



CanAg AFP EIA

REF. 600-10

IVD

CE

Istruzioni per l' 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	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/Użyć 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/
Sarzs szám/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/Bijoloogik riskler

ORIG HUM

Human/С човешки произход/Lidské/
 Humant/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/Мыši/
 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/
 Från 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/Från ko/Hovädzie/Govejega
 izvora/Rogate krupne stoke/Bovin



Reconstitute with/Разтваряне с/
 Rozředte pomocí/Rekonstituertes med/
 Rekonstituieren mit/Ανασύσταση με/
 Reconstituir con/Lahjendamine/
 Reconstituer avec/Rekonstituiraite s/
 Feloldáshoz/Ricostituire con/Atkurti,
 ištirpdant su/Atšķaidīt ar/Reconstitutie
 met/Rekonstituertes med/Odtworzyć
 za pomocą/Reconstituir com/A
 se reconstitui cu/Растворить в/
 Rekonstituera med/Rozriedte 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

Istruzioni per l'uso

Dosaggio immunoenzimometrico

96 tests

FINALITA' DEL DOSAGGIO

Il kit CanAg AFP è finalizzato alla determinazione quantitativa dell' alfa-Fetoproteina (AFP) in siero umano.

INTRODUZIONE

L' alfa-Fetoproteina, equivalente fetale dell'albumina, è una proteina di 67 kDa prodotta durante lo sviluppo embrionale e presente ad alta concentrazione nel siero fetale e nel liquido amniotico. Nella popolazione normale adulta non gravidal'alfa-Fetoproteina è presente a basse concentrazioni nel siero. Tuttavia la concentrazione di AFP può sensibilmente aumentare in pazienti affetti da tumore del fegato, del testicolo e dell'ovaio.

La determinazione quantitativa dell'alfa-Fetoproteina è utile nel monitoraggio dei pazienti con tumore epatico diagnosticato o sospetto e nei casi di tumore delle cellule germinali del testicolo o dell' ovaio (1, 2).

PRICIPIO DEL DOSAGGIO

Il metodo utilizzato dal kit CanAg AFP EIA è di tipo fase solida, sandwich diretto non competitivo. I calibratori, i controlli ed i campioni vengono incubati in pozzetti sensibilizzati con streptavidina, unitamente ad anticorpi monoclonali anti-AFP biotinilati ed anticorpi monoclonali anti-AFP marcati con Perossidasi di rafano (HRP). Dopo il lavaggio il reattivo tamponato Substrato/Cromogeno (perossido d' idrogeno e 3, 3', 5, 5' tetra-metilbenzidina) viene dispensato in tutti i pozzetti attivando in tal modo la reazione enzimatica . Durante la reazione enzimatica si sviluppa una colorazione blu nel caso l'antigene sia presente. L'intensità del colore sviluppato è proporzionale alla concentrazione di AFP presente nei campioni.

L'intensità del colore viene misurata per mezzo di un lettore spettrofotometrico di micropiastre alla lunghezza d'onda di 620nm (oppure a 405 nm dopo l'aggiunta del Reattivo Bloccante). Le curve di calibrazione vengono estrapolate dai valori di assorbanza ottenuti alla concentrazione di ogni calibratore e su di esse viene misurata la concentrazione di AFP presente nei campioni.

REATTIVI

- Ogni kit CanAg AFP EIA contiene reattivi sufficienti per eseguire 96 dosaggi
- La data di scadenza è specificata sull'etichetta posta sull'esterno della scatola del kit
- Non usare il prodotto oltre la data di scadenza
- Non mescolare reattivi provenienti da kit di lotti diversi
- Conservare i kit a 2-8°C. Non congelare

- I reattivi una volta aperti sono stabili alle condizioni descritte nella tabella che segue, a condizione che non siano contaminati, vengano conservati nei flaconi originali opportunamente chiusi e manipolati come prescritto. Riportare i reattivi a 2-8°C immediatamente dopo l'uso.

Componenti	Quantità	Stabilità e conservazione dopo apertura
------------	----------	---

MICROPLA		
Micropiastra sensibilizzata	1 Piastra	2-8°C fino alla scadenza riportata sulla Piastra

12x8 pozzetti a frattura predeterminata sensibilizzati con streptavidina. Dopo l'apertura rimettere immediatamente le strips non usate nell'apposita busta di alluminio contenente l'essiccatore e richiudere accuratamente in modo tale da conservare in ambiente asciutto.

AFP Calibratori	6 flaconi	2-8°C fino alla scadenza riportata sui flaconi
-----------------	-----------	--

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 umana è conservata in soluzione salina tamponata con Tris- Hcl con sieralbumina bovina, un colorante giallo inerte e lo 0.01% di metil-isotiazolone (MIT) come conservante. Pronto all'uso.

Componenti	Quantità	Stabilità e conservazione dopo apertura
-------------------	-----------------	--

AFP Controlli	2 flaconi	2-8°C fino alla scadenza riportata sui flaconi
---------------	-----------	--

CONTROL AFP 1	1 x 0.75 mL	
--	-------------	--

CONTROL AFP 2	1 x 0.75 mL	
--	-------------	--

AFP umana è conservata in soluzione salina tamponata con Tris- Hcl con sieralbumina bovina e lo 0.01% di metil-isotiazolone (MIT) come conservante. Pronto all'uso.

BIOTIN Anti-AFP		
---------------------------------	--	--

Biotina Anti-AFP	1 x 15 mL	2-8°C fino alla scadenza riportata sul flacone
------------------	-----------	--

Biotina Anti – AFP anticorpo monoclonale murino, approssimativamente 1 µg/mL. Contiene soluzione salina tamponata con Tampone Fosfato (pH 7.2), sieralbumina bovina, immunoglobina bovina, agenti bloccanti, Tween 20, un colorante blu inerte e lo 0.01% di metil-isotiazolone (MIT) come conservante. Mescolare con il Tracciante HRP anti-AFP prima dell'uso.

CONJ Anti-AFP		
-------------------------------	--	--

Tracciante, HRP Anti-AFP	1 x 0,75 mL	2-8° C fino alla scadenza riportata sul flacone
--------------------------	-------------	---

Soluzione stock di HRP Anti-AFP anticorpo monoclonale murino, approssimativamente 20 ug/ml. Contiene lo 0.02% conservanti. Mescolare con Biotina anti-AFP prima dell'uso.

SUBS TMB		
--------------------------	--	--

TMB HRP- Substrato	1 x 12 mL	2 – 8°C fino alla scadenza riportata sul flacone
---------------------------	-----------	--

Contiene perossido d'idrogeno tamponato 3, 3', 5, 5' tetrametilbenzidina (TMB). Pronto all'uso.

Componenti	Quantità	Stabilità e conservazione dopo apertura
------------	----------	---

STOP

Reattivo Bloccante	1 x 15 mL	2-8°C fino alla scadenza riportata sul flacone
--------------------	-----------	---

Contiene 0.12 M HCl. Pronto all'uso

WASHBUF 25X

Tampone Lavaggio Concentrato	1 x 50 mL	2-8°C fino alla scadenza riportata sul flacone
------------------------------	-----------	---

Soluzione tampone Tris-HCl con Tween 20. Contiene Germall II come conservante. Diluire con acqua distillata x 25 prima dell' uso.

Indicatori di instabilità

La soluzione TMB HRP-substrato deve essere incolore o al massimo leggermente azzurra. Una intensa colorazione blu significa che il reattivo è stato contaminato e pertanto non deve essere usato.

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

Per uso diagnostico in vitro

- Solamente per uso professionale
- Come riferimento si consiglia la pubblicazione No. (CDC) 88-8395 del US Department of Health and Human Service o qualsiasi altro regolamento locale o nazionale relativo alle Norme di Sicurezza da seguire nei Laboratori Diagnostici
- Manipolare i campioni dei pazienti come potenzialmente infetti
- Seguire le normative vigenti relative all'eliminazione del materiale usato

Precauzioni

Il materiale usato nella preparazione dei reattivi di origine umana è stato testato e trovato Non Reattivo per l'anticorpo anti-HIV 1-2, per l'anticorpo anti-HCV e per l'antigene di superficie dell'Epatite B (HbsAg). Tuttavia poichè nessun metodo diagnostico è in grado di escludere completamente la possibilità di trasmissione di infezioni attraverso il sangue si consiglia di manipolare questi reattivi di origine umana come potenzialmente infettivi.

PRELIEVO E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Il kit CanAg AFP EIA richiede l'uso di campioni di siero umano. Prelevare il sangue per via venosa e separare il siero seguendo le normali procedure. I campioni si possono conservare a 2-8°C per 2 giorni. Per periodi più lunghi conservare i campioni ad almeno -20°C. Evitare il scongelamento ed il ricongelamento ripetuto dei campioni. Effettuare lo scongelamento lentamente a 2-8°C durante la notte e portare quindi i campioni a temperatura ambiente prima del dosaggio.

PROCEDIMENTO OPERATIVO

Materiali richiesti per il dosaggio ma non forniti con il kit

1. Agitatore di micropiastre

L'agitazione va effettuata con modalità mediamente vigorose. L'agitazione longitudinale deve essere tarata sulle 200 rotazioni/min e 700-900 oscillazioni/min.

2. Lavatore di micropiastre

Lavatore di micropiastre automatico in grado di effettuare da 1 a 6 cicli di lavaggio o lavatore di micropiastre semiautomatico collegato ad una pompa a vuoto od aspiratore collegato ad una pompa a vuoto con contenitore per i liquidi aspirati. Si consiglia il lavatore di strip manuale Nunc Immuno-8 nel caso che un lavatore di micropiastre automatico non sia disponibile.

3. Spettrofotometro per micropiastre

Lettore spettrofotometrico con lunghezza d'onda a 620nm e/o 405nm ed un intervallo di assorbanza da 0 a 3.0.

4. Pipette di precisione

Con puntali a gettare in grado di dispensare millilitri. Utili ma non indispensabili per dispensare 100 µl sono le pipette a 8 canali o le pipette graduate con puntali di plastica a gettare.

5. Acqua distillata o deionizzata

Per la preparazione della soluzione di lavaggio diluita.

NOTE

1. La comprensione globale di questo libretto d'istruzioni garantisce l'uso appropriato del kit CanAg AFP EIA. I reattivi forniti col kit devono essere usati come una unità integrale. Non mescolare reattivi di kits con differente numero di lotto. Non usare i reattivi dopo la data di scadenza indicata sull'esterno della scatola del kit.
2. Portare i reattivi a temperatura ambiente (20-25°C) prima dell'uso. Il dosaggio deve essere effettuato ad una temperatura compresa tra 20-25° C per ottenere risultati accurati. I campioni congelati devono essere gentilmente ma accuratamente mescolati dopo il scongelamento.
3. Prima di dispensare i calibratori ed i campioni dei pazienti è consigliabile segnare le strip in modo tale da poterle facilmente identificare durante e dopo il dosaggio.
4. Un lavaggio efficace per la separazione dei reagenti legati e non legati dal complesso antigene-anticorpo adsorbito in fase solida è uno dei requisiti più importanti in un test EIA. Per garantire un lavaggio efficiente, occorre accertare che: in ogni ciclo di lavaggio tutti i pozzetti siano completamente riempiti fino al bordo superiore dalla soluzione di lavaggio; la soluzione di lavaggio sia dispensata con un flusso appropriato; l'aspirazione del liquido nei pozzetti, tra e dopo ogni ciclo di lavaggio, sia completa e che i pozzetti siano perfettamente asciutti. Nel caso in cui rimanga del liquido residuo sul fondo dei pozzetti, capovolgere la micropiastra, premendola con cura contro della carta assorbente.
 - Lavaggio automatico: Seguire le istruzioni del produttore per una accurata pulizia e manutenzione ed effettuare il numero richiesto di cicli di lavaggio prima e dopo ogni incubazione. Si raccomanda vivamente di utilizzare la modalità di trattamento delle strip e la modalità di lavaggio overflow con un volume di dispensazione di 800 µL. Il sistema di lavaggio ed aspirazione non va lasciato per lunghi periodi a contatto della soluzione di lavaggio, altrimenti si rischia l'intasamento degli ugelli e quindi una dispensazione e un'aspirazione insufficienti.
5. Il TMB HRP-Substrato è molto sensibile alla contaminazione. Per garantire una stabilità ottimale del TMB HRP-Substrato versare la quantità necessaria dal flacone in un contenitore accuratamente pulito o preferibilmente in una vaschetta di plastica monouso in modo da evitare la contaminazione del reattivo. Usare puntali di plastica puliti monouso (o puntali di pipetta graduata).
6. Assicurarsi di usare pipette con puntali di plastica monouso ed un appropriata tecnica di pipettamento manipolando campioni e reattivi. Tenere il puntale della pipetta leggermente al di sopra del bordo superiore del pozzetto, evitando di toccare la plastica della strip o la superficie del liquido per non provocare contaminazione fra i pozzetti (carry over). Un appropriata tecnica di pipettamento è particolarmente importante quando si maneggia il TMB HRP-Substrato.

Preparazione dei reattivi**Stabilità dei reattivi ricostituiti**

Soluzione Lavaggio

2 settimane a 2-25°C

in un contenitore accuratamente chiuso

Versare 50 mL di Tampone Lavaggio concentrato in un contenitore pulito e diluire x25 aggiungendo 1200 mL di acqua distillata o deionizzata ottenendo in tal modo una Soluzione Lavaggio tamponata

Preparazione dei reattivi**Stabilità dei reattivi ricostituiti**

Soluzione Anticorpi

3 settimane a 2-8°C

Preparare la quantità necessaria di Soluzione Anticorpi mescolando 50 µL di Tracciante, HRP Anti-AFP con 1 mL di Biotina Anti-AFP per strip (vedi la tabella sottostante ed il Protocollo Analitico)

No. di Strips	Tracciante, HRP Anti-AFP (µL)	Biotina 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

Assicurarsi di usare un flacone di plastica o di vetro pulito per la preparazione della Soluzione Anticorpi

Alternativa: Versare il contenuto del flacone del Tracciante, HRP Anti-AFP nel flacone di Biotina Anti-AFP e mescolare gentilmente. Assicurarsi che tutto il contenuto del flacone del Tracciante, HRP Anti-AFP sia stato effettivamente trasferito in quello del Diluente della Biotina Anti-AFP.

NOTA: la Soluzione Anticorpi è stabile per 3 settimane a 2-8°C. Non preparare più Soluzione Anticorpi del necessario ed assicurarsi che venga conservata correttamente.

Procedimento Analitico

Eseguire in duplicato il dosaggio dei calibratori, dei controlli e dei campioni. Eseguire una curva di calibrazione per ogni seduta analitica. Tutti i reattivi ed i campioni devono essere portati a temperatura ambiente (20-25°C) prima di eseguire il dosaggio.

1. Iniziare a preparare la Soluzione Lavaggio e la Soluzione Anticorpi. E' importante usare contenitori puliti. Seguire attentamente le istruzioni.
2. Trasferire il numero necessario di strips nell'apposito supporto (riporre immediatamente le restanti strips nella busta di alluminio contenente un essiccante e sigillare attentamente). Lavare ogni strip una volta con la Soluzione Lavaggio. Non lavare un numero maggiore di strips di quelle che possono essere usate in 30 minuti.
3. Pipettare 25µL dei calibratori AFP (CAL 0, 5, 25, 100, 250, 500), dei controlli (C1, C2) e dei campioni diluiti (Unk) nei pozzetti seguendo lo schema sottoindicato:

	1	2	3	4	5	6	7 etc
A	Cal 0	Cal 250	Unk1				
B	Cal 0	Cal 250	Unk1				
C	Cal 5	Cal 500	Unk2				
D	Cal 5	Cal 500	Unk2				
E	Cal 25	C1	Etc.				
F	Cal 25	C1					
G	Cal 100	C2					
H	Cal 100	C2					

4. Aggiungere 100 µL di Soluzione Anticorpi ad ogni pozzetto usando una pipetta di precisione da 100 µL (od una pipetta di precisione da 100µL ad 8 canali) Tenere il puntale della pipetta leggermente al disopra del bordo superiore del pozzetto, evitando di toccare la plastica della strip o la superficie del liquido per evitare la contaminazione (carry over).
5. Incubare il supporto contenente le strips per 1 ora (± 5 min) a temperatura ambiente (20-25°C) agitando in continuazione con un agitatore per micropiastre.
6. Dopo la prima incubazione aspirare e lavare ogni strip 6 volte usando la stessa procedura di lavaggio descritta nelle note Procedurali al punto 4.
7. Aggiungere 100 µL di TMB HRP Substrato ad ogni pozzetto usando la stessa procedura descritta al punto 4. Il TMB HRP Substrato deve essere dispensato nei pozzetti il più velocemente possibile ed il tempo di dispensazione fra il primo e l'ultimo pozzetto non deve superare i 5 minuti.
8. Incubare per 30 min (± 5 min) a temperatura ambiente con costante agitazione. Evitare l'esposizione diretta alla luce del sole.

9. Leggere subito l'assorbanza a 620nm usando uno spettrofotometro per micropiastre.

Opzione

Se uno spettrofotometro per micropiastre in grado di leggere a 620 nm non è disponibile in laboratorio la densità ottica può essere determinata come segue:

Alternativa 9: Aggiungere 100µL di Reattivo Bloccante, mescolare e leggere l'assorbanza a 405 nm con uno spettrofotometro per micropiastre entro 15 minuti dopo l'aggiunta del Reattivo Bloccante

Intervallo di misura

CanAg AFP EIA misura concentrazioni comprese fra 0,5 e 500 µg/L. Se si devono misurare concentrazioni di AFP superiori si raccomanda di diluire i campioni con siero umano normale prima del dosaggio. NOTA: Il siero usato per la diluizione deve anche essere testato per determinare la concentrazione di AFP endogena (vedi " Calcolo dei risultati").

Controllo di Qualità

I controlli AFP numero 1 e 2 possono essere usati per la validazione delle serie analitiche. Gli intervalli dei risultati attesi sono indicati sulle etichette dei flaconi. Se si ottengono valori al di fuori degli intervalli indicati, bisogna effettuare un controllo completo della funzionalità dei reattivi e del lettore e l'analisi deve essere ripetuta. Si raccomanda a tutti i laboratori di preparare i propri pool di sieri a diverse concentrazioni da usare come controlli interni per garantire la precisione del dosaggio.

Riferimenti

Il 1° Standard Internazionale IS 72/225 può essere usato come standard di riferimento. I valori dei Calibratori e dei Controlli per AFP sono stati definiti contro un set di standards di riferimento interni i cui valori sono correlabili a IS 72/225 usando il fattore di conversione 0.83, per cui 1 µg/L corrisponde a 0.83 kIU/L

CALCOLO DEI RISULTATI

Se viene usato uno spettrofotometro con procedimento di calcolo programmato consultarne il manuale e creare un programma usando le concentrazioni riportate sulle etichette di ogni calibratore AFP.

Per il calcolo automatico dei risultati AFP si raccomanda di usare uno dei seguenti metodi:

- Metodo di fitting con curva spline cubica : inserire il calibratore 0 nella curva col valore 0 µg/L
- Metodo di fitting con curva spline linearizzata. Usare il calibratore 0 come bianco della micropiastro
- Interpolazione con valutazione punto a punto. Il calibratore 0 deve essere incluso nella curva col valore 0 µg/L
- Metodo di fitting con curva quadratica. Il calibratore 0 deve essere incluso nella curva col valore 0 µg/L

Nota: Si sconsiglia di usare metodi di valutazione 4-parametrica o di regressione lineare.

Per la misurazione manuale la curva di calibrazione si traccia riportando su grafico lineare-lineare i valori di assorbanza (A) ottenuti per ogni calibratore AFP contro la corrispondente concentrazione di AFP espressa in µg/L (vedi figura). Le concentrazioni ignote di AFP possono quindi essere estrapolate dalla curva di calibrazione usando il valore medio di assorbanza di ogni campione

Se, ad una prima analisi, la concentrazione di AFP è superiore a 500 µg/L, i campioni devono essere diluiti 1/10 con siero umano normale e rianalizzati per ottenere una accurata concentrazione di AFP nei campioni.

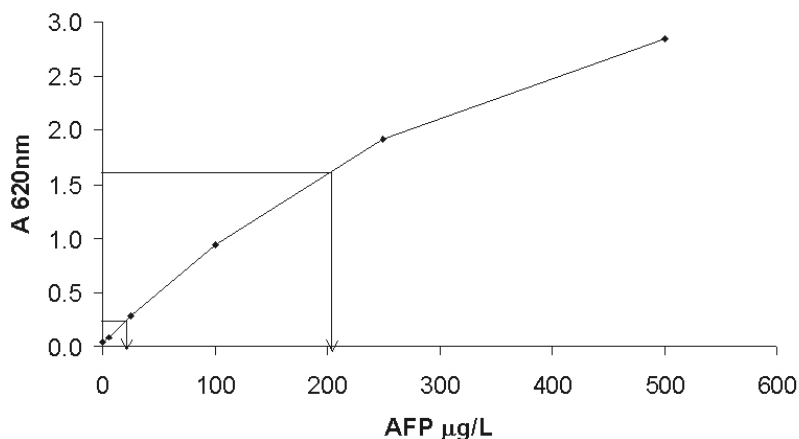
NOTA: il campione usato per la diluizione deve anche essere misurato per determinare la concentrazione di del AFP endogena.

La concentrazione di AFP nei campioni non diluiti viene calcolata come:

$$\text{Diluizione 1/10:} \quad 10 \times ([\text{AFP}]_{\text{Campione diluito}} - (0.9 \times [\text{AFP}]_{\text{Siero normale}}))$$

Esempio di risultati

Campioni	Valore dei Calibratori	Valore medio (A)	AFP U/mL
CAL AFP 0	0 µg/L	0.036	
CAL AFP 5	5 µg/L	0.083	
CAL AFP 25	25 µg/L	0.282	
CAL AFP 100	100 µg/L	0.938	
CAL AFP 250	250 µg/L	1.914	
CAL AFP 500	500 µg/L	2.854	
Specimen A		0.225	19.4
Specimen B		1.686	208



Esempio (non usare questa curva o la tabella sopra riportata per determinare veri risultati).

LIMITI DEL DOSAGGIO

La concentrazione di AFP non può essere intesa come evidenza assoluta della presenza o della assenza di patologia tumorale ed il dosaggio di AFP non deve essere usato per lo screening del tumore. I risultati del dosaggio sono interpretabili solo unitamente ad altri sistemi di investigazione della diagnosi della malattia ed il dosaggio di AFP non può sostituire altri metodi consolidati di valutazione clinica.

Anticorpi diretti contro agenti contenuti nei reattivi (anticorpi umani anti-topo (HAMA) od anticorpi eterofili) presenti nel siero dei pazienti possono occasionalmente interferire nel dosaggio, anche se specifiche sostanze bloccanti sono contenute nel tampone.

VALORI ATTESI

CanAg AFP EIA è stato dosato in 40 uomini e 40 donne apparentemente sani. Il valore medio ottenuto è stato 2.8 µg/L con una deviazione standard di 2.6. Gli estremi superiori ed inferiori dell'intervallo di normalità sono stati esaminati usando il modello statistico non parametrico raccomandato da IFCC.

L'intervallo di riferimento contiene il 95% della frazione centrale della distribuzione di riferimento. I limiti di riferimento possono quindi essere stimati al 2,5% (inferiore) ed al 97,5% (superiore) percentili. Questi limiti escludono una frazione del 2,5% dei valori di ogni coda della distribuzione di riferimento.

Stime non parametriche :

Frazione	Limite di riferimento (µg/L)	90% confidenza
2.5 th (inferiore)	0.1	0.0 – 0.3
97.5 th (superiore)	10	8.7 – 14.6

Si raccomanda ad ogni laboratorio di definire il proprio intervallo di normalità per tenere conto di fattori ambientali locali quali la dieta, il clima, le condizioni di vita, il criterio di scelta dei pazienti, ecc.

Poichè si è dimostrato che i valori di AFP aumentano con l'età si sono suggeriti intervalli di riferimento specifici per le varie età (2, 3)

E' opportuno inoltre considerare che l' anamnesi clinica del paziente rappresenta il più importante riferimento nell'interpretazione del valore del marcatore tumorale (3, 4).

PRESTAZIONI METODOLOGICHE

Precisione

La precisione totale è stata determinata in accordo con NCCLS direttiva EP5-A (6) usando quattro livelli di pool di sieri umani congelati con aggiunta di AFP e nove differenti combinazioni di reattivi CanAg AFP EIA.. Ogni campione è stato pipettato a caso (n=2/analisi) in ed analizzato due volte al giorno per 20 giorni consecutivi

Campioni	Replicati	Media (µg/L)	Intrasaggio SD (µg/L)	Intrasaggio CV %	Interdies SD (µg/L)	Interdies 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

Limiti del dosaggio

Il limite del dosaggio del kit CanAg AFP EIA is $\leq 0.5 \mu\text{g/L}$ definito come la concentrazione corrispondente alla media dei valori di assorbanza del calibratore 0 di AFP più due deviazioni standard secondo la formula

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

Recupero

Campioni di siero sono stati preparati aggiungendo aliquote di un campione con livelli elevati di APF a campioni di siero normali.

Il recupero dell'antigene aggiunto è stato nell'intervallo 90 – 106%. NOTA: gli studi di recupero non devono essere effettuati usando i calibratori del kit.

Effetto Gancio

Nessun effetto gancio si è verificato in campioni fino a 40000 µg/L. Ciò nonostante, poiché i pazienti con carcinoma epatocellulare in stato avanzato possono presentare livelli di AFP estremamente elevati, si registrano talvolta in questi casi valori erroneamente bassi a causa dell'effetto gancio che si verifica ad alte concentrazioni. Per evitare questo inconveniente si raccomanda, specialmente nei pazienti per i quali i

marcatori vengono determinati per la prima volta o laddove siano attesi valori elevati di AFP, di dosare i campioni a due diluizioni (es. siero intero e diluito 1:100 con siero umano normale).

Linearità

Campioni di pazienti sono stati diluiti con siero umano normale ed analizzati. I valori ottenuti si posizionavano nell'intervallo $\pm 10\%$ dei valori attesi.

Specificità

Il kit CanAg AFP EIA si basa su due anticorpi monoclonali di origine murina, AFPK51 e AFPK57 che si legano a due diversi determinanti antigenici sulla molecola di AFP (5). EP7-P (7) di NCCLS è stata seguita per determinare possibili fonti d'interferenza. Le seguenti sostanze sono state analizzate alle concentrazioni indicate e sono state trovate non interferenti nel dosaggio

	Concentrazione con interferenza non Significativa ($\pm 10\%$)
Lipemia (Intralipid®)	10 mg/mL
Bilirubina libera	0.6 mg/mL
Emoglobina	2 mg/mL

AVVERTENZE

I dati di funzionalità presentati sono stati ottenuti usando il procedimento analitico descritto in questo libretto d'istruzioni. Ogni variazione o modifica del procedimento analitico non indicato da Fujirebio Diagnostics può alterare i risultati. In questo caso Fujirebio Diagnostics non si assume alcuna delle responsabilità espresse, implicite o legali, inclusa la responsabilità implicita della commerciabilità e della proprietà d'uso.

REFERENCES

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. AACCC 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. AACCC 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 α -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[®] è un marchio registrato di 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

