

# CanAg AFP EIA

REF 600-10

IVD

CE

Instructions d'utilisation. 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	SEMNIIFICAȚIA 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/  
Sunaudoti iki/Izlietot līdz/Houdbaar  
tot/Brukes innen/Użyty przed/  
Prazo de validade/Expiră 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/  
Sarzszzám/Codice del lotto/  
Partijos kodas/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 produkcyj/Data de fabrico/Data fabricației/Дата производства/  
Tillverkningsdatum/Dátum výroby/Datum izdelave/Datum proizvodnje/Üretim tarihi



Temperature limitation/  
Температурни граници/  
Teplotní omezení/  
Temperaturbegrænsning/  
Temperaturbegrenzung/  
Περιορισμοί θερμοκρασίας/  
Limites de temperatura/  
Temperatuuri piirang/  
Limite de température/  
Temperaturno ograničenje/  
Hőmérsékletre vonatkozó korlátozás/  
Limiti di temperatura/  
Temperatūriniai apribojimai/  
Temperatūras ierobežojums/  
Temperatuurbepërking/  
Temperaturbegrensninger/  
Temperatury graniczne/  
Limite de temperatura/  
Limite de temperatură/  
Температурный режим/  
Temperaturbegrænsning/  
Teplotné obmedzenie  
Omejitve temperature/  
Temperaturno ograničenje/  
Sıcaklık sınırlaması/



In Vitro Diagnostic Medical Device/  
Медицински уред за диагностика  
ин витро/Lékařský 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 meditsiiniseade/  
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/  
Medicīniska 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/  
Zdravotnícka pomôcka na diagnostiku in vitro/  
In vitro diagnostični pripomoček/  
Diagnostički medicinski uređaj  
In Vitro/<96> testleri için yeterlilik içerir



Contains sufficient for <96> tests/Σύдържа достатъчно количество за тестове <96>/Lze použít pro <96> testů/  
Ineholder tilstrækkeligt/  
Inhalt ausreichend für <96> Prüfungen/  
Περιεχόμενο επαρκές για «96» εξετάσεις/  
Contenido suficiente para <96> ensayos/  
Kogusest piisab <96> testi läbiviimiseks/  
Contenu suffisant pour «96» tests/  
Sadrži dovoljno za <96> testova/  
A doboz tartalma <96> vizsgálat elvégzéséhez elegendő/  
Contenuto sufficiente per «96» saggi/  
Turinys skirtas atlikti <96> tyrimus/  
Saturis 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



Catalogue number/Каталожен номер/  
Katalogové číslo/Katalognummer/  
Bestellnummer/Αριθμός καταλόγου/  
Número de catálogo/Kataloogi 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  
 τις Οδηγίες σχετικά με τη χρήση/  
 Consulte las instrucciones de uso/  
 Vt kasutusjuhendit/Consulter le mode  
 d'emploi/Pročitajte 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  
 før 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

**CONT**

Contents of kit/Съдържание на набора/  
 Obsah sady/Kittets indhold/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/Biologická rizika/Biologisk  
 fare/Biologische Gefahren/Βιολογικοί  
 κίνδυνοι/Riesgos biológicos/  
 Bioloogilised ohud/Risques biologiques/  
 Biološkli rizici/Biológiai kockázatok/Rischi  
 biologici/Biologinis pavojus/Bioloģiskais  
 risks/Biologische risico's/Biologiske  
 risikoer/Zagroženie biologiczne/Riscos  
 biológicos/ Biologisk risk/Pericole  
 biologice/Биологическая опасность/  
 Biologicky rizikové/Biologické riziká/  
 Biološkli rizici/Bijolojik riskler

**ORIG HUM**

Human/С човешки произход/Lidské/  
 Human/Human/δείγματα αναφοράς/  
 Humano/Inimpăritolu/Humaine/Ljudskog  
 porjekla/Humán/Origine Umana/  
 Žmogaus kilmės/Cilvēku izcelsmes/  
 Human/Menneske/Ludzka/Humano/  
 Origine umană/Человеческого  
 происхождения/Human/Ludské/  
 Humanega izvora/Ljudskog porekla/İnsan

**ORIG MOU**

From mouse/С миши произход/Мыши/  
 Fra mus/der Maus/από ποντίκι/de ratón/  
 Hiirtelt/De souris/Mišijeg porjekla/  
 Egérból/Murino/Pelés kilmés/No peles/  
 Van muizen/Fra mus/Mysia/Do rato/De  
 la șoareci/Мышиного происхождения/  
 Frán mus/Myšie/Mišjega izvora/Mišijeg  
 porekla/Fareden

**ORIG BOV**

Bovine/С говяжди произход/  
 Hovězí/Bovin/Rind/από βοειδή/  
 Bovino/Veistelt/Bovine/Rogate stoke/  
 Szarvasmarha/Bovino/Jaučio/No  
 liellopa/Bovien/Bovin/Wołowy/Bovino/  
 Origine bovină/крупного рогатого  
 скота/Frán ko/Hovädzie/Govejega  
 izvora/Rogate krupne stoke/Bovin



Reconstitute with/Разтваряне с/  
 Rozřed'te pomocí/Rekonstitueres med/  
 Rekonstituieren mit/Ανασύσταση με/  
 Reconstituir con/Lahjendamine/  
 Reconstituer avec/Rekonstituiraite s/  
 Feloldáshoz/Ricostituire con/Atkurti,  
 ištirdant su/Atšķaidīt ar/Reconstitutie  
 met/Rekonstitueres med/Odtworzyć  
 za pomocą/Reconstituir com/A  
 se reconstitui cu/Растворить в/  
 Rekonstituera med/Rozried'te pomocou/  
 Rekonstituiraite z/s/Ponovno formiranje  
 sa/Yeniden oluşturulur



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

# CanAg AFP EIA

Instructions d'utilisation

Kit de Test immunoenzymatique

Pour 96 déterminations

## UTILISATION

Le Kit CanAg AFP EIA est destiné à la détermination quantitative de l' $\alpha$ -Fœtoprotéine (AFP) dans le sérum humain.

## RESUME ET EXPLICATION DU TEST

$\alpha$ -Fœtoprotéine (AFP), équivalent fœtal de l'albumine, est une 67 kDa glycoprotéine produite pendant le développement embryonnaire et est trouvée, à des concentrations très élevées, dans le sérum fœtal et dans le liquide amniotique. Chez les femmes adultes normalement non-enceintes, AFP est présent, à des concentrations basses, dans le sérum. Cependant l'AFP peut être, d'une façon marquée, augmentée dans le sérum de Patients avec un Cancer du Foie, du Testicule ou de l'Ovaire. La détermination quantitative d'AFP dans le sérum, peut être utile dans la gestion de patients avec un Cancer, suspecté ou diagnostiqué, du Foie ou des tumeurs germinales du Testicule ou de l'Ovaire (1, 2).

## PRINCIPE DU TEST

Le Test CanAg AFP EIA est en phase solide. Cet immuno-test, non-compétitif, est basé sur la technique sandwich directe. Les Calibreurs, les Contrôles et les échantillons de Patients sont incubés ensemble avec un Anticorps monoclonal Anti-AFP biotinylé et la Peroxydase du Raifort (HRP) étiqueté Anticorps monoclonal Anti-AFP, dans des barrettes micro-titres enduites de Streptavidine. Après lavage, le réactif tamponné Substrat / Chromogène (peroxyde d'hydrogène et 3, 3', 5, 5' tétra méthyle benzidine) est ajouté à chaque puits et la réaction enzymatique peut commencer. Pendant la réaction enzymatique une couleur bleue se développe si l'Antigène est présent. L'intensité de la couleur est proportionnelle à la quantité d'AFP présente dans les échantillons.

L'intensité de la couleur est déterminée par un Spectrophotomètre pour plaque micro-titre à 620 nm (ou optionnellement à 405 nm après addition de la Solution d'Arrêt). Les courbes de Calibrage sont construites pour chaque Test en mettant sous forme graphique les valeurs d'absorbance contre la concentration de chaque Calibreur. Les concentrations en AFP des échantillons des Patients sont alors lues à partir de la courbe de calibrage.

## REACTIFS

- Chaque Kit CanAg AFP EIA contient des Réactifs pour 96 Tests.
- La date d'expiration du Kit est imprimée sur l'étiquette à l'extérieur de la boîte de Kit.
- Ne pas utiliser le Kit au-delà de la date d'expiration.
- Ne pas mélanger des Réactifs de différents lots de Kit.
- Conserver les Kits à +2°/+8°C. Ne pas congeler.

- Les Réactifs ouverts sont stables, suivant le tableau ci-dessous, à condition qu'ils n'aient pas été contaminés, qu'ils aient été conservés dans leur conteneur d'origine fermé, qu'ils aient été manipulés comme prescrit. Remettre les Réactifs à +2°/+8°C immédiatement après usage.

Composant	Quantité	Conservation et stabilité après la première ouverture
<b>MICROPLA</b>		
<b>Streptavidine</b> <b>Plaque micro-titre</b>	1 Plaque	+2°/+8°C jusqu'à la date d'expiration indiquée sur la plaque
12 barrettes détachables de 8 puits enduits de Steptavidine. Après ouverture, remettre les barrettes non utilisées dans le sachet d'aluminium contenant un deshydratant et ressouder soigneusement pour les garder au sec.		

<b>Calibreurs AFP</b>	6 flacons	+2°/+8°C jusqu'à la date d'expiration indiquée sur le flacon
-----------------------	-----------	--------------------------------------------------------------

<b>CAL</b>	<b>AFP</b>	<b>0</b>
------------	------------	----------

0 µg/l      1 x 0.75 ml

<b>CAL</b>	<b>AFP</b>	<b>5</b>
------------	------------	----------

5 µg/l      1 x 0.75 ml

<b>CAL</b>	<b>AFP</b>	<b>25</b>
------------	------------	-----------

25 µg/l      1 x 0.75 ml

<b>CAL</b>	<b>AFP</b>	<b>100</b>
------------	------------	------------

100 µg/l      1 x 0.75 ml

<b>CAL</b>	<b>AFP</b>	<b>250</b>
------------	------------	------------

250 µg/l      1 x 0.75 ml

<b>CAL</b>	<b>AFP</b>	<b>500</b>
------------	------------	------------

500 µg/l      1 x 0.75 ml

L'AFP Humain est dans une solution tamponnée de sel Tris-HCl contenant de la sérum albumine bovine, un colorant inerte jaune et 0.01% de méthyl-isothiazolone (MIT) comme conservateur. La solution est prête à l'emploi.

<b>Composant</b>	<b>Quantité</b>	<b>Conservation et stabilité après la première ouverture</b>
------------------	-----------------	--------------------------------------------------------------

**Contrôles AFP** 2 flacons +2°/+8° C jusqu'à la date d'expiration indiquée sur le flacon

<b>CONTROL</b>	<b>AFP</b>	<b>1</b>
----------------	------------	----------

1 x 0.75 ml

<b>CONTROL</b>	<b>AFP</b>	<b>2</b>
----------------	------------	----------

1 x 0.75 ml

L'AFP Humain est dans une solution tamponnée de sel Tris-HCl contenant de la sérum albumine bovine et 0.01% de méthyl-isothiazolone (MIT) comme conservateur. La solution est prête à l'emploi.

<b>BIOTIN</b>	<b>Anti-AFP</b>
---------------	-----------------

**Biotine Anti-AFP** 1 x 15 ml +2°/+8°C jusqu'à la date d'expiration indiquée sur le flacon

La solution de Biotine Anti-AFP, Anticorps monoclonal de souris, à la concentration approximative de 1 µg/ml, contient un tampon phosphate salé (pH 7.2), de la sérum albumine bovine, de l'immunoglobuline bovine, des agents bloquants, du Tween 20, un colorant inerte bleu et 0.01% de méthyl-isothiazolone (MIT) comme conservateur. Elle doit être mélangée avec du Traceur, HRP Anti-AFP avant utilisation.

<b>CONJ</b>	<b>Anti-AFP</b>
-------------	-----------------

**Traceur, HRP Anti-AFP** 1 x 0.75 ml +2°/+8°C jusqu'à la date d'expiration indiquée sur le flacon

La Solution concentrée de HRP Anti-AFP, Anticorps monoclonal de souris, à la concentration approximative de 20 µg/ml, contient des conservateurs. Elle doit être mélangée avec de la Biotine Anti-AFP avant utilisation.

<b>SUBS</b>	<b>TMB</b>
-------------	------------

**Substrat-HRP TMB** 1 x 12 ml +2°/+8°C jusqu'à la date d'expiration indiquée sur le flacon

La solution contient un tampon de Peroxyde d'hydrogène et du 3, 3', 5, 5' tétra méthyle benzidine (TMB). La solution est prête à l'emploi.

Composant	Quantité	Conservation et stabilité après la première ouverture
-----------	----------	-------------------------------------------------------

**STOP**

<b>Solution d'Arrêt</b>	1 x 15 ml	+2°/+8°C jusqu'à la date d'expiration indiquée sur le flacon
-------------------------	-----------	--------------------------------------------------------------

Elle contient 0.12M d'Acide Chlorhydrique. La solution est prête à l'emploi.

**WASHBUF 25X**

<b>Solution de Lavage Concentrée</b>	1 x 50 ml	+2°/+8°C jusqu'à la date d'expiration indiquée sur le flacon
--------------------------------------	-----------	--------------------------------------------------------------

Il s'agit d'une solution tampon de sel Tris-HCl avec du Tween 20. Elle contient du Germall II comme conservateur. Elle doit être diluée 25 fois avec de l'eau Distillée ou Désionisée avant utilisation.

### Signes d'instabilité

Le Substrat-HRP TMB doit être incolore ou légèrement bleu. Une couleur bleue indique que le Réactif a été contaminé et qu'il doit être détruit.

### MISE EN GARDE ET PRECAUTIONS D'EMPLOI

#### Pour un usage diagnostic in vitro

- Pour un usage professionnel seulement.
- Prière de se référer à la publication N° (CDC) 88-8395 de l'US Department of Health and Human Services (Bethesda, Md., US), sur les procédures de sécurité dans les Laboratoires, ou tout autre réglementation locale et nationale.
- Manipuler les échantillons de Patients comme potentiellement infectieux
- Suivre les Réglementations locales pour l'élimination et le traitement de tous les déchets.

### Attention

Le matériel utilisé, pour la préparation du Réactif d'origine humaine, a été testé et trouvé non réactif aux Anticorps VIH-1/2, aux Anticorps HCV et à l'Antigène de Surface de l'Hépatite B (Ag HBs). Puisqu'il n'existe pas de méthode de Test, rejetant complètement la présence d'agents infectieux dans le sang, la manipulation et l'élimination des réactifs d'origine humaine, doivent être effectuées comme s'ils étaient potentiellement infectieux.

## **Prelevement et manipulation des echantillons**

Le Test CanAg AFP EIA est destiné à être utilisé avec du sérum. Prélever le sang par veinopuncture et séparer le sérum selon les procédures habituelles. Les échantillons peuvent être conservés à +2°/+8°C pendant 2 jours. Pour des périodes plus longues, il est recommandé de conserver les échantillons à – 20°C ou en dessous. Eviter la congélation et la décongélation répétée des échantillons. Il est permis de décongeler lentement, préféablement à +2°/+8° C, pendant la nuit et d'amener ainsi les échantillons à température ambiante avant analyse.

## **MODE OPERATOIRE**

### **Matériel nécessaire mais non fournis avec le Kit**

#### **1. Agitateur-vibreux de plaque micro-titre**

L'agitation vibration doit être de moyenne à forte. L'agitation longitudinale doit être approximativement de 200 strokes/min, et les oscillations de 700 à 900/mn.

#### **2. Laveur de plaque micro-titre**

Laveur de microplaques automatique en mesure de réaliser 1 et 6 cycles de lavage et doté d'un volume de remplissage minimum de 350 µL/puits/cycle de lavage.

Le laveur manuel de barrettes Nunc Immuno-8 est recommandé si un laveur de microplaques automatique n'est pas utilisé.

#### **3. Spectrophotomètre de plaque micro-titre**

Lecteur avec une longueur d'onde de 620 nm et/ou 405 nm, et une échelle d'absorbance de 0 à 3.0.

#### **4. Pipettes de Précision**

Elle doivent être avec des pointes jetables en plastique, pour la distribution de volumes de l'ordre du micro litre et du millilitre. Une pipette à 8 canaux ou une pipette distributrice, avec des pointes jetables en plastique, pour la délivrance de 100 µl, est utile mais pas essentiel.

#### **5. Eau Distillée ou Désionisée**

Pour la préparation de la Solution de Lavage.

## **Notes de Procédure**

1. Une parfaite compréhension de la Notice est nécessaire pour assurer un usage correct du Kit CanAg AFP EIA. Les Réactifs livrés dans le Kit en font partie intégrante et ne peuvent être utilisés séparément. Ne pas mélanger des Réactifs identiques venant de Kit ayant un numéro de lot différent. Ne pas utiliser les Réactifs du Kit après la date d'expiration imprimée à l'extérieur de la boîte de Kit.
2. Les Réactifs doivent atteindre la température ambiante (+20°/+25°C) avant utilisation. Le Test doit seulement être réalisé à des températures comprises entre +20° et +25°C, pour obtenir des résultats précis. Les échantillons congelés doivent être amenés à température ambiante lentement et doivent être agités, doucement mais complètement, après décongélation.

3. Avant de commencer à pipeter, les Calibreurs et les échantillons de Patients, il est recommandé de marquer les barrettes pour faire en sorte d'identifier clairement les échantillons pendant et après le Test.
4. La condition d'un lavage efficace et poussé requise pour séparer l'antigène et les réactifs liés et non liés des complexes anticorps-antigène liés en phase solide représente l'une des étapes les plus importantes d'un dosage immunoenzymatique. Afin d'assurer un lavage efficace, assurez-vous que : tous les puits sont complètement remplis de solution de lavage pendant chaque cycle de lavage, jusqu'à ras bord ; que la solution de lavage est distribuée à un débit approprié ; que l'aspiration des puits entre et après les cycles de lavage est bien complète ; et que les puits sont bien vides. Si du liquide reste, renversez la plaque et tapotez légèrement dessus contre du papier absorbant.
  - Dispositif automatique de lavage de barrette : suivez les instructions du fabricant pour un nettoyage et un entretien diligents des barrettes et pour connaître le nombre de cycles de lavage requis avant et après chaque étape d'incubation. Il est vivement recommandé de suivre le mode processuel de barrette ou le mode de lavage en trop-plein avec un volume de 800 µL. Le dispositif d'aspiration/lavage ne doit pas rester avec de la solution de lavage sur des intervalles de temps prolongés parce que les aiguilles pourraient se boucher, ce qui aurait pour résultat une baisse de la distribution et de l'aspiration de liquide.
5. Le Substrat-HRP TMB est très sensible à la contamination. Pour une stabilité optimale du Substrat-HRP TMB, transférer la quantité requise du flacon dans un récipient délicatement lavé ou préférablement dans un bac jetable en plastique pour éviter la contamination du Réactif. S'assurer de l'utilisation de pipettes à pointes en plastique, propres et jetables (ou d'une pipette distributrice à pointes).
6. S'assurer de l'utilisation d'une pipette à pointes en plastique, propres et jetables, et d'une technique de pipetage correcte lors de la manipulation des échantillons et des Réactifs. Eviter de passer au-dessus de la plaque, en maintenant l'embout de pipette légèrement au-dessus du haut du puits et éviter de toucher la barrette plastique ou la surface du liquide.  
Une technique de pipetage correcte est d'une importance particulière lorsque l'on manipule la Solution de Substrat-HRP TMP.

---

#### **Préparation des Réactifs**

#### **Stabilité des Réactifs préparés**

---

##### **Solution de Lavage**

2 semaines à +2°/+25°C  
en conteneur fermé

Transférer 50 ml de Solution de Lavage Concentrée dans un conteneur propre et diluer 25 fois en ajoutant 1200 ml d'eau Distillée ou Désionisée pour obtenir la Solution de Lavage tamponnée.

---

##### **Solution d'Anticorps**

3 semaines à +2°/+8°C

Préparer la quantité requise de Solution d'Anticorps en mélangeant 50 µl de Traceur, HRP Anti-AFP avec 1 ml de Biotine Anti-AFP par barrette (voir le tableau ci-dessous et la Feuille de Protocole ).

N° de Barrettes	Traceur, HRP Anti-AFP (µl)	Biotine Anti-AFP (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

S'assurer de l'utilisation d'un flacon propre en plastique ou en verre, pour la préparation de la Solution d'Anticorps.

**Alternative:** Transférer le contenu de Traceur, HRP Anti-AFP, dans le flacon de Biotine Anti-AFP et mélanger doucement. S'assurer que tout le Traceur, HRP Anti-AFP est transféré dans le flacon de Biotine Anti-AFP.

**Note:** La Solution d'Anticorps est stable pendant 3 semaines à +2°/+8°C. Ne pas préparer plus de Solution d'Anticorps qu'il ne pourra en être utilisé pendant cette période et s'assurer qu'elle sera conservée correctement.

### Procédure de test

Réaliser chaque détermination en double pour à la fois les Calibreurs, les Contrôles et les échantillons de patients. Une courbe de calibrage doit être réalisée pour chaque Test. Tous les Réactifs et les échantillons doivent être amenés à température ambiante (+20°/+25°C) avant utilisation.

1. Commencer par la préparation de la Solution de Lavage et de la Solution d'Anticorps. Il est important d'utiliser des conteneurs propres et de suivre les Instructions soigneusement.
2. Transférer le nombre requis de barrettes de plaque micro-titre (Remettre immédiatement le reste de barrettes dans le sachet d'aluminium contenant un déshydratant et ressouder soigneusement). Laver chaque barrette une fois avec la Solution de Lavage. Ne pas laver plus de barrettes qu'il ne peut en être manipulé pendant 30 mn.
3. Pipeter 25 µl de Calibreurs AFP (CAL 0, 5, 25, 100, 250, 500), de Contrôles (C1, C2) et d'échantillons de Patients (inconnus-Inc.) dans les puits des barrettes, suivant le schéma ci-dessous:

	1	2	3	4	5	6	7 etc
A	Cal 0	Cal 250	Inc1				
B	Cal 0	Cal 250	Inc1				
C	Cal 5	Cal 500	Inc2				
D	Cal 5	Cal 500	Inc2				
E	Cal 25	C1	Etc.				
F	Cal 25	C1					
G	Cal 100	C2					
H	Cal 100	C2					

4. Ajouter 100 µl de Solution d'Anticorps à chaque puits, en utilisant une pipette de précision 100 µl (ou une pipette de précision, 100 µl, à 8 canaux). Eviter de passer au-dessus de la plaque, en maintenant l'embout de pipette légèrement au-dessus du haut du puits et éviter de toucher la barrette plastique ou la surface du liquide.
5. Incuber le portoir à barrettes pendant 1 heure ( $\pm 5$  mn) à température ambiante ( $+20^{\circ}/+25^{\circ}\text{C}$ ) avec une agitation constante de la plaque à l'aide d'un agitateur à plaque micro-titre.
6. Laver chaque barrette 6 fois, en utilisant la procédure décrite dans les Notes de Procédure, §4.
7. Ajouter 100 µl de Substrat-HRP TMB à chaque puits en utilisant la même procédure de pipetage que dans le paragraphe 4 ci-dessus. Le Substrat-HRP TMB doit être ajouté aux puits, le plus vite possible et le temps entre les additions, du premier au dernier puits, ne doit pas dépasser 5mn.
8. Incuber pendant 30 mn ( $\pm 5$  mn) à température ambiante avec une agitation constante. Eviter l'exposition directe à la lumière du jour.
9. Lire l'absorbance à 620 nm, immédiatement, dans un Spectrophotomètre pour plaque micro-titre.

### Option

Si le Laboratoire n'a pas accès à un Spectrophotomètre pour plaque micro-titre capable de lire à 620 nm, l'absorbance peut être déterminée comme suit:

- Alt. 9.** Ajouter 100 µl de Solution d'Arrêt. Mélanger et lire l'absorbance à 405 nm dans un Spectrophotomètre pour plaque micro-titre, dans les 15 mn après l'addition de la Solution d'Arrêt.

### Intervalle de Mesure

Le test CanAg AFP EIA mesure des concentrations entre 0.5 et 500 µg/l. Si des concentrations en AFP en dehors de l'intervalle de mesure sont attendues, il est recommandé de diluer les échantillons avec sérum normal humain avant analyse. **Note:** Le sérum utilisé pour la dilution doit aussi être analysé pour déterminer la concentration endogène d'AFP (voir le paragraphe "Calcul des résultats").

### **Contrôle Qualité**

Les Contrôles 1 et 2, AFP, doivent être utilisés pour la validation des séries de Test. L'intervalle des résultats attendus est indiqué sur les étiquettes des flacons. Si les valeurs obtenues sont en dehors de l'intervalle spécifié, un contrôle complet des Réactifs et de la performance du Lecteur, doit être fait et les analyses répétées. Chaque Laboratoire doit, en plus, préparer ses propres groupes de sérum à différents niveaux. Ils doivent être utilisés comme contrôles internes pour assurer la précision du Test.

### **Matériel de Référence**

Le Premier Standard International, IS 72/225, doit être utilisé comme Standard de Référence.

Les valeurs des Calibreurs et Contrôles AFP, seront opposées à une série de Standards de Référence Maison, dont les valeurs sont traçables dans le Premier Standard International, IS 72/225 en utilisant le facteur de conversion 0.83, c'est à dire 1 µg/l correspond à 0.83 kIU/l .

### **CALCUL DES RESULTATS**

Si un Lecteur Spectrophotomètre pour plaque micro-titre, avec calcul des données intégré, est utilisé, se référer au Manual du Lecteur de plaque et créer un programme utilisant la concentration indiquée sur les étiquettes de chacun des Calibreurs AFP.

Pour un calcul automatique de résultats d'AFP, il est recommandé d'utiliser l'une ou l'autre des méthodes suivantes:

- La courbe de cannelure cubique correspond à la méthode. Le Calibreur 0, doit être inclus dans la courbe avec la valeur 0 µg/l.
- La courbe lissée de la cannelure correspond à la méthode. Le Calibreur 0, doit être utilisé comme témoin blanc.
- Interpolation avec une évaluation point par point. Le Calibreur 0, doit être inclus dans la courbe avec la valeur 0 µg/l.
- La courbe quadratique correspond à la méthode. Le Calibreur 0, doit être inclus dans la courbe avec la valeur 0 µg/l.

**Note:** Les méthodes, 4-paramétrique ou de régression linéaire, ne doivent pas être utilisées.

Pour une évaluation manuelle, une courbe de calibrage est construite en mettant sous forme graphique les valeurs d'absorbance(A) obtenues pour chaque Calibreur AFP, contre les concentrations correspondantes en AFP (en µg/l), voir le graphique ci-dessous. Les concentrations inconnues en AFP peuvent alors être lues, sur la courbe de calibrage en utilisant la valeur moyenne de chaque échantillon de Patients.

Si les échantillons, d'une analyse initiale, donnent des niveaux d'AFP plus haut que 500 µg/l, ils doivent être dilués au 1/10 et 1/100 avec du sérum normal humain et réanalysés pour obtenir la concentration précise en AFP.

**Note:** Les échantillons utilisés pour la dilution doivent être aussi analysés pour déterminer la concentration endogène en AFP.

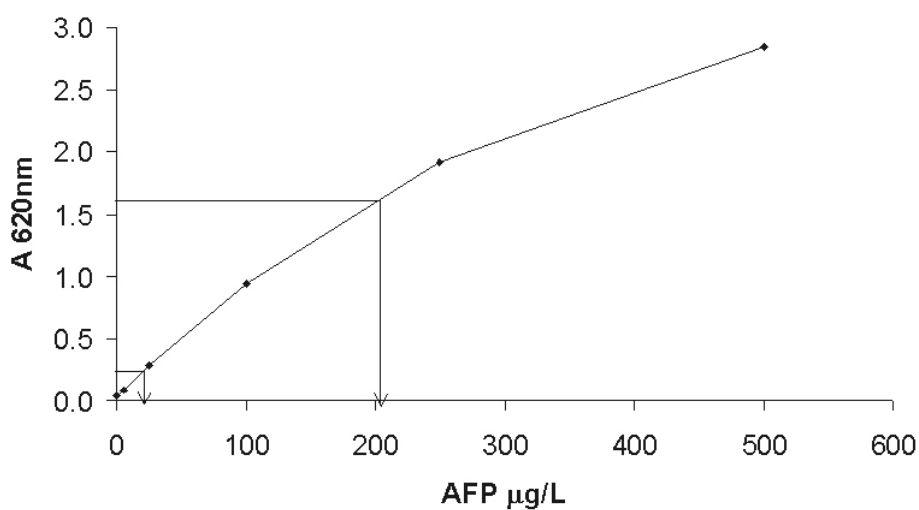
La concentration en AFP, des échantillons non dilués, est calculée comme suit:

$$\text{Dilution au 1/10: } 10 \times ([\text{AFP}]_{\text{Echantillon dilué}} - (0.9 \times [\text{AFP}]_{\text{Sérum normal}}))$$

$$\text{Dilution au 1/100: } 100 \times ([\text{AFP}]_{\text{Echantillon dilué}} - (0.99 \times [\text{AFP}]_{\text{Sérum normal}}))$$

### Exemple de résultats

Calibres et Échantillons			Valeurs pour les Calibres	Valeur moyenne d'absorbance (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	
Echantillon A				0.220	19.4
Echantillon B				1.686	208



*Exemple: (Ne pas utiliser cette courbe ou le tableau ci-dessus, pour déterminer les résultats de Test actuels).*

## LIMITES DE LA PROCEDURE

Le niveau d'AFP ne doit pas être utilisé comme évidence absolue de la présence ou de l'absence d'une maladie maligne, et le Test AFP ne doit pas être utilisé pour un dépistage du Cancer.

Les résultats du Test doivent être interprétés seulement en conjonction avec d'autres investigations et procédures, dans le diagnostic de maladie et la gestion des Patients, et le Test AFP ne doit pas remplacer un examen clinique établi.

Les Anticorps Anti-Réactifs (Anticorps humain anti-souris (HAMA) ou Anticorps hétérophiliques) dans les échantillons de Patients, peuvent interférer occasionnellement avec le Test, même si des agents bloquants spécifiques sont inclus dans la tampon.

## VALEURS ATTENDUES

L'AFP est mesuré sur 40 hommes apparemment sains et 93 femmes apparemment saines. La valeur moyenne obtenue est 2.8 µg/l avec une Déviation Standard de 2.6. Les plus bas et les plus haut extrêmes de l'intervalle normal sont examinés en utilisant, IFCC, traitement statistique non paramétrique recommandé. L'intervalle de référence contient 95% de la fraction centrale de la distribution de référence. Les limites de référence doivent, suivant cela, être estimées comme les 2.5% (+bas) et 97.5% (+haut) fractiles. Ces limites isolent une fraction de 2.5% des valeurs dans chaque queue de la distribution référence. Des estimations non-paramétriques donnent:

Fraction	Limite de référence (µg/l)	90 % Intervalle de confiance
2.5 <sup>th</sup> (+bas)	0.1	0.0–0.3
97.5 <sup>th</sup> (+haut)	10	8.7–14.6

Il est recommandé à chaque Laboratoire d'établir leur propre intervalle normal pour prendre en compte les facteurs environnementaux locaux comme le régime alimentaire, le climat, les conditions de vie, la sélection de Patients, etc. Comme le niveau d'AFP a montré une augmentation en fonction de l'âge, l'utilisation d'un intervalle de référence spécifique à l'âge a été suggérée (2, 3). Aussi, il ne doit pas être oublié que la base propre des résultats individuels de Patients donne le meilleur point de référence pour l'interprétation des résultats du marqueur (3, 4).

## CARACTERISTIQUE DE LA PERFORMANCE

### Précision

La précision totale est déterminée suivant la Directive EP5-A (6) de NCCLS, en utilisant quatre niveaux de sérum congelés contenant de l'AFP additionnée et neuf combinaisons de Réactifs de Kit CanAg AFP EIA différents. Chaque échantillon est pipeté au hasard (n = 2 / analyse) et analysé deux fois par jours pendant 20 jours.

Echantillon	Répliques	Moyenne (µg/l)	Série SD (µg/l)	Série CV %	Entre-jour SD (µg/L)	Entre-jour CV %
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

### Limite de Détection

La limite de détection du Test CanAg AFP EIA est  $\leq 0.5$  µg/l définis comme la concentration correspondant à la moyenne des valeurs d'absorbance du Calibreur 0, de l'AFP, plus 2 Déviations Standards suivant la formule:

$$\frac{2 \times \text{SD CAL 0}}{\text{OD CAL 5} - \text{OD CAL 0}} \times 5 \mu\text{g/l}$$

### Récupération

Des échantillons de sérum, pointus, sont préparés en ajoutant, des aliquotes d'un échantillon ayant une concentration très élevée en AFP, à des échantillons de sérum normal. La récupération de l'Antigène ajouté est dans l'intervalle 90 – 106%.

**Note:** Les études de récupération **ne doivent pas** être faites en utilisant les Calibreurs de Kit.

### Effet Crochet

Il n'a pas été observé d'effet crochet pour des échantillons ayant des concentrations allant jusqu'à 40 000 µg/L. Cependant, du fait que les patients avec carcinome hépatocellulaire avancé peuvent présenter des taux extrêmement élevés, des résultats faussement bas dus à un effet crochet à concentration élevée peuvent être relevés dans les échantillons de ces patients. Afin de ne pas présenter de résultats faussement bas suite à un effet crochet à concentrations élevées, en particulier chez des patients pour lesquels les marqueurs sont mesurés pour la première fois ou lorsque des valeurs AFP très élevées sont prévisibles, il est recommandé de tester les échantillons à deux dilutions (c'est-à-dire pur et dilué à 1:100 avec sérum humain normal).

### Linéarité

Les échantillons de Patients sont dilués avec du sérum normal humain et analysés. Les valeurs obtenues sont dans l'intervalle  $\pm 10$  % des valeurs attendues.

### Spécificité

Le Test CanAg AFP EIA est basé sur deux Anticorps monoclonaux de souris, AFPK51 et AFPK57, visant deux déterminants antigéniques séparés sur la molécule AFP (5). La Directive EP7- P de NCCLS (7) est utilisée pour déterminer les sources possibles d'interférence.

Les substances suivantes, avec leurs concentrations respectives, sont testées et trouvées comme n'interférant pas avec le Test.

	Concentration n'ayant pas d'interférence significative (+/-10%)
Lipémie (Intralipid®)	10 mg/ml
Bilirubine, non conjuguée	0.6 mg/ml
Hémoglobine	2 mg/ml

## GARANTIE

Les données de performance, présentées ici, sont obtenues en utilisant la procédure du Test décrite. Tout changement ou modification de la procédure, non recommandé par Fujirebio Diagnostics, peut affecter les résultats, dans ce cas, Fujirebio Diagnostics rejette toutes les garanties explicites, implicites ou incluant statutairement la garantie implicite de commercialisation et d'adaptation à l'utilisation.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

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 Alfthan, 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 Bormer, 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® est une Marque Déposée de Fujirebio Diagnostics AB

Fujirebio Diagnostics AB  
Elof Lindälvs gata 13  
SE-414 55 Göteborg  
Sweden  
Phone + 46 31-85 70 30  
Fax + 46 31-85 70 40  
info@fdab.com  
www.fdab.com

