

AFP-ELISA

KAPD1468



History

Summary of change :

Previous Version : 201221	Current Version : 230718
Old DiaSource logo	New DiaSource logo on the front page



AFP-ELISA

en

KAPD1468
IN VITRO DIAGNOSTIC USE

DIAsource ImmunoAssays SA - Rue du Bosquet 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium - Tel: +32 10 84 99 11 - Fax : +32 10 84 99 91

1 INTRODUCTION

1.1 Intended Use

The **DIAsource AFP ELISA** is an enzyme immunoassay for the quantitative *in vitro diagnostic* measurement of alpha fetoprotein (AFP) in serum. This kit is not intended to be used for the risk evaluation of trisomy 21.

1.2 Summary and Explanation

Alpha-fetoprotein (AFP) is a glycoprotein with a molecular weight of approximately 70 KD(1). AFP is normally produced during fetal and neonatal development by the liver, yolk sac, and in small concentrations by the gastrointestinal tract (2). After birth, serum AFP concentrations decrease rapidly, and by the second year of life and thereafter only trace amounts are normally detected in serum (3).

Elevation of serum AFP to abnormally high values occurs in several malignant diseases (4-7), most notably nonseminomatous testicular cancer and primary hepatocellular carcinoma. In the case of nonseminomatous testicular cancer, a direct relationship has been observed between the incidence of elevated AFP levels and the stage of disease (8-9). Elevated AFP levels have also been observed in patients diagnosed with seminoma with nonseminomatous elements, but not in patients with pure seminoma (6,8,10-11).

In addition, elevated serum AFP concentrations have been measured in patients with other noncancerous diseases, including ataxia telangiectasia, hereditary tyrosinemia, neonatal hyperbilirubinemia, acute viral hepatitis, chronic active hepatitis and cirrhosis (12-15). Elevated serum AFP concentrations are also observed in pregnant women (16-17). Therefore, AFP measurements are not recommended for use as a screening procedure to detect the presence of cancer in the general population.

2 PRINCIPLE OF THE TEST

The DIAsource AFP ELISA Kit is a solid phase enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) based on the sandwich principle.

The microtiter wells are coated with a monoclonal [mouse] antibody directed towards a unique antigenic site on an AFP molecule. An aliquot of patient sample containing endogenous AFP is incubated in the coated well with enzyme conjugate, which is an anti- AFP antibody conjugated with horseradish peroxidase. After incubation the unbound conjugate is washed off.

The amount of bound peroxidase is proportional to the concentration of AFP in the sample.

Having added the substrate solution, the intensity of colour developed is proportional to the concentration of AFP in the patient sample.

3 PRECAUTIONS

- This kit is for *in vitro* diagnostic use only. For professional use only.
- All reagents of this test kit which contain human serum or plasma have been tested and confirmed negative for HIV I/II, HBsAg and HCV by FDA approved procedures. All reagents, however, should be treated as potential biohazards in use and for disposal.
- Before starting the assay, read the instructions completely and carefully. Use the valid version of instructions for use provided with the kit. Be sure that everything is understood.
- The microplate contains snap-off strips. Unused wells must be stored at 2 °C - 8 °C in the sealed foil pouch and used in the frame provided.
- Pipetting of samples and reagents must be done as quickly as possible and in the same sequence for each step.
- Use reservoirs only for single reagents. This especially applies to the substrate reservoirs. Using a reservoir for dispensing a substrate solution that had previously been used for the conjugate solution may turn solution colored. Do not pour reagents back into vials as reagent contamination may occur.
- Mix the contents of the microplate wells thoroughly to ensure good test results. Do not reuse microwells.
- Do not let wells dry during assay; add reagents immediately after completing the rinsing steps.
- Allow the reagents to reach room temperature (21 °C - 26 °C) before starting the test. Temperature will affect the absorbance readings of the assay. However, values for the patient samples will not be affected.
- Never pipet by mouth and avoid contact of reagents and specimens with skin and mucous membranes.
- Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics in areas where specimens or kit reagents are handled.
- Wear disposable latex gloves when handling specimens and reagents. Microbial contamination of reagents or specimens may give false results.
- Handling should be done in accordance with the procedures defined by an appropriate national biohazard safety guideline or regulation.
- Do not use reagents beyond expiry date as shown on the kit labels.
- All indicated volumes have to be performed according to the protocol. Optimal test results are only obtained when using calibrated pipettes and microtiterplate readers.
- Do not mix or use components from kits with different lot numbers. It is advised not to exchange wells of different plates even of the same lot. The kits may have been shipped or stored under different conditions and the binding characteristics of the plates may result slightly different.
- Avoid contact with Stop Solution containing 0.5 M H₂SO₄. It may cause skin irritation and burns.
- Some reagents contain Proclin 300, BND and/or MIT as preservatives. In case of contact with eyes or skin, flush immediately with water.

- TMB substrate has an irritant effect on skin and mucosa. In case of possible contact, wash eyes with an abundant volume of water and skin with soap and abundant water. Wash contaminated objects before reusing them. If inhaled, take the person to open air.
- Chemicals and prepared or used reagents have to be treated as hazardous waste according to the national biohazard safety guideline or regulation.
- For information on hazardous substances included in the kit please refer to Safety Data Sheets. Safety Data Sheets for this product are available upon request directly from DIAsource ImmunoAssays SA.

4 KIT COMPONENTS

4.1 Contents of the Kit

1.

LIT

 12x8 (break apart) strips, 96 wells;
Wells coated with anti-AFP antibody (monoclonal).
 2.

CAL	N
-----	---

 N=1 to 4, 4 vials (lyophilized), 0.5 mL;
See exact values on the vial label
Conversion: 1IU/mL = 1,21ng/mL
The calibrators are calibrated against NIBSC 1st International Standard for Alphafoetoprotein AFP (AFP 1st IRP 72/225)
See "Preparation of Reagents";
* contain 0.03% Proclin 300, 0.015% BND and 0.010% MIT as a preservative.
 3.

CAL	0
-----	---

 Zero Calibrator, 1 vial (lyophilized), 0.5 ml
* contain 0.03% Proclin 300, 0.015% BND and 0.010% MIT as a preservative.
See „Preparation of Reagents“
 4.

Ab	HRP
----	-----

 Enzyme conjugate 1 vial, 11 mL, ready to use,
Anti-AFP antibody conjugated to horseradish peroxidase;
contains 0.03% Proclin 300 as a preservative.
 5.

CHROM	TMB
-------	-----

 Substrate solution 1 vial, 14 mL, ready to use,
Tetramethylbenzidine (TMB).
 6.

STOP	SOLN
------	------

 Stop solution 1 vial, 14 mL, ready to use,
contains 0.5M H₂SO₄,
Avoid contact with the stop solution. It may cause skin irritations and burns.
- * BND = 5-bromo-5-nitro-1,3-dioxane
MIT = 2-methyl-2H-isothiazol-3-one

Note: Additional *Calibrator 0* for sample dilution is available upon request.

4.1.1 Equipment and material required but not provided

- A microtiter plate calibrated reader (450 ± 10 nm)
- Calibrated variable precision micropipettes.
- Absorbent paper.
- Distilled water
- Timer
- Graph paper or software for data reduction

4.2 Storage and stability of the Kit

When stored at 2-8°C unopened reagents will retain reactivity until expiration date. Do not use reagents beyond this date.

Opened reagents must be stored at 2-8°C. Microtiter wells must be stored at 2-8°C. Once the foil bag has been opened, care should be taken to close it tightly again.

Opened kits retain activity for 9 weeks if stored as described above.

4.3 Preparation of Reagents

Allow all reagents and required number of strips to reach room temperature prior to use.

Calibrators

Reconstitute the lyophilized contents of the calibrator vial with 0.5 mL deionized water and let stand for 10 minutes in minimum. Mix several times before use.

Note: *The reconstituted calibrators are stable for 2 months at 2-8°C. For longer storage freeze at -20°C.*

4.4 Disposal of the Kit

The disposal of the kit must be made according to the national regulations. Special information for this product is given in the Material Safety Data Sheets.

4.5 Damaged Test Kits

In case of any severe damage of the test kit or components, DIAsource ImmunoAssays S.A. have to be informed written, at the latest one week after receiving the kit. Severely damaged single components should not be used for a test run. They have to be stored until a final solution has been found. After this, they should be disposed according to the official regulations.

5 SPECIMEN

Serum should be used in this assay.

NOTE: Samples containing sodium azide should not be used in the assay.

In general, it should be avoided to use haemolytic, icteric, or lipaemic specimens. For further information refer to chapter "Interfering Substances".

NOTE: If an amniocentesis is necessary the specimen collection has to be done before the puncture. After the amniotic puncture increased AFP values are determined.

5.1 Specimen Collection

Serum:

Collect blood by venipuncture (e.g. Sarstedt Monovette # 02.1388.001), allow to clot, and separate serum by centrifugation at room temperature. Do not centrifuge before complete clotting has occurred. Patients receiving anticoagulant therapy may require increased clotting time.

5.2 Specimen Storage

Specimens should be capped and may be stored for up to 7 days at 2-8°C prior to assaying.

Specimens held for a longer time should be frozen only once at -20°C prior to assay. Thawed samples should be inverted several times prior to testing.

5.3 Specimen Dilution

If in an initial assay, a specimen is found to contain more than the highest calibrator, the specimens can be diluted with *Calibrator 0* and reassayed as described in Assay Procedure.

For the calculation of the concentrations this dilution factor has to be taken into account.

Example:

- a) dilution 1:10: 10 µL Serum + 90 µL *Calibrator 0* (mix thoroughly)
- b) dilution 1:100: 10 µL dilution a) 1:10 + 90 µL *Calibrator 0* (mix thoroughly).

6 TEST PROCEDURE

6.1 General Remarks

- All reagents and specimens must be allowed to come to room temperature before use. All reagents must be mixed without foaming.
- Once the test has been started, all steps should be completed without interruption.
- Use new disposal plastic pipette tips for each calibrator, control or sample in order to avoid cross contamination
- Absorbance is a function of the incubation time and temperature. Before starting the assay, it is recommended that all reagents are ready, caps removed, all needed wells secured in holder, etc. This will ensure equal elapsed time for each pipetting step without interruption.
- As a general rule the enzymatic reaction is linearly proportional to time and temperature.

6.2 Assay Procedure

Each run must include a calibration curve.

1. Secure the desired number of Microtiter wells in the frame holder.
2. Dispense **25 µL** of each **Calibrator, Control** and **samples** with new disposable tips into appropriate wells.
3. Dispense **100 µL Enzyme Conjugate** into each well.
Thoroughly mix for 10 seconds. It is important to have a complete mixing in this step.
4. Incubate for **30 minutes** at room temperature.
5. Briskly shake out the contents of the wells.
Rinse the wells 5 times with distilled water (400 µL per well). Strike the wells sharply on absorbent paper to remove residual droplets.
Important note:
The sensitivity and precision of this assay is markedly influenced by the correct performance of the washing procedure!
6. Add **100 µL of Substrate Solution** to each well.
7. Incubate for **10 minutes** at room temperature.
8. Stop the enzymatic reaction by adding **50 µL of Stop Solution** to each well.
9. Determine the absorbance (OD) of each well at **450 nm (reading) and at 620 nm to 630 nm (background subtraction, recommended)** with a microtiter plate reader.
It is recommended that the wells be read **within 10 minutes** after adding the *Stop Solution*.

6.3 Calculation of Results

1. Calculate the average absorbance values for each set of calibrators, controls and patient samples.
2. Construct a calibration curve by plotting the mean absorbance obtained from each calibrator against its concentration with absorbance value on the vertical (Y) axis and concentration on the horizontal (X) axis.
3. Using the mean absorbance value for each sample determine the corresponding concentration from the calibration curve.
4. Automated method: The results in the IFU have been calculated automatically using a 4 PL (4 Parameter Logistics) curve fit. 4 Parameter Logistics is the preferred method. Other data reduction functions may give slightly different results.
5. The concentration of the samples can be read directly from this calibration curve. Samples with concentrations higher than that of the highest calibrator have to be further diluted. For the calculation of the concentrations this dilution factor has to be taken into account.

6.3.1 Example of Typical Calibration curve

The following data is for demonstration only and cannot be used in place of data generations at the time of assay.

Calibrator	Optical Units (450 nm)
Calibrator 0 (0 IU/mL)	0.07
Calibrator 1 (10 IU/mL)	0.21
Calibrator 2 (40 IU/mL)	0.69
Calibrator 3 (80 IU/mL)	1.29
Calibrator 4 (160 IU/mL)	1.97

7 EXPECTED VALUES

It is strongly recommended that each laboratory should determine its own normal and abnormal values.

In a study conducted using the DIAsource AFP ELISA the following values are observed:

7.1 Normal healthy adults, non-pregnant

The lower limit of AFP concentration in normal serum is less than 1 IU/mL; the upper limit is about 10 IU/mL.

7.2 Values during pregnancy

Weeks of pregnancy	AFP [IU/mL]
10	9 - 24
11	10 - 27
12	10 - 30
13	10 - 34
14	11 - 45
15	14 - 60
16	16 - 69
17	17 - 78
18	22 - 93

Weeks of pregnancy	AFP [IU/mL]
19	32 - 103
20	42 - 121
21	48 - 139
22 - 24	56 - 224
25 - 27	95 - 357
28 - 30	135 - 435
31 - 33	141 - 423
34 - 36	121 - 380
37 - 40	93 - 321

CLINICAL IMPORTANCE

1. Maternal serum containing AFP above 2.5 times the normal median for weeks 16 to 18 of pregnancy was detected in 88% of cases of anencephaly and in 79% of cases of open spina bifida.
2. The concentration of AFP in hepatocellular carcinoma and germ cell tumor varies from the normal range up to several million IU/ml. After surgical resection, the serum AFP may drop to normal range or somewhat above it.
3. AFP may occur in serum of patients with diseases other than hepatocarcinoma or embryonal carcinoma of the testes, such as neonatal hepatitis and nonhepatic neoplasms.

The results alone should not be the only reason for any therapeutic consequences. The results should be correlated to other clinical observations and diagnostic tests.

8 QUALITY CONTROL

Good laboratory practice requires that controls be run with each calibration curve. A statistically significant number of controls should be assayed to establish mean values and acceptable ranges to assure proper performance.

It is recommended to use control samples according to state and federal regulations. The use of control samples is advised to assure the day to day validity of results. Use controls at both normal and pathological levels.

The controls and the corresponding results of the QC-Laboratory are stated in the QC certificate added to the kit. The values and ranges stated on the QC sheet always refer to the current kit lot and should be used for direct comparison of the results.

It is also recommended to make use of national or international Quality Assessment programs in order to ensure the accuracy of the results.

Employ appropriate statistical methods for analysing control values and trends. If the results of the assay do not fit to the established acceptable ranges of control materials patient results should be considered invalid.

In this case, please check the following technical areas: Pipetting and timing devices; photometer, expiration dates of reagents, storage and incubation conditions, aspiration and washing methods.

9 ASSAY CHARACTERISTICS

9.1 Assay Dynamic Range

The range of the assay is between 1.78 – 160 IU/mL.

9.2 Specificity of Antibodies (Cross Reactivity)

The following substances were tested for cross reactivity of the assay:

Protein	added concentration	Cross-reactivity
HSA	20 mg/mL	0 %
Prolaktin	200 ng/mL	3.0 %
hCG	2000 ng/mL	2.4 %
SP-1	2000 ng/mL	0.3 %
HPL	2,011 mg/mL	3.2 %

9.3 Analytical Sensitivity

The analytical sensitivity was calculated from the mean plus two standard deviations of twenty (20) replicate analyses of *Calibrator 0* and was found to be 1.78 IU/mL.

9.4 Precision

9.4.1 Intra Assay Variation

The within assay variability is shown below:

Sample	n	Mean (IU/mL)	CV (%)
1	20	25.63	3.82
2	20	105.78	5.39
3	20	77.63	3.50

9.4.2 Inter Assay Variation

The inter assay variability (between run) is shown below:

Sample	n	Mean (IU/mL)	CV (%)
1	16	25.31	3.64
2	16	109.34	6.54
3	16	84.10	6.74

9.5 Recovery

Recovery of the DIAsource ELISA was determined by adding increasing amounts of the analyte to three sera of pregnant women. The percentage recoveries were determined by comparing expected and measured values of the samples.

		Sample 1	Sample 2	Sample 3
Concentration [IU/mL]		30.86	115.20	69.02
Average Recovery		92.9	94.0	99.1
Range of Recovery [%]	from	86.7	93.4	92.6
	to	99.5	94.7	106.5

9.6 Linearity

Three samples (serum) containing different amounts of analyte were serially diluted (up to 1:16) with zero calibrator and assayed with the DIAsource ELISA. The percentage recovery was calculated by comparing the expected and measured values for the analyt.

	Sample 1	Sample 2	Sample 3	
Concentration [IU/mL]	39.7	75.6	128.4	
Average Recovery	102.0	95.5	96.8	
Range of Recovery [%]	from	90.9	86.2	92.9
	to	115.0	109.3	101.3

10 LIMITATIONS OF USE

Reliable and reproducible results will be obtained when the assay procedure is performed with a complete understanding of the package insert instruction and with adherence to good laboratory practice.

Any improper handling of samples or modification of this test might influence the results.

10.1 Interfering Substances

Haemoglobin (up to 4 mg/mL), Bilirubin (up to 0.5 mg/mL) and Triglyceride (up to 30 mg/mL) have no influence on the assay results.

10.2 Drug Interferences

Until today no substances (drugs) are known to us, which have an influence to the measurement of AFP in a sample.

10.3 High-Dose-Hook Effect

No hook effect was observed in this test up to 1600 IU/mL of AFP.

11 LEGAL ASPECTS

11.1 Reliability of Results

The test must be performed exactly as per the manufacturer's instructions for use. Moreover the user must strictly adhere to the rules of GLP (Good Laboratory Practice) or other applicable national standards and/or laws. This is especially relevant for the use of control reagents. It is important to always include, within the test procedure, a sufficient number of controls for validating the accuracy and precision of the test.

The test results are valid only if all controls are within the specified ranges and if all other test parameters are also within the given assay specifications. In case of any doubt or concern please contact DIAsource.

11.2 Therapeutic Consequences

Therapeutic consequences should never be based on laboratory results alone even if all test results are in agreement with the items as stated under point 11.1. Any laboratory result is only a part of the total clinical picture of a patient.

Only in cases where the laboratory results are in acceptable agreement with the overall clinical picture of the patient should therapeutic consequences be derived.

The test result itself should never be the sole determinant for deriving any therapeutic consequences.

11.3 Liability

Any modification of the test kit and/or exchange or mixture of any components of different lots from one test kit to another could negatively affect the intended results and validity of the overall test. Such modification and/or exchanges invalidate any claim for replacement.

Claims submitted due to customer misinterpretation of laboratory results subject to point 11.2. are also invalid. Regardless, in the event of any claim, the manufacturer's liability is not to exceed the value of the test kit. Any damage caused to the test kit during transportation is not subject to the liability of the manufacturer.

12 REFERENCES

1. Ruoslahti, E. and Seppala, M., Studies of Carcino-Fetal Proteins: Physical and Chemical Properties of Human Alpha-Fetoprotein. *Int. J. Cancer* 7:218, 1971.
2. Gitlin, D., Perricelli, A. and Gitlin, G. M., Synthesis of Alpha-Fetoprotein by Liver, Yolk Sac, and Gastrointestinal Tract of the Human Conceptus. *Cancer Res.* 32:979, 1972.
3. Masseyeff, R., Gilli, G., Krebs, B., Bonet, C. and Zrihen, H., Evolution en Fonction de l'Age du Taux Serique Physiologique de l'Alpha-Foetoproteine chez l'Homme et le Rat. (French) in *Alpha-Feto-Protein* (Masseyeff, R., ed.) p.313. INSERM, Paris, 1974.
4. Silver, H. K. B., Gold, P., Feder, S., Freedman, So. O. and Shuster, J., Radioimmunoassay for human alpha-fetoprotein. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 70:526, 1973.
5. Waldmann, T. A. and McIntire, K. R., The use of a radioimmunoassay for alpha-fetoprotein in the diagnosis of malignancy. *Cancer* 34:1510, 1974.
6. Kohn, J., Orr, A.H. McElwain, T.J., Bentall, M. and Peckham, M. J., Serum alpha-fetoprotein in patients with testicular tumors. *Lancet* 2:433, 1976.
7. Abelev, G.I., Alpha-fetoprotein in ontogenesis and its association with malignant tumors. *Adv. Cancer Res.* 14: 295, 1971.
8. Scardino, P. T., Cox, H. D., Waldemann, T. A., McIntire, K. R., Mittemeyer, B. and Javadpour, N., The value of the serum tumor markers in the staging and prognosis of germ cell tumors of the testis. *J. Urol.* 118:994, 1977.
9. Bosl, G.J., Lange, P. H., Fraley, E. E., Goldman, A., Nochomovitz, L. E., Rosai, J., et al., Human chorionic gonadotropin and alpha-fetoprotein in the staging of nonseminomatous testicular cancer. *Cancer* 47:328, 1981
10. Lange, P.H., McIntire, K.R. and Waldmann, T. A., Hakala, T.R. and Fraley, E. E., Serum alpha-fetoprotein and human chorionic gonadotropin in the diagnosis and management of nonseminomatous germ-cell testicular cancer. *Medical Intelligence* 259:1237, 1976.
11. Javadpour, N., McIntire, K. R. and Waldmann, T. A., Human chorionic gonadotropin (HCG) and alpha-fetoprotein (AFP) in sera and tumor cells of patients with testicular seminoma. *Cancer* 42:2768, 1978.
12. Waldmann, T.A. and McIntire, K. R., Serum Alpha-Fetoprotein Levels in Patients with Ataxia-Telangiectasia. *Lancet* 2:1112, 1972.
13. Belanger, L., Tyrosinémie Héritaire et Alpha-1-Fetoprotéine. II. Recherche Tissulaire Comparée de l'Alpha-Foetoprotéine dans Deux Cas de Tyrosinémie Héritaire. Considerations sur l'Ontogenèse de la Foetoprotéine Humain (French). *Pathol. Bio.*21:457, 1973.
14. Kew, M. C., Purves, L.R. and Bersohn, I., Serum Alpha-Fetoprotein Levels in Acute Viral Hepatitis. *Gut* 14:939, 1973.
15. Endo, Y., Kanai, K., Oda, T., Mitamura, K., Iino, S. and Suzuki, H., Clinical Significance of alpha-Fetoprotein in Hepatitis and Liver Cirrhosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 259:234, 1975.
16. Purves, L. R. and Purves M., Serum Alpha-Fetoprotein. VI. The Radioimmunoassay Evidence for the Presence of AFP in the Serum of Normal People and During Pregnancy. *S. Afr. Med. J.* 46:1290, 1972.
17. Sepalla, M. and Ruoslahti, E., Alpha-Fetoprotein: Physiology and Pathology During Pregnancy and Application to Antenatal Diagnosis. *J. Perinat. Med.* 1:104, 1973.
18. Engvall, E., *Methods in Enzymology*, Volume 70, Van Vunakis, H. and Langone, J.J. (eds.) Academic Press, New York, NY, 419 (1980).
19. Uotila, M., Ruoslahti, E. and Engvall, E., *J. Immunol. Methods*, 42, 11 (1981).

Other translations of this Instructions for Use can be downloaded from our website: <https://www.diasource-diagnostics.com/>

Revision date : 2023-07-18



AFP-ELISA

fr

KAPD1468

POUR TEST DIAGNOSTIQUE IN VITRO

DIAsource ImmunoAssays SA - Rue du Bosquet 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium - Tel: +32 10 84 99 11 - Fax : +32 10 84 99 91

1 INTRODUCTION

1.1 Utilisation prévue

Le kit de dosage immuno-enzymatique DIAsource AFP ELISA propose le matériel requis pour la mesure quantitative de alpha foetoprotéine (AFP) dans le sérum. Ce kit n'est pas destiné à être utilisé pour l'évaluation des risques de trisomie 21

Ce kit est à utiliser uniquement dans le cadre de tests diagnostiques in vitro.

1.2 Résumé et explications

Voir détails dans la version anglaise

2 PRINCIPE DU TEST

Le kit DIAsource AFP ELISA est un test immuno-enzymatique en phase solide (ELISA) basé sur le principe du sandwich.

Les puits de microtitration sont recouverts d'un anticorps monoclonal (souris) dirigé contre un site antigénique unique sur une molécule AFP. Un échantillon de patient contenant de l'AFP endogène est incubée dans le puits revêtu avec un conjugué enzymatique, qui est un anticorps anti-AFP conjugué à de la peroxydase de Raifort. Après incubation, le conjugué non lié est éliminé par lavage.

La quantité de peroxydase liée est proportionnelle à la concentration d'AFP dans l'échantillon.

Après avoir ajouté la solution de substrat, l'intensité de la couleur développée est proportionnelle à la concentration d'AFP dans l'échantillon du patient.

3 PRÉCAUTIONS D'UTILISATION

- Ce kit est uniquement destiné aux tests diagnostiques in vitro.
- Utilisez uniquement la version valide des instructions d'utilisation qui est incluse dans le kit.
- Les informations concernant la toxicité des réactifs contenus dans ce kit sont présentées dans la fiche de sécurité (« Safety Data Sheets »).
- Tous les réactifs de ce kit contenant du sérum ou du plasma humain ont été testés avec des résultats négatifs pour le VIH I/II, le HBsAg et le HCV selon les normes FDA en vigueur. Néanmoins, lors de leur utilisation, tous les réactifs de ce kit doivent être manipulés avec précaution.
- Eviter les contacts avec la Stop Solution, celle-ci contient 0.5 M de H₂SO₄. Cela pourrait engendrer irritations ou brûlures de la peau.
- Ne jamais pipeter avec la bouche, et éviter tout contact de la peau ou des muqueuses avec les réactifs ou les échantillons.
- Ne pas fumer, manger, boire ou utiliser des produits cosmétiques dans les zones où les échantillons ou le kit ont été maniés.
- Porter des gants d'examen lors de l'utilisation des échantillons ou des réactifs. Une contamination microbienne des échantillons ou des réactifs pourrait fausser les résultats.
- L'utilisation de ce kit devra être en accord avec les normes ou recommandations nationales de sécurité en vigueur concernant les produits à risque biologique.
- Ne pas utiliser les réactifs au-delà de la date d'expiration inscrite sur l'emballage.
- Tous les volumes indiqués doivent être scrupuleusement respectés, comme indiqué dans le protocole expérimental. Seule l'utilisation de pipettes calibrées ou d'un spectrophotomètre lecteur de micro-plaques calibré garantit l'obtention de résultats optimaux à ce test.
- Ne pas mélanger ou utiliser des réactifs contenus dans des kits de lots différents. Il est conseillé de ne pas échanger les puits de différentes plaques, même si celles-ci proviennent du même lot. Les kits peuvent avoir été transportés ou stockés différemment, et les caractéristiques de liaison de chaque plaque pourraient ainsi être modifiées.
- L'élimination des solutions chimiques et des réactifs contenus dans ce kit, utilisés ou non, doit être en accord avec la réglementation nationale en vigueur concernant l'élimination des déchets à risque biologique.
- La fiche de sécurité concernant ce produit peut être obtenue en contactant directement DIAsource.

4 COMPOSITION DU KIT

4.1 Contenu du kit

1.

LLI

 Microplaque, 12x8 (à détacher) barrettes, 96 puits;
Les puits sont recouverts avec un anticorps anti-AFP (monoclonal).
2.

CAL	N
-----	---

 Calibrateurs, N=1 à 4, 4 flacons (lyophilisés), 0.5 mL;
Voir valeur exacte sur l'étiquette
Conversion: 1IU/mL = 1,21ng/mL
Les calibrateurs ont été calibrés selon le NIBCS 1st International Standard for Alphafoetoprotein AFP (AFP 1st IRP 72/225)
Voir « Préparation des réactifs » ;
contient 0.03% Proclin 300, 0.015% BND and 0.010% MIT comme conservateur .
3.

CAL	0
-----	---

 Calibrateur zéro, 1 flacon (lyophilisé), 0.5 ml
contient 0.03% Proclin 300, 0.015% BND and 0.010% MIT comme conservateur.
Voir "Preparation of Reagents"
4.

Ab	HRP
----	-----

 Conjugué enzymatique, 1 flacon, 11 mL, prêt à l'emploi
Anticorps anti- AFP conjugué à la HRP.
contient 0.03% Proclin 300 comme conservateur.
5.

CHROM	TMB
-------	-----

 Solution substrat, 1 flacon, 14 mL, prêt à l'emploi
Tetramethylbenzidine (TMB).
6.

STOP	SOLN
------	------

 Solution stop, 1 flacon, 14 mL, prêt à l'emploi
contient 0.5M H₂SO₄,
Eviter les contacts avec la solution stop. Cela pourrait engendrer des irritations ou brûlures de la peau.

BND = 5-bromo-5-nitro-1,3-dioxane
MIT = 2-methyl-2H-isothiazol-3-one

Remarque : Un Calibrateur 0 supplémentaire peut être fourni sur demande.

4.1.1 Equipement et matériel requis, mais non fournis

- Un spectrophotomètre lecteur de microplaques calibré (450 ±10 nm).
- Des micro-pipettes de précision variables et calibrées.
- Du papier absorbant.
- De l'eau distillée.
- Un minuteur
- Papier graphique ou logiciel pour la réduction des données

4.2 Stockage et stabilité du kit

Les réactifs contenus dans des flacons non-ouverts, stockés à 2°C - 8°C, seront stables jusqu'à la date d'expiration inscrite sur l'étiquette. Ne pas utiliser les réactifs au-delà de cette date.

Les réactifs contenus dans des flacons ouverts doivent être stockés à 2°C - 8°C. Les microplaques doivent être stockées à 2°C - 8°C. Une fois le sachet en aluminium ouvert, attention à bien refermer le flacon.

Les kits ouverts conservent leur activité durant 9 semaines s'ils sont stockés comme précédemment mentionné.

4.3 Préparation des réactifs

Amener tous les réactifs et le nombre de barrettes nécessaires au test à température ambiante avant utilisation.

Calibrateurs

Reconstituer le contenu lyophilisé des flacons de calibrateurs avec 0,5 mL d'eau distillée et laisser incuber au minimum 10 minutes. Mélanger plusieurs fois avant utilisation.

Remarque : Les calibrateurs reconstitués sont stables deux mois à 2°C - 8°C. Pour un stockage prolongé, congeler à -20 °C.

4.4 Élimination des déchets relatifs au kit

L'élimination des déchets relatifs au kit doit être réalisée selon les règles nationales en vigueur. Les informations spécifiques au kit sont présentées dans la fiche de sécurité.

4.5 Kits endommagés

Dans le cas de dommages importants survenus au kit ou ses composants, informer DIASource, au plus tard une semaine après réception du kit. Les composants endommagés ne doivent pas être utilisés pour le test. Ils doivent être stockés jusqu'à ce qu'une solution adaptée ait été trouvée. Après cela, ils doivent être éliminés selon les directives officielles en vigueur.

5 ECHANTILLONS

Seul du sérum doit être utilisé pour ce test.

En général, il faut éviter d'utiliser des échantillons hémolytiques, ictériques ou lipémiques. Pour plus d'informations, reportez-vous au chapitre "Substances parasites".

Remarque : Les échantillons contenant de l'azide de sodium ne doivent pas être utilisés pour ce test.

REMARQUE :

Si une amniocentèse est nécessaire, la collecte des échantillons doit être effectuée avant la ponction. Après la ponction amniotique, des valeurs d'AFP accrues sont déterminées.

5.1 Prélèvement et préparation des échantillons

Sérum:

Prélever le sang par ponction veineuse (ex. Sarstedt Monovette pour sérum), laisser coaguler, puis séparer le sérum par centrifugation à température ambiante. Ne pas centrifuger avant que la coagulation ne soit terminée. Les patients sous traitement anti-coagulant peuvent demander un temps de coagulation plus important.

5.2 Conservation des échantillons

Les tubes contenant des échantillons doivent être fermés et peuvent être stockés jusqu'à 7 jours à 2°C - 8°C avant d'être testés.

Les échantillons stockés pour un temps prolongé doivent être congelés à -20 °C avant d'être testés. Les échantillons décongelés doivent être retournés plusieurs fois avant le test.

5.3 Dilution de l'échantillon

Si, lors d'un test préliminaire, la concentration de l'échantillon se révèle être supérieure à celle du calibrateur le plus concentré, alors l'échantillon doit être dilué avec le calibrateur 0 et testé de nouveau, comme décrit dans "Réalisation du test".

Pour le calcul des concentrations, ce facteur de dilution doit être pris en considération.

Exemple:

- a) dilution 1:10: 10 µL échantillon + 90 µL calibrateur 0 (bien mélanger).
- b) dilution 1:100: 10 µL dilution a) 1:10 + 90 µL calibrateur 0 (bien mélanger).

6 RÉALISATION DU TEST

6.1 Remarques générales

- Tous les réactifs et échantillons doivent être amenés à température ambiante avant utilisation. Tous les réactifs doivent être mélangés, sans formation de mousse.
- Une fois la procédure engagée, toutes les étapes doivent être réalisées sans interruption.
- Utiliser un nouvel embout de pipette pour chaque calibrateur, contrôle ou échantillon, ceci afin d'éviter toute contamination.
- L'absorbance est fonction du temps d'incubation et de la température. Avant de commencer le test, il est recommandé de préparer tous les réactifs, bouchons ouverts, de préparer les puits des microplaques, etc. Cela garantira un intervalle de temps équivalent entre chaque étape, sans interruption.
- En règle générale, la réaction enzymatique est linéairement proportionnelle au temps et à la température.

6.2 Réalisation du dosage

Chaque test doit inclure une courbe de calibration.

1. Disposer le nombre de puits de micro-titration désiré dans le support.
2. Déposer **25 µL** de chaque Calibrateur, Contrôle et les échantillons, avec de nouveaux embouts de pipette, dans les puits appropriés.
3. Déposer **100 µL** de Conjugué enzymatique dans chaque puits. Bien mélanger pendant 10 secondes. Il est important d'obtenir un mélange parfait lors de cette étape.
4. Incuber pendant **30 minutes** à température ambiante.
5. Décanner le contenu des puits et rincer les puits 5 fois avec de l'eau distillée (400 µL par puits). Tapoter les puits sur du papier absorbant afin d'éliminer les gouttelettes résiduelles.
Remarque importante: La sensibilité et la précision de ce test sont fortement dépendantes de la bonne réalisation des étapes de lavage !
6. Ajouter **100 µL** de Solution substrat à chaque puits.
7. Incuber pendant **10 minutes** à température ambiante.
8. Stopper la réaction enzymatique en ajoutant **50 µL** de Solution stop à chaque puits.
9. Lire la densité optique à **450 nm (lecture) et à 620 nm à 630 nm (soustraction de fond, recommandée)** à l'aide d'un spectrophotomètre lecteur de microplaques **dans les 10 minutes** après avoir ajouté la Solution stop.

6.3 Calcul des résultats

1. Calculer les valeurs moyennes des densités optiques pour chaque série de calibrateurs, contrôles et échantillons.
2. Etablir la courbe de calibration en reportant la densité optique moyenne de chaque valeur de calibrateur en fonction de sa concentration, en posant la densité optique en axe des ordonnées et la concentration en axe des abscisses.
3. L'utilisation de la densité optique moyenne pour chaque échantillon détermine la concentration correspondante à partir de la courbe de calibration.
4. Méthode automatique. Les résultats dans les instructions d'utilisation ont été calculés de façon automatique en utilisant une courbe de régression 4 Paramètres. (4 paramètres Rodbard ou 4 paramètres Marquardt sont les méthodes favorites.) D'autres fonctions logistiques peuvent donner des résultats légèrement différents.
5. La concentration des échantillons peut être lue directement à partir de cette courbe de calibration. Les échantillons avec une concentration supérieure à celle du calibrateur le plus concentré doivent être dilués de nouveau. Pour le calcul des concentrations, ce facteur de dilution doit être pris en considération.

6.3.1 Exemple typique de courbe de calibration

Les résultats suivants sont présentés à titre d'exemple et ne peuvent être utilisés au moment de l'essai.

Calibrateur	Unités optiques (450 nm)
Calibrateur 0 (0 IU/mL)	0.07
Calibrateur 1 (10 IU/mL)	0.21
Calibrateur 2 (40 IU/mL)	0.69
Calibrateur 3 (80 IU/mL)	1.29
Calibrateur 4 (160 IU/mL)	1.97

7 VALEURS ATTENDUES

Il est fortement recommandé à chaque laboratoire de déterminer ses propres valeurs normales ou anormales.

Dans une étude réalisée à l'aide du kit DIASource AFP ELISA, les valeurs suivantes sont observées:

7.1 Adultes normaux (non-enceintes)

La limite inférieure de concentration d'AFP dans le sérum normal est inférieure à 1 UI/ml; la limite supérieure est d'environ 10UI/ml.

7.2 Valeurs durant la grossesse

Semaines de grossesse	AFP (IU/mL)
10	9 - 24
11	10 - 27
12	10 - 30
13	10 - 34
14	11 - 45
15	14 - 60
16	16 - 69
17	17 - 78
18	22 - 93

Semaine de grossesse	AFP (IU/mL)
19	32 - 103
20	42 - 121
21	48 - 139
22 - 24	56 - 224
25 - 27	95 - 357
28 - 30	135 - 435
31 - 33	141 - 423
34 - 36	121 - 380
37 - 40	93 - 321

REMARQUE: IMPORTANCE CLINIQUE

1. Un sérum maternel contenant de l'AFP, 2,5 fois supérieur à la moyenne pendant les semaines 16 à 18 de grossesse, a été détecté dans 88% des cas d'anencéphalie et dans 79% des cas de spina bifida ouverte.
 2. La concentration d'AFP dans les cas de carcinomes hépatocellulaires et de tumeurs des cellules germinales varie de la plage normale jusqu'à plusieurs millions d'UI / ml. Après résection chirurgicale, l'AFP sérique peut retomber à la normale ou légèrement au-dessus.
 3. L'AFP peut apparaître dans le sérum de patients atteints de maladies autres que l'hépatocarcinome ou le carcinome embryonnaire des testicules, comme une hépatite néonatale et néoplasmes non hépatiques.
- Les résultats seuls ne devraient pas être l'unique raison de conséquences thérapeutiques. Les résultats doivent être corrélés à d'autres observations cliniques et tests diagnostiques.

8 CONTRÔLE QUALITÉ

Les bonnes pratiques de laboratoire exigent que des contrôles soient inclus dans chaque courbe de calibration. Il est recommandé d'utiliser des échantillons contrôles selon les réglementations nationales en vigueur. L'utilisation des échantillons contrôles est recommandée afin de s'assurer jour après jour de la validité des résultats. Utiliser des contrôles de valeurs normales et pathologiques.

Les contrôles et les résultats correspondants issus du laboratoire QC sont mentionnés dans le certificat QC fourni avec le kit. Les valeurs et les limites mentionnées sur la fiche QC font toujours référence au lot de kit courant et doivent être utilisées pour une comparaison directe avec les résultats.

Il est également recommandé d'utiliser les programmes d'évaluation de qualité nationaux ou internationaux, afin de s'assurer de l'exactitude des résultats.

Utiliser les méthodes d'analyses statistiques appropriées pour l'analyse des valeurs contrôles et des tendances. Si les résultats ne correspondent pas aux limites établies des contrôles, les résultats concernant ces patients doivent être considérées comme non valides.

Dans ce cas, tester les pistes techniques suivantes : mécanisme de pipetage et temps; spectrophotomètre, dates d'expiration des réactifs, conditions de stockage et d'incubation, méthodes d'aspiration et de lavage.

Après avoir testé les points mentionnés ci-dessus, si aucune erreur n'est détectée, contacter votre distributeur ou directement DIAsource.

9 CARACTÉRISTIQUES DU TEST

9.1 Zone de mesure

Les limites du dosage sont comprises entre 1,78 - 160 IU/mL.

9.2 Specificité des anticorps (reaction croisée)

Voir le manuel d'utilisateur en version anglaise.

9.3 Sensibilité de l'analyse

La sensibilité analytique a été calculée en ajoutant deux déviations Standard à la moyenne de vingt (20) réplicats du calibrateur 0 et a été mesurée à 1,78 UI/ml

9.4 Reproductibilité Intra et Inter-essais

Voir le manuel d'utilisateur en version anglaise.

9.5 Recouvrement

Voir le manuel d'utilisateur en version anglaise.

9.6 Linéarité

Voir le manuel d'utilisateur en version anglaise.

10 LIMITES D'UTILISATION

Des résultats fiables et reproductibles seront obtenus lorsque la procédure de test est effectuée avec une compréhension complète de la notice et en respectant les bonnes pratiques de laboratoire.

Toute utilisation impropre des échantillons ou toute modification du test peut influencer les résultats.

10.1 Substances parasites

L'hémoglobine (jusqu'à 4 mg/mL), la bilirubine (jusqu'à 0,5 mg/mL) et les triglycérides (jusqu'à 30 mg/mL) n'ont aucune influence sur les résultats du dosage.

10.2 Drogues parasites

Jusqu'à présent, nous ne connaissons aucune substance (drogues) capable d'influencer la mesure d'AFP dans un échantillon.

10.3 Effet de surdosage

Jusqu'à 1600 IU/mL d'AFP, aucun effet de surdosage n'a été détecté avec ce test.

11 ASPECTS LÉGAUX

11.1 Fiabilité des résultats

Ce test doit être exactement utilisé selon les instructions d'utilisation du fabricant. De plus, les utilisateurs doivent strictement respecter les règles de la bonne pratique de laboratoire, ou autres lois nationales. Cela est spécialement le cas pour l'utilisation des réactifs contrôlés. Pour chaque test, il est important d'inclure un nombre suffisant de contrôles, afin de pouvoir valider l'exactitude et la précision du test.

Les résultats du test sont valides si et seulement si tous les contrôles sont compris dans les gammes de mesure mentionnées et si tous les autres paramètres du test sont également compris dans les instructions de ce test. En cas de doute ou d'inquiétude, contacter DIAsource.

11.2 Conséquences thérapeutiques

Les suites thérapeutiques ne devront jamais être basées sur les résultats de laboratoire seuls, même si les tous les résultats du test sont en accord avec les points mentionnés dans le paragraphe 11.1. Tout résultat n'est qu'une partie du tableau clinique complet d'un patient.

Les suites thérapeutiques peuvent découler des résultats de laboratoire si et seulement si ceux-ci sont en accord avec l'ensemble du tableau clinique du patient.

Le résultat du test en lui-même ne doit en aucun cas être le seul déterminant des suites thérapeutiques à suivre.

11.3 Responsabilité

Toute modification du kit et / ou échange ou mélange d'un des composants de différents lots, d'un kit à un autre, pourrait affecter de façon négative les résultats attendus et la validité du test dans son ensemble. De telles modifications ou échanges invalident toute réclamation pour remplacement.

Toutes les réclamations soumises, relatives au paragraphe 11.2, et dues à une mauvaise interprétation des résultats de laboratoire de la part du client sont également invalides. Néanmoins, en cas de réclamation, la responsabilité du fabricant n'est pas de dépasser les limites de la valeur du kit. Tout dommage causé au kit lors de son transport n'est pas de la responsabilité du fabricant.

12 RÉFÉRENCES

1. Ruoslahti, E. and Seppala, M., Studies of Carcino-Fetal Proteins: Physical and Chemical Properties of Human Alpha-Fetoprotein. *Int. J. Cancer* 7:218, 1971.
2. Gitlin, D., Perricelli, A. and Gitlin, G. M., Synthesis of Alpha-Fetoprotein by Liver, Yolk Sac, and Gastrointestinal Tract of the Human Conceptus. *Cancer Res.* 32:979, 1972.
3. Masseyeff, R., Gilli, G., Krebs, B., Bonet, C. and Zrihen, H., Evolution en Fonction de l'Age du Taux Sérique Physiologique de l'Alpha-Foetoprotéine chez l'Homme et le Rat. (French) in *Alpha-Feto-Protein* (Masseyeff, R., ed.) p.313. INSERM, Paris, 1974.
4. Silver, H. K. B., Gold, P., Feder, S., Freedman, So. O. and Shuster, J., Radioimmunoassay for human alpha-fetoprotein. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 70:526, 1973.
5. Waldmann, T. A. and McIntire, K. R., The use of a radioimmunoassay for alpha-fetoprotein in the diagnosis of malignancy. *Cancer* 34:1510, 1974.
6. Kohn, J., Orr, A.H. McElwain, T.J., Bentall, M. and Peckham, M. J., Serum alpha-fetoprotein in patients with testicular tumors. *Lancet* 2:433, 1976.
7. Abelev, G.I., Alpha-fetoprotein in ontogenesis and its association with malignant tumors. *Adv. Cancer Res.* 14: 295, 1971.
8. Scardino, P. T., Cox, H. D., Waldemann, T. A., McIntire, K. R., Mittemeyer, B. and Javadpour, N., The value of the serum tumor markers in the staging and prognosis of germ cell tumors of the testis. *J. Urol.* 118:994, 1977.
9. Bosl, G.J., Lange, P. H., Fraley, E. E., Goldman, A., Nochomovitz, L. E., Rosai, J., et al., Human chorionic gonadotropin and alpha-fetoprotein in the staging of nonseminomatous testicular cancer. *Cancer* 47:328, 1981
10. Lange, P.H., McIntire, K.R. and Waldmann, T. A., Hakala, T.R. and Fraley, E. E., Serum alpha-fetoprotein and human chorionic gonadotropin in the diagnosis and management of nonseminomatous germ-cell testicular cancer. *Medical Intelligence* 259:1237, 1976.
11. Javadpour, N., McIntire, K. R. and Waldmann, T. A., Human chorionic gonadotropin (HCG) and alpha-fetoprotein (AFP) in sera and tumor cells of patients with testicular seminoma. *Cancer* 42:2768, 1978.
12. Waldmann, T.A. and McIntire, K. R., Serum Alpha-Fetoprotein Levels in Patients with Ataxia-Telangiectasia. *Lancet* 2:1112, 1972.
13. Belanger, L., Tyrosinémie Héritaire et Alpha-1-Fetoprotéine. II. Recherche Tissulaire Comparée de l'Alpha-Foetoprotéine dans Deux Cas de Tyrosinémie Héritaire. Considerations sur l'Ontogenèse de la Foetoprotéine Humain (French). *Pathol. Bio.*21:457, 1973.
14. Kew, M. C., Purves, L.R. and Bersohn, I., Serum Alpha-Fetoprotein Levels in Acute Viral Hepatitis. *Gut* 14:939, 1973.
15. Endo, Y., Kanai, K., Oda, T., Mitamura, K., Iino, S. and Suzuki, H., Clinical Significance of alpha-Fetoprotein in Hepatitis and Liver Cirrhosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 259:234, 1975.
16. Purves, L. R. and Purves M., Serum Alpha-Fetoprotein. VI. The Radioimmunoassay Evidence for the Presence of AFP in the Serum of Normal People and During Pregnancy. *S. Afr. Med. J.* 46:1290, 1972.
17. Sepalla, M. and Ruoslahti, E., Alpha-Fetoprotein: Physiology and Pathology During Pregnancy and Application to Antenatal Diagnosis. *J. Perinat. Med.* 1:104, 1973.
18. Engvall, E., *Methods in Enzymology*, Volume 70, Van Vunakis, H. and Langone, J.J. (eds.) Academic Press, New York, NY, 419 (1980).
19. Uotila, M., Ruoslahti, E. and Engvall, E., *J. Immunol. Methods*, 42, 11 (1981).

Revision date : 2023-07-18