

PATHOZYME[®] ALPHA-FETOPROTEIN Ref OD307

Immuno análisis (EIA) de enzima para la determinación cuantitativa de AFP en el suero humano.

Almacenar entre 2 °C y 8 °C. No congelar.
Para uso exclusivo en diagnóstico in vitro.

INTRODUCCION

La fetoproteína alfa es producida en el feto por el hígado y por la YOLK SAC. Después del nacimiento, los niveles de AFP en el suero disminuyen a niveles apenas detectables durante el primer año de vida. Un aumento en los niveles AFP en personas no embarazadas puede ser un indicador de cáncer testicular o hepático. Durante el embarazo, los niveles de suero AFP se aumentan debido a la producción de AFP por el feto.

La AFP es una glicoproteína con un peso molecular de 70000 Da. Los niveles de suero AFP se aumentan en todos los casos de carcinoma hepático metastásico. También se elevan los niveles de AFP en el 50% de los casos de cáncer testicular no seminomatoso. Otros cánceres tales como el del páncreas, estómago, colon y pulmón pueden también elevar los niveles de AFP. En pequeños números de condiciones no malignas (5-10%) tales como hepatitis y la cirrosis del hígado pueden también elevarse los niveles del suero AFP.

El AFP en el suero materno, alcanza su máximo nivel a las 30 semanas. Después de este punto, decrece rápidamente; al llegar a la semana 36, el nivel de AFP habrá llegado a menos del 2% del nivel máximo. Los niveles especialmente elevados del AFP pueden indicar gestación múltiple, feto muerto y tubo neural abierto entre otros. Los niveles bajos de AFP pueden indicar, entre otros problemas, síndrome de Down, aborto espontáneo y preñez molar.

USO PRETENDIDO

El **PATHOZYME AFP** es un immuno análisis (EIA) para la determinación cuantitativa de la Alfa-Fetoproteína (AFP) en el suero humano.
 Para uso profesional únicamente.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

Se preparan y purifican anticuerpos específicos de conejo anti-AFP y se colocan cubriendo pozos de MICROTITRATION. Se aplican y se incuban los sueros de prueba con BUFFER zero. Si está presente el AFP humano en el espécimen, se adherirá a los anticuerpos en los pozos. Luego se lava el material no unido y se añade anticuerpo de ratón anti-AFP etiquetado con enzima Peroxidasa HORSE RADISH (conjugada). El conjugado se une al AFP el cual está adherido a los anticuerpos. Una vez más, se lava el material no adherido.

Además del sustrato (TMB) se desarrollará un color únicamente en los pozos en los cuales está presente la enzima indicando la presencia de AFP. Se para la reacción de la enzima añadiendo ácido clorhídrico diluido. En seguida, se mide la absorción a 450nm. La concentración del AFP es directamente proporcional a la intensidad del color de la muestra de prueba. Esta prueba ha sido calibrada contra los estándares de la casa. No existe estándar internacional para esta prueba.

Ref
OD307



CONTENIDO

Microtitre Plate	12 x 8 pozos x 1
Pozos rompibles cubiertos con anticuerpo específico contenidos dentro de una bolsa de hojilla metálica re-sellable con desecante.	
Cal A 0 ng/ml	0.5 ml
Referencia estándar: Suero humano libre de AFP. Listo para su uso. (Incoloro).	
Cal B 5 ng/ml	0.5 ml
Referencia estándar: AFP diluido en suero humano. Listo para su uso. (Incoloro).	
Cal C 20 ng/ml	0.5 ml
Referencia estándar: AFP diluido en suero humano. Listo para su uso. (Incoloro).	
Cal D 50 ng/ml	0.5 ml
Referencia estándar: AFP diluido en suero humano. Listo para su uso. (Incoloro).	
Cal E 150 ng/ml	0.5 ml
Referencia estándar: AFP diluido en suero humano. Listo para su uso. (Incoloro).	
Cal F 300 ng/ml	0.5 ml
Referencia estándar: AFP diluido en suero humano. Listo para su uso. (Incoloro).	
Conj	17 ml
Anti-AFP HRP Conjugado: Anti-AFP conjugado a HRP. Listo para su uso (Rosado)	
Buf AS	11 ml
BUFFER basado en fosfatasa conteniendo proteínas estabilizantes. Listo para su uso. (Amarillo)	
Subs TMB	11 ml
Solución de sustrato: 3,3', 5,5' Tetramethyl Benzidina en BUFFER de citrato. Listo para su uso. (Incoloro)	
Soln Stop HCl 1M	11 ml
Solución de Paro: Ácido Clorhídrico diluido en agua purificada. Listo para su uso (Incoloro).	
Hoja de Instrucciones y la hoja de registro de datos EIA.	
	1 + 1

MATERIALES REQUERIDOS NO SUMINISTRADOS

Micropipetas :100µl, 200µl and 1000µl
 Puntas desechables para pipetas
 Papel absorbente
 Un lector de ELISA dotado con un filtro de 450 nm.
 Vidriería de laboratorio minuciosamente limpia.

PRECAUCIONES

El **PATHOZYME AFP** contiene materiales de origen humano los cuales han sido probados como negativo para los anticuerpos HCV, HIV I y II y el HBsAg por un procedimiento aprobado a nivel de donante único. Puesto que ninguna prueba puede asegurar con absoluta certeza que los productos derivados de origen humano no transmitan agentes infecciosos, se recomienda que los reactivos incluidos en este kit sean manejados con precaución y atención extrema durante su uso y su disposición. Todos los reactivos, sin embargo, deben tratarse como biopeligrosos potenciales tanto en su uso como en su eliminación. No se deben ingerir.

Los reactivos **PATHOZYME AFP** no contienen sustancias peligrosas según se define en las regulaciones actuales sobre químicos (Información sobre peligros y empaque para el suministro) en el Reino Unido Todos los reactivos deben, sin embargo, tratarse como bio peligrosos tanto en su utilización como en su eliminación. La eliminación final se debe efectuar en concordancia con la legislación local.

La solución de paro **PATHOZYME AFP** es ácido clorhídrico diluido y por consiguiente es corrosivo. Maneje con cuidado. En caso de contacto, lave con abundante agua.

Los reactivos del **PATHOZYME AFP** contienen un 1% de Proclín™ 300* como preservativo el cual puede ser tóxico si se ingiere. En caso de contacto, lave muy intensamente con agua corriente y busque atención médica.

*Proclín™ 300 es una marca registrada de ROHM & HAAS Limited.

ALMACENAMIENTO

Los reactivos deben almacenarse dentro de un rango de temperatura entre los 2°C y los 8°C.

La fecha de vencimiento del kit es el último día del mes indicado en la botella y en la etiqueta del kit. Este funcionará según las especificaciones hasta la fecha de vencimiento según se determina por la fecha de fabricación del producto la cual está indicada claramente en el kit y en sus componentes. No use los reactivos después de la fecha de vencimiento.

Evite la exposición de los reactivos a temperaturas extremas y no los exponga a la luz solar directa.

NO CONGELE NINGUNO DE LOS REACTIVOS. (a excepción de los estándares de almacenamiento). Esto puede causar daño irreversible.

RECOLECCION Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Obtenga una muestra de sangre venosa del paciente y permita que se forme un coágulo y que se retraiga. Enseguida centrifuge la muestra de sangre coagulada y recolecte el suero claro. Se requieren muestras de suero frescas.

No use suero contaminado ni HAEMOLYSED ni LIPAEMIC para las pruebas, ya que estas situaciones afectan adversamente los resultados.

El suero puede almacenarse dentro de un rango de temperaturas entre 2°C y 8°C hasta por un periodo de 48 horas antes de efectuar la prueba. Si se requiere un almacenamiento de mayor duración, hágalo a -20°C hasta por un año. Las muestras derretidas deben mezclarse antes de efectuar la prueba.

No use la azida de sodio como preservativo ya que esto puede inhibir el sistema de enzima peroxidasa

No repita el ciclo de congelar/descongelar de los especímenes ya que esto causará resultados falsos.

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

Todos los reactivos deben estar a temperatura ambiente (20°C a 25°C) y deben mezclarse suavemente antes de su uso. No induzca la formación de espuma.

LIMITACIONES PARA EL USO

No se ha validado para esta prueba el uso de muestras diferentes al suero. Tampoco existe un protocolo de re-utilización para este producto.

Al efectuar una interpretación de esta prueba se aconseja vehementemente tener en cuenta todos los datos clínicos. El diagnóstico no debe efectuarse basados únicamente en los resultados de un solo análisis clínico.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

- Permita que todos los componentes del kit así como el suero de la prueba lleguen a la temperatura ambiente de 20°C a 25°C.
- Se deben usar un juego de estándares con cada grupo de suero de prueba. Asegure el número deseado de pozos cubiertos en el recipiente. Registre la posición de los estándares y del suero de prueba en la hoja de registro de datos EIA suministrada.
- Las tiras no utilizadas deben resellarse en la bolsa de hojilla metálica con disecante y usando el sello zip-lock antes de volverse a colocar a 2°C hasta 8°C.
- Dispense 20µl del suero de prueba y de estándares en los pozos asignados.
- Dispense 100µl de BUFFER Zero a cada pozo y mezcle por 30 segundos. Es muy importante mezclar totalmente.
- Incube la placa por 30 minutos a temperatura ambiente (20°C a 25°C).
- Al final del periodo de incubación descarte el contenido de los pozos sacudiendo las placas a un contenedor bio-peligroso. Enseguida golpee los pozos con firmeza contra papel absorbente. Asegure que haya suficiente desinfectante en el contenedor bio-peligroso.
- Lavada de Manos: Llene los pozos con un mínimo de 300µl de agua destilada en cada uno. Pase el contenido de la placa a un contenedor bio-peligroso. Luego golpee los pozos firmemente contra papel absorbente. Luego lave los pozos desocupados 5 veces.
- Golpee los pozos firmemente contra papel absorbente o contra una toalla de papel para retirar todas las gotitas de agua residual.
- Lavado a máquina: Asegúrese de que haya 300µl de agua destilada por cada pozo y que se añada un desinfectante apropiado a la botella recolectora de desperdicio. Lave los pozos desocupados 5 veces. Después de lavar, retire el exceso de fluido golpeando los pozos firmemente contra papel absorbente o contra una toalla de papel para retirar toda el agua residual en gotitas.
- Distribuya 150µl de conjugado Anti-AFP HRP a cada pozo y mezcle suavemente por cinco segundos.
- Incube por 30 minutos a temperatura ambiente (20°C to 25°C).
- Lave la placa según se describe arriba.
- Distribuya 100µl de solución de sustrato a cada pozo y mezcle suavemente por 5 segundos.
- Incube en la oscuridad por 20 minutos a temperatura ambiente (20°C to 25°C).
- Pare la reacción añadiendo 100µl de solución de paro a cada pozo.
- Mezcle suavemente por 30 segundos para asegurar que el color azul cambia completamente a amarillo.
- Inmediatamente lea la densidad óptica (no mas tarde de 10 minutos) usando un lector de micro placa con un filtro 450nm.

PREVENCIÓN DE INCONVENIENTES

Para ser usado por operarios con un mínimo de entrenamiento básico de laboratorio.

No use los componentes del kit que estén dañados ni contaminados.

Use una punta desechable y separada para cada muestra para prevenir contaminación cruzada.

Se recomienda, aunque no es absolutamente necesario, duplicar todos los estándares y especímenes.

Deben correrse los especímenes y los estándares al mismo tiempo para mantener las condiciones de la prueba iguales.

Se recomienda que no se usen mas de 32 pozos para cada tiraje de análisis si se usa una medición manual, ya que toda la medición de los estándares y los especímenes debe ser completada dentro de tres minutos. Si se usa una medición automática, puede usarse una placa completa de 96 pozos.

Tape todos los reactivos inmediatamente después de usarse.

Evite la medición con pipeta repetida desde los reactivos guardados ya que esto puede causar contaminación.

No mezcle los reactivos ni las tiras cubiertas de anticuerpo de diferentes kits. Al eliminar, hay que tener cuidado de no tocar la superficie del pozo.

No permita que los reactivos se escurran a los lados del pozo. Antes de comenzar el análisis los reactivos deben estar a temperatura ambiente (20°C-25°C). Mezcle suavemente los reactivos por inversión o por giro.

Una vez que se haya iniciado un análisis, no se debe permitir que los pozos se sequen durante el análisis.

No contamine la solución de sustrato ya que esto tornará todo el kit inoperante.

Revise la precisión y exactitud del equipo de laboratorio utilizado durante el procedimiento para así garantizar resultados reproducibles.

Las tiras no usadas deben resellarse en la bolsa de hojilla metálica con disecante. Use el cierre zip.lock antes de almacenar a 2°C a 8°C.

CALCULO DE LOS RESULTADOS

Calcule el valor de absorbencia medio (A450) para cada juego de estándares y de especímenes. Construya una curva estándar sobre papel gráfico plotando la absorbencia media de cada suero contra su concentración en ng/ml. Use los valores medios de absorción para cada espécimen para determinar la correspondiente concentración de AFP en ng/ml de la curva estándar. Si los niveles de controles o de las muestras de los usuarios conocidas no arrojan los resultados esperados, éstos deben considerarse no válidos.

Si usa un paquete de software, escoja una curva de regresión cuadrática que encaje.

VALORES ESPERADOS Y SENSIBILIDAD

La gráfica producida por los calibradores debe ser hiperbólica en su forma con el OD450 de los calibradores proporcional a su concentración. El OD del calibrador A debe ser inferior a 0.75 y el OD del calibrador F mayor que 1.5 para que los resultados del análisis sean válidos.

En pacientes de alto riesgo, los valores AFP entre 100ng/ml y 350 ng/ml, sugieren un diagnóstico de carcinoma hepatocelular y niveles sobre 350ng/ml usualmente indican la enfermedad. Aproximadamente un 97% de personas saludables tienen niveles AFP de menos de 8.5 ng/ml. Se recomienda que cada laboratorio establezca su propio rango normal. La concentración mínima detectable del PATHOZYME AFP está estimada en 2.0 ng/ml.

DATOS EVALUATIVOS

Calibrado a los competidores mas importantes y a los estándares de la casa. El coeficiente de variación del PATHOZYME AFP es menos o equivalente a un 10%.

En la evaluación entre el kit Omega PATHOZYME AFP y el kit Abbott AxSym para muestras con niveles entre 15.6 bg/ml y 330 ng/ml, se generaron los siguientes datos.

Número de muestras	79
Correlación del coeficiente	0.985
Pendiente	1.038
Interceptación	0.729
Media del Omega	55.12 ng/ml
Media del Abbott	52.24 ng/ml

Estos kits demostraron dar buena correlación.

REFERENCIAS

- Abelev, G. I.** Alpha-fetoprotein as a marker of embro-specific differentiation in normal and human tissues. *Transplant. Rev.* 1974;20:3-37.
- Hirai, H.** Alpha-fetoprotein, in; Chu, T. M. (ed.). *Biochemical markers for Cancer.* New York: Marcel Dekker 1982:23-59.
- Chan, D. W., Miao, Y. C.** Affinity chromatographic separation of alpha-fetoprotein variants: Development of a mini-column procedure and application to cancer patients. *Clin. Chem.* 1986;32:2143-2146.
- Sell, L. S.** Cancer markers of the 1990s. *Clin. Lab. Med.* 1990;10:1-37.
- Hirai, H., Nishi, S., Watabe H.** et al. Some chemical, experimental and clinical investigations on alpha-fetoprotein. In: Hirai, H., Miyaji, T. (eds.). *Alpha-fetoprotein and hepatoma.* Gann. Monogr. 1973;14:19-34.

GUIA RAPIDA DEL PROCESAMIENTO DEL ENSAYO

- Distribuya 20µl de suero de prueba o de estándares y 100µl de BUFFER Zero a cada pozo y mezcle suavemente por 30 segundos.
- Incube por 30 minutos a temperatura ambiente. (20°C a 25°C).
- Elimine el contenido de los pozos y lave cinco veces con agua destilada.
- Distribuya 150µl de Conjugado Anti-AFP HRP en cada pozo, mezcle suavemente por 5 segundos.
- Incube por 30 minutos a temperatura ambiente. (20°C to 25°C).
- Elimine el contenido de los pozos y lave cinco veces
- Añada 100µl de solución de sustrato a cada pozo y sacuda suavemente por 5 segundos.
- Incbe en la oscuridad por 20 minutos a temperatura ambiente. (20°C to 25°C).
- Añada 100µl de solución de paro a cada pozo y sacuda suavemente por 30 segundos
- Lea las densidades ópticas inmediatamente (no mas tarde de diez minutos) usando un lector de microtiter con un filtro 450nm.

8080 ISSUE 5 Revised March 2011 **SPANISH**
© Omega Diagnostics Ltd 2011



OMEGA DIAGNOSTICS LTD.
Omega House, Hillfoots Business Village
Alva FK12 5DQ, Scotland, United Kingdom
odl@omegadiagnostics.co.uk
www.omegadiagnostics.com
AN ISO 9001 AND ISO 13485 CERTIFIED COMPANY