se pueden conservar entre 2 °C y 8 °C durante 2 días. Para períodos más largos, se recomienda conservar las muestras a -20 °C o menos. Evite la congelación y descongelación repetidas de las muestras. Deje que las muestras congeladas se descongelen lentamente, preferiblemente entre 2 °C y 8 °C durante una noche, y lleve las muestras a temperatura ambiente antes del análisis.

## PROCEDIMIENTO

### Materiales necesarios pero no suministrados con el kit

#### 1. Agitador de microplacas

La agitación debe ser entre moderada y vigorosa. Agitación longitudinal de aproximadamente 200 golpes/min; 700-900 oscilaciones/min.

#### 2. Lavador de microplacas

El lavador automático de placas debe ser capaz de realizar 1 y 6 ciclos de lavado con un volumen de llenado mínimo de 350 µL por pocillo y ciclo de lavado.

Se recomienda el lavador manual de tiras Nunc Immuno-8, si no se utiliza una lavadora automática de microplacas.

#### 3. Espectrofotómetro de microplacas

Con una longitud de onda de 620 nm y/o 405 nm y un rango de absorbancia de 0 a 3,0.

#### 4. Pipetas de precisión

Con puntas de plástico desechables para administrar volúmenes de microlitros y mililitros.

Una pipeta de 8 canales o una pipeta redispensadora con puntas de plástico desechables para la administración de 100 µL es útil, pero no esencial.

#### 5. Agua destilada o desionizada

Para la preparación de la solución de lavado.

## Notas del procedimiento

1. Es necesaria la total comprensión de las instrucciones que figuran en este prospecto para garantizar un uso adecuado del kit EIA CanAg AFP. Los reactivos suministrados con el kit están pensados para su uso como una unidad integral. No mezcle reactivos idénticos de kits con números de lote diferentes. No use los reactivos del kit después de la fecha de caducidad impresa en la parte exterior de la caja.
2. Debe dejarse que los reactivos alcancen la temperatura ambiente (20 °C a 25 °C) antes de su uso. El ensayo sólo debe realizarse a temperaturas de entre 20 °C y 25 °C para obtener resultados exactos. Las muestras congeladas deben llevarse a temperatura ambiente lentamente y deben mezclarse suave pero concienzudamente después de la descongelación.
3. Antes de comenzar a pipetear los calibradores, los controles y las muestras de los pacientes, es aconsejable marcar las tiras para poder identificar claramente las muestras durante y después del ensayo.
4. El requisito de un lavado eficaz y profundo para la separación del antígeno unido y no unido y los reactivos de los complejos anticuerpo-antígeno unidos a la fase sólida es uno de los pasos más importantes en un EIA. A fin de garantizar un lavado eficaz, compruebe que todos los pocillos estén totalmente llenos con solución de lavado hasta el borde superior durante cada ciclo de lavado, que la solución de lavado se administre con una velocidad de dispensación adecuada, que la aspiración de los pocillos entre y después de los ciclos de lavado sea completa y que los pocillos estén vacíos. Si queda líquido en los pocillos, invierta la placa y déle golpes suaves contra papel absorbente.
  - Lavador automático de tiras: Siga las instrucciones del fabricante para efectuar una limpieza y un mantenimiento apropiados y realice el número necesario de ciclos de lavado antes y después de cada paso de la incubación. Es muy recomendable utilizar el modo de procesamiento *strip* (tira) y el modo de lavado *overflow* (desbordamiento) con un volumen de dispensación de 800 µL. El dispositivo de aspiración/lavado no debe dejarse de pie con la solución de lavado durante períodos prolongados, ya que las agujas podrían obstruirse, lo que provocaría una mala dispensación y aspiración de líquido.
5. La solución de sustrato TMB de HRP es muy sensible a la contaminación. Para una estabilidad óptima de la solución de sustrato TMB de HRP, vierta la cantidad necesaria del vial en un reservorio limpiado cuidadosamente o, mejor, a en bandeja de plástico desechable, para evitar la contaminación del reactivo. Utilice siempre puntas de pipeta de plástico desechables limpias (o puntas de pipeta dispensadora).
6. Utilice siempre puntas de pipeta de plástico desechables limpias, así como una técnica de pipeteado preciso adecuada al manipular muestras y reactivos. Evite la contaminación sujetando la punta de la pipeta ligeramente por encima de la parte superior del pocillo y evitando tocar la tira de plástico o la superficie del líquido. Usar una técnica de pipeteado adecuada es especialmente importante al manipular la solución de sustrato TMB de HRP.

# Hoja de protocolo

**EIA CanAg AFP** REF **600-10**

Prepare los componentes directamente antes de utilizarlos. Use las condiciones de agitación indicadas en las instrucciones.

| <b>Paso</b>                      | <b>Frasco/Placa</b>  | <b>Procedimiento</b>   |
|----------------------------------|--|--|
| 1. Prepare la solución de lavado | <b>WASHBUF</b> <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">25X</span>     | Diluya 50 mL de concentrado de lavado con 1.200 mL de agua destilada o desionizada.    |
|                                  | <b>CONJ</b> <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">Anti-AFP</span>   | Mezcle 50 µL de marcador, anti-AFP con HRP, con 1 mL de anti-AFP con biotina por tira: |
|                                  | <b>BIOTIN</b> <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">Anti-AFP</span> |  |
|                                  |  |  |
|                                  |  |  |
|                                  |  |  |
|                                  |  |  |
|                                  |  |  |
|                                  |  |  |
|                                  |  |  |
|                                  |  |  |
|                                  |  |  |
|                                  |  |  |
| <b>Número de tiras</b>           | <b>Marcador, HRP Anti-AFP (µL)</b>   | <b>Anti-AFP con biotina (mL)</b>   |
| 1                                | 50   | 1  |
| 2                                | 100  | 2  |
| 3                                | 150  | 3  |
| 4                                | 200  | 4  |
| 5                                | 250  | 5  |
| 6                                | 300  | 6  |
| 7                                | 350  | 7  |
| 8                                | 400  | 8  |
| 9                                | 450  | 9  |
| 10                               | 500  | 10   |
| 11                               | 550  | 11   |

|   |   |   |
|---|---|---|
| 12  | 600   | 12  |
| 2. Lave   | <b>MICROPLA</b>   | Lave cada pocillo una vez con la solución de lavado.    |
| 3. Añada los calibradores, controles y muestras | <b>CAL AFP</b><br>0, 5, 25, 100, 250, 500<br><b>CONTROL AFP</b><br>1, 2 | 25 µL en cada pocillo                                   |
| 4. Añada la solución de anticuerpo              | <b>SOLUCIÓN DE ANTICUERPO</b>   | 100 µL en cada pocillo                                  |
| 5. Incube                                       | <b>MICROPLA</b>   | Agitación durante 1 hora a temperatura ambiente         |
| 6. Lave   | <b>MICROPLA</b>   | Lave cada pocillo seis veces con la solución de lavado. |
| 7. Añada sustrato TMB de HRP                    | <b>SUBS TMB</b>   | 100 µL en cada pocillo                                  |
| 8. Incube                                       | <b>MICROPLA</b>   | Agitación durante 30 min a temperatura ambiente         |
| 9. Lea la absorbancia                           | <b>MICROPLA</b>   | 620 nm  |
| Alt.9 Añada la solución de parada               | <b>STOP</b>   | 100 µL en cada pocillo                                  |
| Alt.10 Incube                                   | <b>MICROPLA</b>   | Agitación durante 1 min a temperatura ambiente          |
| Alt.11 Lea la absorbancia                       | <b>MICROPLA</b>   | Lea el resultado a 405 nm antes de 15 min.              |

| Preparación de los reactivos   | Estabilidad del reactivo preparado           |
|--|--|
| <b>Solución de lavado</b>  | 2 semanas a 2-25 °C en un recipiente cerrado |
| Vierta los 50 mL del concentrado de lavado en un recipiente limpio y diluya 25 veces añadiendo 1.200 mL de agua destilada o desionizada para conseguir una solución de lavado tamponada. |  |
| <b>Solución de anticuerpo</b>  | 3 semanas a 2–8 °C                           |

Prepare la cantidad necesaria de solución de anticuerpo mezclando 50 µL de trazador, HRP anti-AFP, con 1 mL de biotina anti-AFP por tira (véase la tabla siguiente y la hoja de protocolo).

| Número de tiras | Marcador, HRP Anti-AFP (µL) | Anti-AFP con biotina (mL) |
|-----------------|-----------------------------|---------------------------|
| 1               | 50                          | 1                         |
| 2               | 100                         | 2                         |
| 3               | 150                         | 3                         |
| 4               | 200                         | 4                         |
| 5               | 250                         | 5                         |
| 6               | 300                         | 6                         |
| 7               | 350                         | 7                         |
| 8               | 400                         | 8                         |
| 9               | 450                         | 9                         |
| 10              | 500                         | 10                        |
| 11              | 550                         | 11                        |
| 12              | 600                         | 12                        |

Asegúrese de usar un frasco limpio de plástico o vidrio para preparar la solución de anticuerpo.

**Alternativa:** Vierta el contenido del marcador, anti-AFP con HRP, en el vial de anti-AFP con biotina y mezcle suavemente. Compruebe que todo el trazador, HRP anti-AFP se transfiere al vial de biotina anti-AFP.

**NOTA:** La solución de anticuerpo es estable durante 3 semanas a temperatura de 2 °C a 8 °C. No prepare más solución de anticuerpos que la que se usará en este período y compruebe que se conserva adecuadamente.

## Procedimiento del ensayo

Realice cada determinación por duplicado para los calibradores, los controles y las muestras de los pacientes. Debe elaborarse una curva de calibración con cada ensayo. Todos los reactivos y muestras deben llevarse a temperatura ambiente (20 °C a 25 °C) antes de su uso.

1. Para empezar, prepare la solución de lavado y la solución de trabajo del marcador. Es importante usar recipientes limpios. Siga las instrucciones cuidadosamente.
2. Transfiera el número necesario de tiras de microplacas a un soporte de tiras. (Devuelva inmediatamente las tiras no utilizadas a la bolsa de aluminio con desecante y vuelva a cerrarla cuidadosamente.) Lave cada tira una vez con la solución de lavado. No lave más tiras de las que puedan manejarse en 30 minutos.
3. Pipetee 25 µL de los calibradores de AFP (CAL 0, 5, 25, 100, 250, 500), los controles (C1, C2) y las muestras de los pacientes (desconocidos o "desc.") en los pocillos de tiras de acuerdo con el esquema siguiente:

|   | 1          | 2          | 3       | 4 | 5 | 6 | 7 etc. |
|---|------------|------------|---------|---|---|---|--------|
| A | Cal<br>0   | Cal<br>250 | Desc. 1 |   |   |   |        |
| B | Cal<br>0   | Cal<br>250 | Desc. 1 |   |   |   |        |
| C | Cal<br>5   | Cal<br>500 | Desc. 2 |   |   |   |        |
| D | Cal<br>5   | Cal<br>500 | Desc. 2 |   |   |   |        |
| E | Cal<br>25  | C1         | etc.    |   |   |   |        |
| F | Cal<br>25  | C1         |         |   |   |   |        |
| G | Cal<br>100 | C2         |         |   |   |   |        |
| H | Cal<br>100 | C2         |         |   |   |   |        |

4. Añada 100 µL de solución de anticuerpo a cada pocillo, usando una pipeta de precisión de 100 µL (o una pipeta de precisión de 100 µL de 8 canales). Evite la contaminación sujetando la punta de la pipeta ligeramente por encima de la parte superior del pocillo y evitando tocar la tira de plástico o la superficie del líquido.
5. Incube el marco con las tiras durante 1 hora ( $\pm$  5 min) a temperatura ambiente (20 °C a 25 °C), con agitación constante de la placa usando un agitador de microplacas.
6. Lave cada tira 6 veces, usando el procedimiento de lavado descrito en las Notas del procedimiento, punto 4.

7. Añada 100 µL de sustrato TMB de HRP a cada pocillo usando el mismo procedimiento de pipeteado que en el punto 4. La solución de sustrato TMB de HRP debe añadirse a los pocillos con la mayor rapidez posible y el tiempo entre la adición al primer pocillo y al último no debe superar los 5 minutos.
8. Incube durante 30 min ( $\pm$  5 min) a temperatura ambiente, agitando constantemente. Evite la luz directa del sol.
9. Lea inmediatamente la absorbancia a 620 nm en un espectrofotómetro de microplacas.

### Opción

Si el laboratorio no tiene acceso a un espectrofotómetro de microplacas capaz de leer a 620 nm, la absorbancia puede determinarse como sigue:

- Alt. 9. Añada 100 µl de solución de parada. Mezcle y lea la absorbancia a 405 nm en un espectrofotómetro de microplacas dentro de los 15 minutos siguientes a la adición de la solución de parada.

### Rango de medición

El kit EIA CanAg AFP mide concentraciones entre 0,5 y 500 µg/L. Si se esperan concentraciones de AFP por encima del rango de medición, se recomienda diluir las muestras con suero humano normal antes del análisis. **NOTA:** El suero empleado para la dilución debe medirse también para determinar la concentración de AFP endógena (véase "Cálculo de los resultados").

### Control de calidad

Pueden usarse los controles 1 y 2 de AFP para la validación de cada serie de ensayos. Los rangos de los resultados esperados están indicados en las etiquetas de los viales. Si se obtienen valores fuera del rango especificado, deberán revisarse completamente los reactivos y el funcionamiento del lector y repetirse el análisis. Cada laboratorio puede asimismo preparar sus propios grupos de suero con diferentes niveles, que pueden utilizarse como controles internos para garantizar la exactitud del ensayo.

### Material de referencia

Puede emplearse como estándar de referencia el 1<sup>er</sup> International Standard 72/225. Los valores para los calibradores y controles de AFP se asignaron frente a un conjunto de patrones de referencias internos cuyos valores son rastreables hasta el IS 72/225 usando el factor de conversión 0,83, esto es, 1µg/L corresponde a 0,83 kUI/L.

## CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

Si se usa un lector de espectrofotómetro de microplacas con programa de cálculo incorporado, consulte el manual del lector de placas y cree un programa usando la concentración indicada en las etiquetas de cada uno de los calibradores de AFP.

Para el cálculo automático de los resultados de AFP, se recomienda usar cualquiera de los métodos siguientes:

- Método de ajuste de la curva spline cúbica. El calibrador 0 debe estar incluido en la curva con el valor 0 µg/L.
- Método de ajuste de la curva spline suavizada. El calibrador 0 debe usarse como blanco de la placa.
- Interpolación con evaluación punto a punto. El calibrador 0 debe estar incluido en la curva con el valor 0 µg/L.
- Método de ajuste de la curva cuadrática. El calibrador 0 debe estar incluido en la curva con el valor 0 µg/L.

**NOTA:** No debe usarse una regresión lineal o paramétrica de grado 4.

Para la evaluación manual, se construye una curva de calibración representando los valores de absorbancia (A) para cada calibrador de AFP frente a la concentración de AFP correspondiente (en µg/L) (véase la figura más abajo). Las concentraciones de AFP desconocidas pueden leerse después a partir de la curva de calibración usando el valor de absorbancia medio de cada muestra de paciente.

Si las muestras en un análisis inicial dan valores de AFP mayores de 500 µg/L, deben diluirse las muestras 1/10 y 1/100 con suero humano normal y reanalizarse para obtener la concentración exacta de AFP. **NOTA:** La muestra empleada para la dilución debe medirse también para determinar la concentración de AFP endógena.

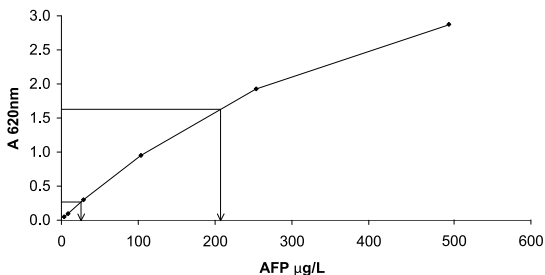
Luego se obtiene la concentración de AFP de la muestra no diluida, como sigue:

$$\text{Dilución a 1/10: } 10 \times ([\text{AFP}]_{\text{Muestra diluida}} - (0,9 \times [\text{AFP}]_{\text{Suero normal}}))$$

$$\text{Dilución a 1/100: } 100 \times ([\text{AFP}]_{\text{Muestra diluida}} - (0,99 \times [\text{AFP}]_{\text{Suero normal}}))$$

## Ejemplo de resultados

| Muestra     | Valores del calibrador | Valor de la abs. media (A) | AFP ( $\mu\text{g/L}$ ) |
|-------------|------------------------|----------------------------|-------------------------|
| CAL AFP 0   | 0 $\mu\text{g/L}$      | 0,036                      |                         |
| CAL AFP 5   | 5 $\mu\text{g/L}$      | 0,083                      |                         |
| CAL AFP 25  | 25 $\mu\text{g/L}$     | 0,282                      |                         |
| CAL AFP 100 | 100 $\mu\text{g/L}$    | 0,938                      |                         |
| CAL AFP 250 | 250 $\mu\text{g/L}$    | 1,914                      |                         |
| CAL AFP 500 | 500 $\mu\text{g/L}$    | 2,854                      |                         |
| Muestra A   |                        | 0,220                      | 19,4                    |
| Muestra B   |                        | 1,686                      | 208                     |



**Ejemplo (no use esta curva o la tabla anterior para determinar los resultados reales del ensayo).**

## LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

El nivel de AFP no puede usarse como prueba absoluta de la presencia o ausencia de enfermedad maligna, y no debe utilizarse la prueba de AFP en el cribado del cáncer. Los resultados de la prueba sólo deben interpretarse conjuntamente con los resultados de otras investigaciones y procedimientos en el diagnóstico de las enfermedades y la asistencia a los pacientes, y la prueba de AFP no debe sustituir a ninguna exploración clínica establecida.

Los anticuerpos anti-reactivo (anticuerpos humanos anti-ratón (HAMA) o anticuerpos heterófilos) en la muestra del paciente pueden interferir ocasionalmente con el ensayo, aunque se incluyan agentes bloqueantes específicos en el tampón.

## VALORES ESPERADOS

Se midió la AFP en 40 varones aparentemente sanos y 93 mujeres aparentemente sanas. El valor medio obtenido fue de 2,8  $\mu\text{g/L}$  con una desviación estándar de 2,6. Se examinaron los extremos inferior y superior del rango normal aplicando el tratamiento estadístico no paramétrico recomendado por el IFCC. El intervalo de referencia contiene la fracción del 95% central de la distribución de referencia. Los límites de referencia pueden estimarse por consiguiente como los fractiles 2,5% (inferior) y 97,5% (superior). Estos límites acotan una fracción del 2,5% de los valores en cada cola de la distribución de referencia. Estimaciones no paramétricas:

| Fracción         | Límite de referencia ( $\mu\text{g/L}$ ) | intervalo de confianza del 90% |
|------------------|--|--------------------------------|
| 2,5° (inferior)  | 0,1                                      | 0,0–0,3                        |
| 97,5° (superior) | 10                                       | 8,7–14,6                       |

Se recomienda que cada laboratorio establezca su propio intervalo normal para tener en cuenta factores ambientales locales como la dieta, el clima, las condiciones de vida, la selección de pacientes, etc. Como se ha demostrado que los niveles de AFP aumentan con la edad, se ha sugerido el uso de intervalos de referencia específicos de cada edad (2, 3). También debe tenerse en cuenta que los resultados basales del propio paciente suponen el punto de referencia más importante para la interpretación de los resultados de los marcadores (3, 4).

## CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

### Precisión

La precisión total se calculó según la directriz EP5-A (6) del NCCLS usando cuatro niveles de suero humano agrupado congelado que contenía antígeno AFP añadida y nueve combinaciones de reactivos diferentes del kit EIA CanAg AFP. Cada muestra se pipeteó aleatoriamente ( $n = 2/\text{análisis}$ ) y se analizó dos veces cada día durante 20 días.

| Muestra | Duplicados | Media<br>( $\mu\text{g/L}$ ) | DE intraensayo<br>( $\mu\text{g/L}$ ) | CV intraensayo<br>(%) | DE interdías<br>( $\mu\text{g/L}$ ) | CV<br>interdías, % |
|---------|------------|------------------------------|---------------------------------------|-----------------------|-------------------------------------|--------------------|
| AFP 1   | 80         | 7,8                          | 0,2                                   | 2,0                   | 0,1                                 | 1,8                |
| AFP 2   | 80         | 23,2                         | 0,4                                   | 1,8                   | 0,3                                 | 1,4                |
| AFP 3   | 80         | 207                          | 3,5                                   | 1,7                   | 3,5                                 | 1,7                |
| AFP 4   | 80         | 416                          | 6,6                                   | 1,6                   | 8,5                                 | 2,0                |

### Límite de detección

El límite de detección del kit EIA CanAg AFP es  $\leq 0,5 \mu\text{g/L}$ , definido como la concentración correspondiente a la media de los valores de absorbancia del calibrador 0 de AFP más 2 desviaciones estándar, según la fórmula:

$$\frac{2 \times \text{DE CAL } 0}{\text{DO CAL } 5 - \text{DO CAL } 0} \times 5 \mu\text{g/L}$$

### Recuperación

Se prepararon muestras de suero enriquecidas añadiendo alícuotas de una muestra con AFP muy elevada a muestras de suero normales. La recuperación del antígeno añadido estuvo en el rango del 90% al 106%. **NOTA:** No deben realizarse estudios de recuperación usando los calibradores del kit.

### Efecto de gancho

No se ha observado efecto de gancho para muestras de hasta 40 000  $\mu\text{g/L}$ . Sin embargo, como los pacientes con carcinoma hepatocelular avanzado pueden mostrar niveles muy elevados, podrían verse resultados falsos bajos debido a un efecto de gancho de dosis altas en muestras de estos pacientes. Para evitar la notificación de resultados engañosamente bajos debido a un efecto de gancho a concentraciones más elevadas, especialmente en pacientes en los que se están midiendo los marcadores por primera vez o cuando puedan esperarse valores de AFP muy altos, se recomienda estudiar las muestras en dos diluciones (esto es, sin dilución y diluida 1:100 con suero humano normal).

## Linealidad

Se diluyeron muestras de pacientes con suero humano normal y se analizaron. Los valores obtenidos estuvieron en + el 10 % de los valores esperados.

## Especificidad

El EIA CanAg AFP se basa en dos anticuerpos monoclonales de ratón, AFPK51 y AFPK57, que se dirigen contra dos determinantes antigénicos separados en la molécula de la AFP ( 5). Se siguió la directriz EP7-P (7) del NCCLS para determinar posibles fuentes de interferencia. Se estudiaron las siguientes sustancias y concentraciones y se observó que no interfieren con la prueba.

|                          | <b>Concentración sin interferencia significativa (<math>\pm</math> 10%)</b> |
|--------------------------|---|
| Lipemia (Intralipid®)    | 10 mg/mL  |
| Bilirrubina no conjugada | 0,6 mg/mL   |
| Hemoglobina              | 2 mg/mL   |

## GARANTÍA

Los datos de rendimiento aquí presentados se obtuvieron usando el procedimiento de ensayo indicado. Cualquier cambio o modificación del procedimiento no recomendado por Fujirebio Diagnostics puede afectar a los resultados, en cuyo caso Fujirebio Diagnostics rechaza todas las garantías expresas, implícitas u obligatorias, incluida la garantía implícita de comerciabilidad e idoneidad para el uso.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Johnson, P.J, (2002) Tumor Markers in Primary Malignancies of the liver. In "Tumor Markers: Physiology, pathobiology, technology and clinical applications", ed. Dimandis E.P. AACC Press, Washington pp 269-276.
2. Stenman, U-H and Alftan, H. (2002) Markers for Testicular Cancer. In "Tumor Markers: Physiology, pathobiology, technology and clinical applications", ed. Dimandis E.P. AACC Press, Washington, pp 351-359.
3. Christiansen, M., Hogdall, C.K., Andersen, J.R. and Norgaard-Pedersen, B. (2001) Alpha-fetoprotein in plasma and serum of healthy adults: preanalytical, analytical and biological sources of variation and construction of age-dependent reference intervals. *Scand J Invest* 61: 205-216.
4. Trapé, J., Botargues, J.M., Porta, F., Ricós, C., Badal, J.M., Salinas, R., Sala, M., and Roca, A. (2003) Reference change value for  $\alpha$ -Fetoprotein and its application in early detection of hepatocellular carcinoma in patients with hepatic disease. *Clin Chem* 49(7): 1209-1211.
5. Nustad, K., Paus, E., Kierulf, B., and Borner, O.P. (1998) Specificity and affinity of 30 monoclonal antibodies against Alpha-Fetoprotein. *Tumor Biol* 19: 293-300.
6. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices. Approved Guideline EP5-A (1999).
7. National Committee for Clinical Laboratory Standards, National Evaluation Protocols for Interference Testing, Evaluation protocol Number 7, Vol. 6, No 13, August (1986).



---

CanAg<sup>®</sup> es una marca registrada de Fujirebio Diagnostics AB

Fujirebio Diagnostics AB

Elof Lindälv's gata 13

SE-414 55 Gotemburgo

Suecia

Teléfono + 46 31 85 70 30

Fax + 46 31 85 70 40

info@fdab.com

www.fdab.com

