



AFP-IRMA

KIP0081 - KIP0084

Read entire protocol before use.

AFP-IRMA

I. INTENDED USE

Immunoradiometric assay for the *in vitro* quantitative measurement of human Alpha – Fetoprotein (AFP) in serum and plasma.

This kit is not intended to be used for the risk evaluation of trisomy 21.

II. GENERAL INFORMATION

A. **Proprietary name :** DIAsource AFP-IRMA

B. **Catalog number :** KIP0081 : 96 tests
KIP0084 : 4 x 96 tests

C. **Manufactured by :** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue de l'Industrie 8, B-1400 Nivelles, Belgium.

For technical assistance or ordering information contact :
Tel : +32 (0)67 88.99.99 Fax : +32 (0)67 88.99.96

III. CLINICAL BACKGROUND

A. Introduction

α -Fetoprotein (AFP) is a 70.000 Da MW oncofetal protein synthesized by liverparenchymal cells, yolk sac and gastrointestinal tract of human fetus. The peak of AFP concentration occurs between weeks 12 and 15 of gestation. After birth AFP concentration in plasma rapidly decreases to less than 5 IU/ml. AFP levels are elevated in the following clinical situation:

B. Clinical applications

The main clinical applications of measurements of AFP are found in the monitoring of cancer following treatment. However, AFP measurement may also be of clinical interest in monitoring of pregnancy when applied to serum or amniotic fluid.

- **Cancer**
 - . Hepatocellular carcinoma
 - . Teratocarcinomas and embryonal cell carcinoma of testis and ovaries
 - . Yolk sac tumor
 - . Other cancers (less than 5 %).
- **Viral diseases**
 - . Acute hepatitis (usually < 100 IU/ml)
 - . Chronic active hepatitis (usually < 100 IU/ml).

IV. PRINCIPLES OF THE METHOD

DIAsource AFP-IRMA is a two-step immunoradiometric assay based on coated tube separation. Mabs 1 - the capture antibodies - are attached to the lower and inner surface of the plastic tube. Calibrators or samples are added to the tubes. After incubation, washing removes the occasional excess of antigen. Mab 2 - the ¹²⁵I-labelled-antibody is added. After incubation and washing, the remaining radioactivity bound to the tube reflects the antigen concentration. Because of the occasional extremely high concentration of AFP in serum (> 1 mg/ml) in case of cancer, the present DIAsource AFP-IRMA has been developed on a two steps procedure to avoid high dose hook effects.

V. REAGENTS PROVIDED

Reagents	96 Test Kit	4 x 96 Test Kit	Colour Code	Reconstitution
 Tubes coated with anti AFP (monoclonal antibodies)	2 x 48	8 x 48	dark red	Ready for use
Ab^{125I} TRACER: ¹²⁵ Iodine labelled anti - AFP (monoclonal antibodies) in phosphate buffer with bovine serum albumin, azide (0.1%) and an inert red dye	1 vial 10.5 ml 350 kBq	4 vials 10.5 ml 4x350 kBq	red	Ready for use
CAL0 Zero calibrator (0 IU/ml) in bovine serum with azide (0.5%) and merthiolate	1 vial 10 ml	2 vials 10 ml	yellow	Ready for use
CALN Calibrators AFP N = 1 to 5 (see exact values on vial labels) in bovine serum with thymol	5 vials lyophil.	2 x 5 vials lyophil.	yellow	Add 0.5 ml distilled water
WASH SOLN CONC Wash solution (TRIS-HCl)	1 vial 10 ml	4 vials 10 ml	brown	Dilute 70 x with distilled water (use a magnetic stirrer).
CONTROLN Controls - N = 1 or 2 in human serum with merthiolate	2 vials lyophil.	2 x 2 vials lyophil.	silver	Add 0.5 ml distilled water

Note : Use the zero calibrator for sample dilutions.

1 IU of the calibrator preparation is equivalent to 1 IU of the 1st IRP 72/225

VI. SUPPLIES NOT PROVIDED

The following material is required but not provided in the kit:

1. Distilled water
2. Pipettes for delivery of: 100 µl, 200 µl, 500 µl and 1 ml (the use of accurate pipettes with disposable plastic tips is recommended)
3. Vortex mixer
4. Magnetic stirrer
5. 5 ml automatic syringe (Cornwall type) for washing
6. Aspiration system (optional)
7. Any gamma counter capable of measuring ¹²⁵I may be used (minimal yield 70%).

VII. REAGENT PREPARATION

- Calibrators** : Reconstitute the calibrators 1-5 with 0.5 ml distilled water.
- Controls** : Reconstitute the controls with 0.5 ml distilled water.
- Working Wash solution** : Prepare an adequate volume of Working Wash solution by adding 69 volumes of distilled water to 1 volume of Wash Solution (70x). Use a magnetic stirrer to homogenize. Discard unused Working Wash solution at the end of the day.

VIII. STORAGE AND EXPIRATION DATING OF REAGENTS

- Before opening or reconstitution, all kit components are stable until the expiry date, indicated on the label, if kept at 2 to 8°C.
- After reconstitution, calibrators and controls are stable for one week at 2 to 8°C. For longer storage periods, aliquots should be made and kept at -20°C for maximum 3 months.
- Avoid successive freezing and thawing.
- Freshly prepared Working Wash solution should be used on the same day.
- After its first use, tracer is stable until expiry date, if kept in the original well-closed vial at 2 to 8°C.
- Alterations in physical appearance of kit reagents may indicate instability or deterioration.

IX. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

- Serum or plasma samples must be kept at 2-8°C.
 - If the test is not run within 24 hrs, storage in aliquots at -20°C is recommended.
 - Avoid successive freezing and thawing.
 - Serum or plasma (EDTA or Heparin) provide similar results.
- $$y(\text{serum}) = 1.05 \times (\text{hep. plasma}) - 0.2 \quad r = 0.98 \quad n = 31$$
- $$y(\text{serum}) = 1.05 \times (\text{EDTA plasma}) - 0.5 \quad r = 0.99 \quad n = 32$$

X. PROCEDURE

A. Handling notes

Do not use the kit or components beyond expiry date. Do not mix materials from different kit lots. Bring all the reagents to room temperature prior to use. Thoroughly mix all reagents and samples by gentle agitation or swirling. In order to avoid cross-contamination, use a clean disposable pipette tip for the addition of each reagent and sample. High precision pipettes or automated pipetting equipment will improve the precision. Respect the incubation times. Prepare a calibration curve for each run, do not use data from previous runs.

B. Procedure

1. Label coated tubes in duplicate for each calibrator, control and sample. For the determination of total counts, label 2 normal tubes
2. Briefly vortex calibrators, controls and samples and dispense 50µl of each into respective tubes.
3. Shake the rack containing the tubes gently by hand to liberate any trapped air bubbles.
4. Incubate for 1 hour at room temperature.
5. Aspirate (or decant) the content of each tube (except total counts). Be sure that the plastic tip of the aspirator reaches the bottom of the coated tube in order to remove all the liquid.
6. Wash tubes twice with 2 ml Working Wash solution (except total counts) and aspirate (or decant). Avoid foaming during the addition of the Working Wash solution.
7. After the last washing, let the tubes stand upright for two minutes and aspirate the remaining drop of liquid.
8. Dispense 100 µl of anti-AFP-¹²⁵I tracer into each tube, including the uncoated tubes for total counts.
9. Shake the rack containing the tubes gently by hand to liberate any trapped air bubbles.
10. Incubate for 1 hour at room temperature.
11. Aspirate (or decant) the content of each tube (except total counts). Be sure that the plastic tip of the aspirator reaches the bottom of the coated tube in order to remove all the liquid.
12. Wash tubes with 2 ml Working Wash solution (except total counts) and aspirate (or decant). Avoid foaming during the addition of the Working Wash solution.
13. Let the tubes stand upright for two minutes and aspirate the remaining drop of liquid.
14. Count tubes in a gamma counter for 60 seconds.

XI. CALCULATION OF RESULTS

1. Calculate the mean of duplicate determinations.
2. On semi logarithmic or linear graph paper plot the c.p.m. (ordinate) for each calibrator against the corresponding concentration of AFP (abscissa) and draw a calibration curve through the calibrator points, reject the obvious outliers.
3. Read the concentration for each control and sample by interpolation on the calibration curve.
4. Computer assisted data reduction will simplify these calculations. If automatic result processing is used, a 4-parameter logistic function curve fitting is recommended.

XII. TYPICAL DATA

The following data are for illustration only and should never be used instead of the real time calibration curve.

AFP-IRMA		cpm	B/T (%)
Total count		133479	
Calibrator	0.0 IU/ml	268	0.2
	5.3 IU/ml	2821	2.11
	15.0 IU/ml	6076	4.55
	45.0 IU/ml	19122	14.33
	155.0 IU/ml	44001	32.96
	440.0 IU/ml	66466	49.79

XIII. PERFORMANCE AND LIMITATIONS

A. Detection limit

Twenty zero calibrators were assayed along with a set of other calibrators. The detection limit, defined as the apparent concentration two standard deviations above the average counts at zero binding, was 0.5 IU/ml.

B. Specificity

The AFP-IRMA does not cross-react with structurally related substances. Human serum albumin (HSA) at a concentration of 60 ng/ml was added to a low (5 IU/ml) and a high (50 IU/ml) AFP Calibrator, the apparent AFP response was measured.

	Observed AFP value IU/ml
Cal 5 IU/ml + HSA (60 ng/ml)	4.8
Cal 50 IU/ml + HSA (60 ng/ml)	49.0

Note : this table shows the cross-reactivity for the AFP-IRMA.

C. Precision

INTRA-ASSAY				INTER-ASSAY			
Serum	N	<X> ± SD (IU/ml)	CV (%)	Serum	N	<X> ± SD (IU/ml)	CV (%)
A	10	4.2 ± 0.2	4.8%	E	22	7.8 ± 0.5	5.8%
B	10	11.4 ± 0.2	1.8%	F	22	19.8 ± 1.2	6.0%
C	10	26.2 ± 0.6	2.3%				
D	10	357 ± 19.6	5.5%				

SD : Standard Deviation; CV: Coefficient of variation

D. Accuracy

DILUTION TEST			
Sample	Dilution	Theoretical Concent. (IU/ml)	Measured Concent. (IU/ml)
Serum 1	1/1	-	444
	1/3	148.0	158
	1/6	74.0	86
	1/10	44.4	42
	1/50	8.9	9.8
Serum 2	1/1	-	87.4
	1/2	43.7	39.6
	1/4	21.9	21.8
	1/10	8.7	9.0
	1/20	4.4	4.2

Samples were diluted with the zero calibrator.

RECOVERY TEST			
Sample	added AFP (IU/ml)	Recovered AFP (IU/ml)	Recovered (%)
Serum 1	7.5	9.6	128%
	22.5	23.2	103%
	80	82.2	103%
Serum 2	2.5	2.4	96%
	22.5	21.4	95%
	225	218	97%

E. Time delay between last calibrator and sample dispensing

As shown hereafter, assay results remain accurate even when a sample is dispensed 30 minutes after the calibrator has been added to coated tubes.

TIME DELAY			
Serum (ng/ml)	0'	20'	30'
Serum 1	12.7	11.0	10.1
Serum 2	31.3	29.4	27.3

F. Hook effect

A sample spiked with an AFP concentration up to 1460000 IU/ml gives higher counts than the last calibrator point.

XIV. LIMITATIONS

- Specimens from patients who have received preparations of mouse monoclonal antibodies for diagnosis or therapy may contain human anti-mouse antibodies (HAMA). Such specimens may show either falsely elevated or depressed values when tested with assay kits which employ mouse monoclonal antibodies.
- Heterophilic antibodies in human serum can react with reagent immunoglobulins, interfering with in vitro immunoassays. Patients routinely exposed to animals or animal serum products can be prone to this interference and anomalous values may be observed in case of the presence of heterophelic antibodies. Carefully evaluate the results of patients suspected of having these antibodies. If results are not consistent with other clinical observations, additional information should be required before diagnosis.

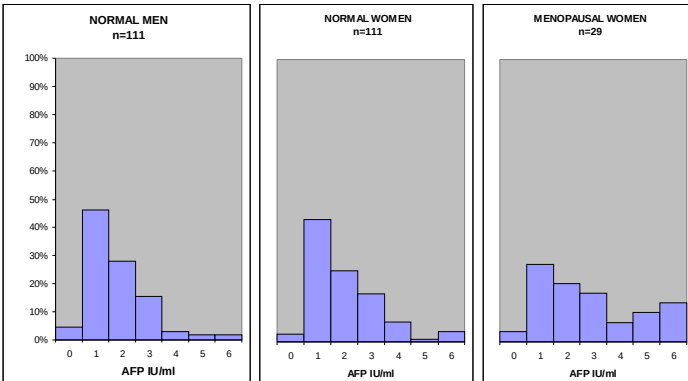
XV. INTERNAL QUALITY CONTROL

- If the results obtained for Control 1 and/or Control 2 are not within the range specified on the vial label, the results cannot be used unless a satisfactory explanation for the discrepancy has been given.
- If desirable, each laboratory can make its own pools of control samples, which should be kept frozen in aliquots.
- Acceptance criteria for the difference between the duplicate results of the samples should rely on Good Laboratory Practises.

XVI. REFERENCE INTERVALS

These values are given only for guidance; each laboratory should establish its own normal range of values.

A. Healthy non-pregnant individuals



B. Pregnancy (*)

Maternal serum

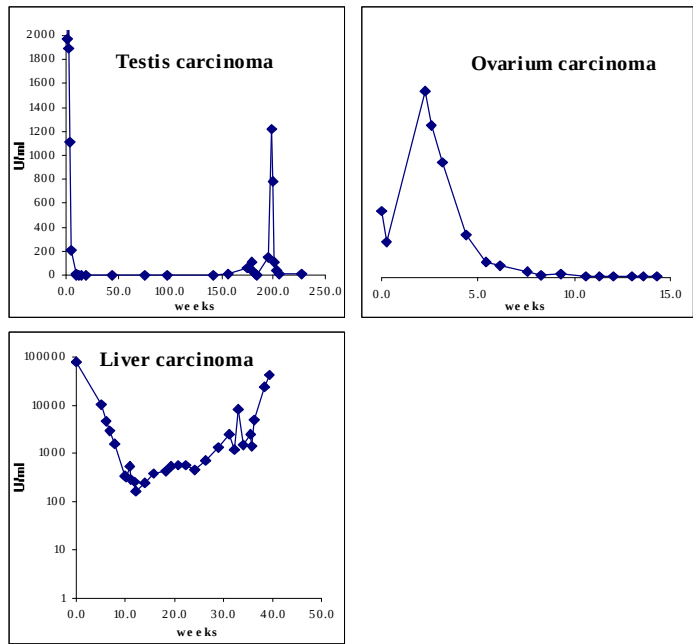
The distribution of serum values in normal pregnancy. The upper normal limits for serum samples were obtained by expressing the data as the median multiplied by 2.5.

Week of gestation	Lower values 2.5 Percentile (IU AFP/ml)	Median (IU AFP/ml)	Higher values 97.5 Percentile (IU AFP/ml)	2.5 Median (IU AFP/ml)
15	11.1	21	59	52.5
16	15.1	28	73	70
17	19.0	36	84	90
18	23	42	93	105
19	26	50	104	125
20	30	58	113	145

(*) Studies performed for DIAsource ImmunoAssays S.A., Belgium based on samples from Belgium.

C. Oncology

AFP concentrations were measured in serum during disease- monitoring in three individual cases of cancer of different cell type origin.



XVII. PRECAUTIONS AND WARNINGS

Safety

For in vitro diagnostic use only.
This kit contains ¹²⁵I (half-life: 60 days) ,emitting ionizing X (28 keV) and γ (35.5 keV) radiations.
This radioactive product can be transferred to and used only by authorized persons; purchase, storage, use and exchange of radioactive products are subject to the legislation of the end user's country. In no case the product must be administered to humans or animals.
All radioactive handling should be executed in a designated area, away from regular passage. A logbook for receipt and storage of radioactive materials must be kept in the lab. Laboratory equipment and glassware, which could be contaminated with radioactive substances, should be segregated to prevent cross contamination of different radioisotopes.
Any radioactive spills must be cleaned immediately in accordance with the radiation safety procedures. The radioactive waste must be disposed of following the local regulations and guidelines of the authorities holding jurisdiction over the laboratory. Adherence to the basic rules of radiation safety provides adequate protection.
The human blood components included in this kit have been tested by European approved and/or FDA approved methods and found negative for HBsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 and 2. No known method can offer complete assurance that human blood derivatives will not transmit hepatitis, AIDS or other infections. Therefore, handling of reagents, serum or plasma specimens should be in accordance with local safety procedures.
All animal products and derivatives have been collected from healthy animals. Bovine components originate from countries where BSE has not been reported. Nevertheless, components containing animal substances should be treated as potentially infectious.
Avoid any skin contact with reagents (sodium azide as preservative). Azide in this kit may react with lead and copper in the plumbing and in this way form highly explosive metal azides. During the washing step, flush the drain with a large amount of water to prevent azide build-up.
Do not smoke, drink, eat or apply cosmetics in the working area. Do not pipette by mouth. Use protective clothing and disposable gloves.

XVIII. BIBLIOGRAPHY

1. CUCKLE, H.S., WALD, N.J. 1984.
Maternal serum alpha-fetoprotein measurement : a screening test for Down Syndrome.
Lancet, i:926
2. HUNTER, W.M. BUDD, P.S. 1981.
Immunoradiometric versusradioimmunoassay a comparison using alpha-fetoprotein as the model analyte.
J. of Immunol. Meth.45:255

3. KOHN, J. WEAVER, P.C. 1974.
Serum alpha-fetoprotein in hepatocellular carcinoma.
Lancet, i:334
4. KOHN, J., ORR, A.H. MC ELWAIN, T.J. et al.
Serum alpha-fetoprotein in patients with testicular tumours.
Lancet; II:433
5. NORGAARD-PENDERSEN, B. 1976.
Human alpha-fetoprotein - A review of recent methodological and clinical studies.
Scand. J. Immunol., Suppl. 4:7.
6. U.K. Collaborative study, First report. 1977.
Maternal serum alpha-fetoprotein measurement in antenatal screening for anencephaly and spina bifidein early pregnancy.
Lancet, i:1323.
7. JEVY, L.B. et al. 1995
Hepatocellular carcinoma in a pregnant woman detected by routine screening of maternal alpha-fetoprotein.
Am. J. Obstet. Gynecology, 172(1pt1):219-220.
8. VERLOES, A. et al. 1995.
A prenatal trisomy 21 screening program using AFP, hCG and free estriol assays on maternal dried blood.
Am. J. Obstet. Gynecology, 172(1pt1):167-179.
9. CHRISTMOS, J.T. et al. 1994.
The effect of fetomaternal bleeding of the risk of adverse pregnancy outcome in patients with elevated second trimester maternal serum alpha-fetoprotein levels.
Am. J. Obstet. Gynecology, 171(2):315-320.

XIX. SUMMARY OF THE PROTOCOL

	TOTAL COUNTS ml	CALIBRATORS ml	SAMPLE(S) CONTROLS ml
Calibrators (0 to 5) Samples, controls	- -	0.05 -	- 0.05
Incubation	1 hour at room temperature		
Separation	-	aspirate	
Wash solution	-	2.0	
Separation	-	aspirate	
Wash solution	-	2.0	
Separation	-	aspirate carefully	
Tracer	0.1	0.1	0.1
Incubation	1 hour at room temperature		
Separation	-	aspirate	
Wash solution	-	2.0	
Separation	-	aspirate carefully	
Counting	Count tubes for 60 seconds		

DIAsource Catalogue Nr : KIP0081 – KIP0084	P.I. Number : 1700503/en	Revision nr : 101028/1
---	-----------------------------	---------------------------

Lire entièrement le protocole avant utilisation.

AFP-IRMA

I. BUT DU DOSAGE

Trousse de dosage radio-immunométrique pour la mesure quantitative *in vitro* de l'alpha-foetoprotéine humaine (AFP) dans le sérum et le plasma humain.

Cette trousse n'est pas destinée à être utilisée pour évaluer le risque de trisomie 21.

II. INFORMATIONS GENERALES

- A. **Nom du produit :** DIASource AFP-IRMA kit
- B. **Numéro de catalogue :** KIP0081 : 96 tests
KIP0084 : 4 x 96 tests
- C. **Fabriqué par :** DIASource ImmunoAssays S.A.
Rue de l'Industrie, 8 B-1400 Nivelles Belgium.

Pour une assistance technique ou une information sur une commande :

Tel : +32 (0)67 88.99.99

Fax : +32 (0)67 88.99.96

III. CONTEXTE CLINIQUE

A. Introduction

L'α-Foetoprotéine (AFP) est une protéine oncofoetale avec un poids moléculaire de 70.000 Da, synthétisée par le foie, la vésicule vitelline et la zone gastro-intestinale du fœtus humain. Le sommet de la production de l'AFP a lieu entre la 12^e et la 15^e semaine de la grossesse. Après la naissance, la concentration en AFP dans le plasma décroît rapidement jusqu'à moins de 5 UI/ml. Les taux en AFP sont élevés lors de la situation clinique suivante :

B. Applications cliniques

Les applications cliniques principales des mesures de l'AFP se trouvent dans le domaine de l'observation de cancer après traitement. Pourtant, la mesure de l'AFP peut également avoir un intérêt clinique pour l'observation de la grossesse, si elle est appliquée au sérum ou au liquide amniotique.

- **Cancer**

- Carcinome hépatocellulaire
- Tératocarcinome et carcinome cellulaire embryonnaire du testicule et des ovaires
- Tumeur de la vésicule vitelline
- Autres cancers (moins de 5 %)

- **Maladies virales**

- hépatite aiguë (normalement < 100 UI/ml)
- hépatite active chronique (normalement < 100 UI/ml)

IV. PRINCIPLE DU DOSAGE

La trousse DIAsource AFP-Irma est une trousse de dosage radio-immunométrique à deux phases basée sur la séparation en tube recouvert d'anticorps. Mabs1, les anticorps de capture, sont attachés sur la surface basse et interne du tube plastic. Des calibrateurs ou des échantillons sont ajoutés aux tubes. Après incubation, le lavage enlève l'éventuel excès d'antigène. Mab 2 – l'anticorps marqué avec ¹²⁵I – est ajouté. Suite à l'incubation et au lavage, la radioactivité restante liée au tube reflètera la concentration de l'antigène. A cause de la concentration parfois extrêmement élevée de l'AFP dans le sérum (> 1 mg/ml) en cas de cancer, la trousse DIAsource AFP-IRMA a été développé avec une procédure à deux phases, afin d'éviter des effets crochet pour les doses élevées.

V. REACTIFS FOURNIS

Reactifs	96 tests Kit	4x96 tests Kit	Code Couleur	Reconstitution			
 Tubes recouverts avec l'anti AFP (anticorps monoclonal)	2 x 48	8 x 48	Rouge foncé	Prêt à l'emploi			
<table border="1"><tr><td>Ab</td><td>¹²⁵I</td></tr></table> TRACEUR: anti-AFP marquée à l' ¹²⁵ Iodine (anticorps monoclonaux) dans un tampon phosphate avec de l'albumine bovine, de l'azide de sodium (<0,1%) et un colorant rouge inactif	Ab	¹²⁵ I	1 flacon 10,5 ml 350 kBq	4 flacons 10,5 ml 4x350 kBq	Rouge	Prêt à l'emploi	
Ab	¹²⁵ I						
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>0</td></tr></table> Calibrateur zéro dans du sérum bovin, de l'azide de sodium (0,5%) et merthiolate	CAL	0	1 flacon 10 ml	2 flacons 10 ml	Jaune	Prêt à l'emploi	
CAL	0						
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>N</td></tr></table> Calibrateur N = 1 à 5 (cfr. Valeurs exactes sur chaque flacon) dans du sérum bovin et du thymol	CAL	N	5 flacons lyophilisés	2 x 5 flacons lyophilisés	Jaune	Ajouter 0,5 ml d'eau distillée	
CAL	N						
<table border="1"><tr><td>WASH</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table> Solution de Lavage (Tris-HCl)	WASH	SOLN	CONC	1 flacon 10 ml	4 flacons 10 ml	Brun	Diluer 70 x avec de l'eau distillée (utiliser un agitateur magnétique).
WASH	SOLN	CONC					
<table border="1"><tr><td>CONTROL</td><td>N</td></tr></table> Contrôles - N = 1 ou 2 dans du sérum humain et merthiolate	CONTROL	N	2 flacons lyophilisés	2 x 2 flacons lyophilisés	Gris	Ajouter 0,5 ml d'eau distillée	
CONTROL	N						

Note: 1. Utiliser le Calibrateur zéro pour la dilution des échantillons.
2. 1 UI de la préparation du calibrateur est équivalent à 1 UI 1st IRP 72/225.

VI. MATERIEL NON FOURNI

Le matériel mentionné ci-dessous est requis mais non fourni avec la trousse:

- 1. Eau distillée
- 2. Pipettes pour distribuer: 100 µl, 200 µl, 500 µl et 1 ml (l'utilisation de pipettes précises et de pointes jetables en plastique est recommandée)
- 3. Agitateur vortex
- 4. Agitateur magnétique
- 5. Seringue automatique de 5 ml (type Cornwall) pour les lavages
- 6. Système d'aspiration (optionnel)
- 7. Tout compteur gamma capable de mesurer l'¹²⁵I peut être utilisé (rendement minimum 70%).

VII. PREPARATION DES REACTIFS

- A. **Calibrateurs** : Reconstituer les calibrateurs 1-5 avec 0,5 ml d'eau distillée.
- B. **Contrôles** : Reconstituer les contrôles avec 0,5 ml d'eau distillée.
- C. **Solution de Lavage** : Préparer un volume adéquat de Solution de Lavage en ajoutant 69 volumes d'eau distillée à 1 volume de Solution de Lavage (70x). Utiliser un agitateur magnétique pour homogénéiser. Eliminer la Solution de Lavage non utilisée à la fin de la journée.

VIII. STOCKAGE ET DATE D'EXPIRATION DES REACTIFS

- Avant l'ouverture ou la reconstitution, tous les composants de la trousse sont stables jusqu'à la date d'expiration, indiquée sur l'étiquette, si la trousse est conservée entre 2 et 8°C.
- Après reconstitution, les calibrateurs et les contrôles sont stables pendant 7 jours entre 2 et 8°C. Pour de plus longues périodes de stockage, des aliquots devront être réalisés et ceux-ci seront gardés à -20°C pendant 3 mois au maximum. Eviter des cycles de congélation et décongélation successifs.
- La Solution de Lavage préparée doit être utilisée le jour même.
- Après la première utilisation, le traceur est stable jusqu'à la date d'expiration, si celui-ci est conservé entre 2 et 8°C dans le flacon d'origine correctement fermé.
- Des altérations dans l'apparence physique des réactifs de la trousse peuvent indiquer une instabilité ou une détérioration.

IX. PREPARATION ET STABILITE DE L'ECHANTILLON

- Les échantillons de sérum ou de plasma doivent être gardés entre 2 et 8°C.
- Si le test n'est pas réalisé dans les 24 heures, un stockage en aliquots à -20°C est recommandé.
- Eviter des cycles de congélation et décongélation successifs.
- Le sérum ou le plasma (EDTA ou héparinés) donne des résultats similaires.
Y (sérum) = 1,05x (plasma hép.) – 0,2 r = 0,98 n = 31
Y (sérum) = 1,05x (plasma EDTA) – 0,5 r = 0,99 n = 32

X. MODE OPERATOIRE

A. Notes de manipulation

Ne pas utiliser la trousse ou ses composants après avoir dépassé la date d'expiration. Ne pas mélanger du matériel provenant de trousses de lots différents. Mettre tous les réactifs à température ambiante avant utilisation.
Mélangez tous les réactifs et les échantillons sous agitation douce. Pour éviter toute contamination croisée, utiliser une nouvelle pointe de pipette pour l'addition de chaque réactif et échantillon.
Des pipettes de haute précision ou un équipement de pipetage automatique permettent d'augmenter la précision. Respecter les temps d'incubation. Préparer une courbe de calibration pour chaque nouvelle série d'expériences, ne pas utiliser les données d'expériences précédentes.

B. Mode opératoire

1. Identifier les tubes recouverts fournis dans la trousse, en double pour chaque calibrateur, échantillon, contrôle. Pour la détermination de l'activité totale, identifier 2 tubes non recouverts d' anticorps.
2. Agiter au vortex brièvement les calibrateurs, les contrôles et les échantillons. Puis distribuer 50 µl de chacun d'eux dans leurs tubes respectifs.
3. Agiter légèrement le portoir de tube manuellement pour libérer toute bulle d'air emprisonnée.
4. Incuber pendant 1 heure à température ambiante.
5. Aspirer (ou décanter) le contenu de chaque tube (à l'exception des tubes utilisés pour la détermination de l'activité totale). Assurez-vous que la pointe utilisée pour aspirer le liquide des tubes atteint le fond de chacun d'eux pour éliminer toute trace de liquide.
6. Laver les tubes 2 fois avec 2 ml de Solution de Lavage (à l'exception des tubes utilisés pour la détermination de l'activité totale) et aspirer (ou décanter). Eviter la formation de mousse pendant l'addition de la Solution de Lavage.
7. Après le dernier lavage, laisser les tubes droits pendant 2 minutes et aspirer (ou décanter) le reste de liquide.
8. Distribuer 100 µl de traceur dans chaque tube.
9. Agiter légèrement le portoir de tube manuellement pour libérer toute bulle d'air emprisonnée.
10. Incuber pendant 1 heure à température ambiante.
11. Aspirer (ou décanter) le contenu de chaque tube (à l'exception des tubes utilisés pour la détermination de l'activité totale). Assurez-vous que la pointe utilisée pour aspirer le liquide des tubes atteint le fond de chacun d'eux pour éliminer toute trace de liquide.
12. Laver les tubes avec 2 ml de Solution de Lavage (à l'exception des tubes utilisés pour la détermination de l'activité totale) et aspirer (ou décanter). Eviter la formation de mousse pendant l'addition de la Solution de Lavage.
13. Laisser les tubes droits pendant 2 minutes et aspirer (ou décanter) le reste de liquide.
14. Placer les tubes dans un compteur gamma pendant 60 secondes pour quantifier la radioactivité.

XI. CALCUL DES RESULTATS

- 1. Calculer la moyenne de chaque détermination réalisée en double.
- 2. Dessiner sur un graphique linéaire ou semi-logarithmique les cpm (ordonnées) pour chaque calibrateur contre la concentration correspondante en AFP (abscisses) et dessiner une courbe de calibration à l'aide des points de calibration, écarter les valeurs aberrantes.
- 3. Lire la concentration pour chaque contrôle et échantillon par interpolation sur la courbe de calibration.
- 4. L'analyse informatique des données simplifiera les calculs. Si un système d'analyse de traitement informatique des données est utilisé, il est recommandé d'utiliser la fonction « 4 paramètres » du lissage de courbes.

XII. DONNEES TYPES

Les données représentées ci-dessous sont fournies pour information et ne peuvent jamais être utilisées à la place d'une courbe de calibration.

AFP-IRMA		cpm	B/T (%)
Activité totale		133479	
Calibrateur	0,0 UI/ml	268	0,2
	5,3 UI/ml	2821	2,11
	15,0 UI/ml	6076	4,55
	45,0 UI/ml	19122	14,33
	155,0 UI/ml	44001	32,96
	440,0 UI/ml	66466	49,79

XIII. PERFORMANCE ET LIMITES DU DOSAGE

A. Sensibilité
Vingt calibrateurs zéro ont été testés en parallèle avec un assortiment d'autres calibrateurs. La limite de détection, définie comme la concentration apparente située 2 déviations standards au-dessus de la moyenne déterminée à la fixation zéro, était de 0,5 UI/ml.

B. Spécificité

La trousse AFP-IRMA ne présente pas de réactivité croisée avec des substances structuellement analogues. De l'albumine de sérum humain (HSA) avec une concentration de 60 ng/ml a été ajoutée à un calibrateur AFP bas (5 IU/ml) et haut (50 IU/ml), la réponse apparente de l'AFP a été mesurée.

	Valeur d'AFP observée IU/ml
Cal 5 IU/ml + HSA (60 ng/ml)	4,8
Cal 50 IU/ml + HSA (60 ng/ml)	49,0

P.S.: ce tableau montre la réactivité croisée de l' AFP-IRMA

C. Précision

INTRA-ESSAI				INTER-ESSAI			
Sérum	N	<X> ± SD (IU/ml)	CV (%)	Sérum	N	<X> ± SD (IU/ml)	CV (%)
A	10	4,2 ± 0,2	4,8%	E	22	7,8 ± 0,5	5,8%
B	10	11,4 ± 0,2	1,8%	F	22	19,8 ± 1,2	6,0%
C	10	26,2 ± 0,6	2,3%				
D	10	357 ± 19,6	5,5%				

SD : Déviation Standard; CV: Coefficient de variation

D. Exactitude

TEST DE RECUPERATION			
Echantillon	AFP ajoutée (IU/ml)	AFP récupérée (IU/ml)	Récupération (%)
Sérum 1	7,5	9,6	128%
	22,5	23,2	103%
	80	82,2	103%
Sérum 2	2,5	2,4	96%
	22,5	21,4	95%
	225	218	97%

TEST DE DILUTION			
Echantillon	Dilution	Concent. théorique (UI/ml)	Concent. Mesurée (UI/ml)
Sérum 1	1/1	-	444
	1/3	148,0	158
	1/6	74,0	86
	1/10	44,4	42
	1/50	8,9	9,8
Sérum 2	1/1	-	87,4
	1/2	43,7	39,6
	1/4	21,9	21,8
	1/10	8,7	9,0
	1/20	4,4	4,2

Les échantillons ont été dilués avec le calibrateur zéro.

E. Délai entre la distribution du dernier calibrateur et celle de l'échantillon

Comme montré ci-dessous, les résultats d'un essai restent précis même quand un échantillon est distribué 30 minutes après que le calibrateur a été ajouté aux tubes avec l'anticorps.

DELA			
Sérum (ng/ml)	0'	20'	30'
Sérum 1	12,7	11,0	10,1
Sérum 2	31,3	29,4	27,3

F. Effet crochet
Un échantillon dopé avec de l'AFP jusqu'à 1460000 UI/ml donne des cpm supérieurs au dernier point de calibration.

XIV. LIMITATIONS

- Les échantillons de patients ayant reçu des préparations d'anticorps monoclonaux de souris pour un diagnostic ou comme traitement peuvent contenir des anticorps humains anti-souris (HAMA). De tels échantillons peuvent montrer des valeurs soit faussement élevées soit faussement basses lorsqu'ils sont analysés avec des trousse d'analyses utilisant des anticorps monoclonaux de souris.
- Des anticorps hétérophiles dans le sérum humain peuvent réagir avec le réactif immunoglobulines, interférant ainsi avec les méthodes d'analyse immunologiques in vitro.
Les patients couramment en contact avec des animaux ou des produits de sérum animal peuvent être sujets à ces interférences. Des valeurs anormales peuvent être observées en cas de présence d'anticorps hétérophiles. Évaluer soigneusement les résultats des patients suspectés d'avoir ces anticorps.
Si les résultats ne sont pas cohérents avec les autres observations cliniques, des informations supplémentaires doivent être demandées avant de poser le diagnostic.

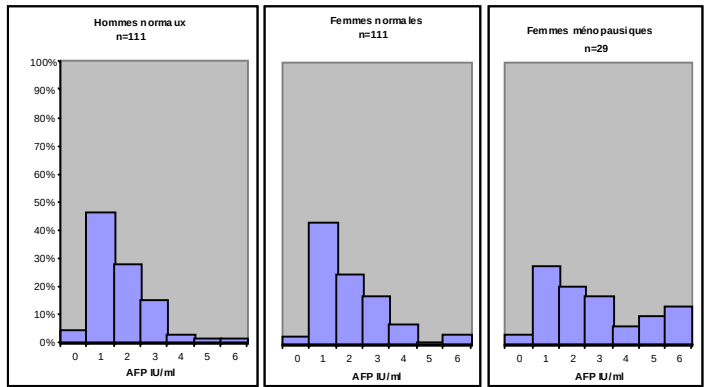
XV. CONTROLE QUALITE INTERNE

- Si les résultats obtenus pour le(s) contrôle(s) 1 et/ou 2 ne sont pas dans l'intervalle spécifié sur l'étiquette du flacon, les résultats ne peuvent pas être utilisés à moins que l'on ait donné une explication satisfaisante de la non-conformité.
- Chaque laboratoire est libre de faire ses propres stocks d'échantillons contrôles, lesquels doivent être congelés aliquotés.
- Les critères d'acceptation pour les écarts des valeurs in duplo des échantillons doivent être basés sur les pratiques de laboratoire courantes.

XVI. VALEURS ATTENDUES

Les valeurs sont données à titre d'information; chaque laboratoire doit établir ses propres écarts de valeurs.

A. Individus sains qui ne sont pas en état de grossesse



B. Grossesse (*)

Sérum maternel

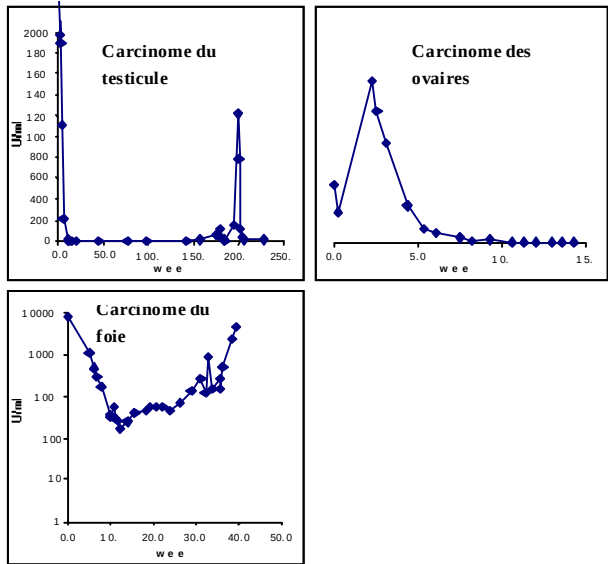
La distribution des valeurs de sérum pendant une grossesse normale. Les limites normales supérieures ont été obtenues par l'expression des données comme la médiane multipliée par 2,5.

Semaine de la grossesse	Valeurs inférieures Percentile 2,5 (UI AFP/ml)	Médiane (UI AFP/ml)	Valeurs supérieures Percentile 97,5 (UI AFP/ml)	2,5 Médiane (UI AFP/ml)
15	11,1	21	59	52,5
16	15,1	28	73	70
17	19,0	36	84	90
18	23	42	93	105
19	26	50	104	125
20	30	58	113	145

(*) Etudes effectuées pour DIAsource ImmunoAssays S.A., Belgium, basées sur des échantillons belges.

C. Oncologie

Lors de l'observation de la maladie, les concentrations en AFP ont été mesurées pour trois cas individuels de cancer d'origine cellulaire différente.



XVII. PRECAUTIONS ET AVERTISSEMENTS

Sécurité

Pour utilisation en diagnostic *in vitro* uniquement. Cette trousse contient de l'125I (demi-vie: 60 jours), une matière radioactive émettant des rayonnements ionisants X (28 keV) et γ (35.5 keV). Ce produit radioactif peut uniquement être reçu, acheté, possédé ou utilisé par des personnes autorisées; l'achat, le stockage, l'utilisation et l'échange de produits radioactifs sont soumis à la législation du pays de l'utilisateur final. Ce produit ne peut en aucun cas être administré à l'homme ou aux animaux. Toutes les manipulations radioactives doivent être exécutées dans un secteur désigné, éloigné de tout passage. Un journal de réception et de stockage des matières radioactives doit être tenu à jour dans le laboratoire. L'équipement de laboratoire et la verrerie, qui pourrait être

contaminée avec des substances radioactives, doivent être isolés afin d'éviter la contamination croisée de plusieurs isotopes. Toute contamination ou perte de substance radioactive doit être réglée conformément aux procédures de radio sécurité. Les déchets radioactifs doivent être placés de manière à respecter les réglementations en vigueur. L'adhésion aux règles de base de sécurité concernant les radiations procure une protection adéquate.

Les composants de sang humain inclus dans ce kit ont été évalués par des méthodes approuvées par l'Europe et/ou la FDA et trouvés négatifs pour HBsAg, l'anti-HCV, l'anti-HIV-1 et 2. Aucune méthode connue ne peut offrir l'assurance complète que des dérivés de sang humain ne transmettront pas d'hépatite, le sida ou toute autre infection. Donc, le traitement des réactifs, du sérum ou des échantillons de plasma devront être conformes aux procédures locales de sécurité. Tous les produits animaux et leurs dérivés ont été collectés d'animaux sains. Les composants bovins proviennent de pays où l'ESB n'a pas été détectée. Néanmoins, les composants contenant des substances animales devront être traités comme potentiellement infectieux.

L'azide de sodium est nocif s'il est inhalé, avalé ou en contact avec la peau (l'azide de sodium est utilisé comme agent conservateur). L'azide dans cette trousse pouvant réagir avec le plomb et le cuivre dans les canalisations et donner des composés explosifs, il est nécessaire de nettoyer abondamment à l'eau le matériel utilisé.

Ne pas fumer, ni boire, ni manger ni appliquer de produits cosmétiques dans les laboratoires où des produits radioactifs sont utilisés. Ne pas pipeter avec la bouche. Utiliser des vêtements protecteurs et des gants à usage unique.

XVIII. BIBLIOGRAPHIE

- CUCKLE, H.S., WALD, N.J. 1984.
Maternal serum alpha-fetoprotein measurement : a screening test for Down Syndrome.
Lancet, i:926
- HUNTER, W.M. BUDD, P.S. 1981.
Immunoradiometric versus radioimmunoassay a comparison using alpha-fetoprotein as the model analyte.
J. of Immunol. Meth.45:255
- KOHN, J. WEAVER, P.C. 1974.
Serum alpha-fetoprotein in hepatocellular carcinoma.
Lancet, i:334
- KOHN, J., ORR, A.H. MC ELWAIN, T.J. et al.
Serum alpha-fetoprotein in patients with testicular tumours.
Lancet; II:433
- NORGAARD-PENDERSEN, B. 1976.
Human alpha-fetoprotein - A review of recent methodological and clinical studies.
Scand. J. Immunol., Suppl. 4:7.
- U.K. Collaborative study, First report. 1977.
Maternal serum alpha-fetoprotein measurement in antenatal screening for anencephaly and spina bifida in early pregnancy.
Lancet, i:1323.
- JEVY, L.B. et al. 1995
Hepatocellular carcinoma in a pregnant woman detected by routine screening of maternal alpha-fetoprotein.
Am. J. Obstet. Gynecology, 172(1pt1):219-220.
- VERLOES, A. et al. 1995.
A prenatal trisomy 21 screening program using AFP, hCG and free estriol assays on maternal dried blood.
Am. J. Obstet. Gynecology, 172(1pt1):167-179.
- CHRISTMOS, J.T. et al. 1994.
The effect of fetomaternal bleeding of the risk of adverse pregnancy outcome in patients with elevated second trimester maternal serum alpha-fetoprotein levels.
Am. J. Obstet. Gynecology, 171(2):315-320.

XIX. RESUME DU PROTOCOLE

	ACTIVITE TOTALE (ml)	CALIBRA-TEURS (ml)	ECHANTIL-LON(S) CONTROLES (ml)
Calibrateurs (0-5) Echantillons, Contrôles	- -	0,05 -	- 0,05
Incubation	1 heure à température ambiante		
Séparation	-	aspiration	
Solution de Lavage	-	2,0	
Séparation	-	aspiration	
Solution de Lavage	-	2,0	
Séparation	-	aspiration	
Traceur	0,1	0,1	0,1
Incubation	1 heure à température ambiante		
Séparation	-	aspiration	
Solution de Lavage	-	2,0	
Séparation	-	aspiration	
Comptage	Temps de comptage des tubes: 60 secondes		

Numéro de catalogue DIASource : KIP0081 – KIP0084	Numéro de P.I.: 1700503/fr	Numéro de révision : 101028/1
---	-------------------------------	----------------------------------

Date de révision : 2010-10-28

Lees het hele protocol vóór gebruik.

AFP-IRMA

I. BEOOGD GEBRUIK

Immunoradiometrische testkit voor de in vitro kwantitatieve bepaling van humaan Alfa-Foetoproteïne (AFP) in serum en plasma.

Deze testkit mag niet worden gebruikt bij de evaluatie van het risico op trisomie 21.

II. ALGEMENE INFORMATIE

A. **Gedeponeerd handelsmerk:** DIAsource AFP-IRMA kit

B. **Catalogusnummer:** KIP0081: 96 testen
KIP0084: 4 x 96 testen

C. **Geproduceerd door:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue de l'Industrie 8, B-1400 Nivelles, België.

Voor technische assistentie of voor bestelinformatie kunt u contact opnemen met:

Tel.: +32 (0)67 88 99 99 - Fax: +32 (0)67 88 99 96

III. KLINISCHE ACHTERGROND

A. Inleiding

α -Foetoproteïne (AFP) is een oncofoetaal proteïne met een moleculair gewicht 70.000 Da dat gesynthetiseerd wordt door parenchymale cellen van de lever, de dooierzak en de gastro-intestinale zone van de menselijke foetus. De piek van AFP-concentratie doet zich voor tussen de 12e en de 15e week van de zwangerschap. Na de geboorte neemt de AFP-concentratie in plasma snel af tot minder dan 5 IU/ml. De AFP-niveaus zijn hoog bij de volgende klinische situatie:

B. Klinische toepassingen

De belangrijkste toepassingen van het bepalen van AFP behelzen de opvolging van kanker na behandeling. Nochtans kan de bepaling van AFP ook een klinisch belang hebben bij de opvolging van zwangerschap als zij toegepast wordt op serum of amniotisch fluïdum.

- **Kanker**

- . Hepatocellulair carcinoma
- . Teratocarcinoma en embryonale celkanker van de testikels en de eierstokken
- . Tumor aan de dooierzak
- . Andere kankers (minder dan 5 %).

- **Virale aandoeningen**

- . Acute hepatitis (gewoonlijk < 100 IU/ml)
- . Chronische actieve hepatitis (gewoonlijk < 100 IU/ml).

IV. BESCHRIJVING VAN DE METHODE

AFP-Irma van DIAsource is een immunoradiometrisch testkit in twee fasen die gebaseerd is op een scheiding aan de hand van een gecoate buis. Mabs1, de invangantilichamen, zijn onderaan aan het binnenoppervlak van de plastic buis gehecht. Kalibrators of monsters worden toegevoegd aan de buisjes. Na incubatie verwijdert een wasfase het gebeurlijke teveel aan antigenen. Mab 2 - het met ¹²⁵I gelabelde antilichaam – wordt toegevoegd. Na incubatie en de wasfase geeft de overblijvende radioactiviteit, gebonden aan de buis, de antigeenconcentratie weer. Omwille van de soms bijzonder hoge concentratie van AFP in serum (> 1 mg/ml) in geval van kanker, is deze DIAsource AFP-IRMA ontwikkeld in een procedure met twee fasen om het “hook effect” bij hoge doses te vermijden.

V. GELEVERDE REAGENTIA

Reagentia	Kit met 96 testen	Kit met 4 x 96 testen	Kleur-Code	Reconstitutie			
 buizen gecoat met anti-AFP (monoklonale antilichamen)	2 x 48	8 x 48	Donker rood	Klaar voor gebruik			
<table border="1"><tr><td>Ab</td><td>¹²⁵I</td></tr></table> TRACER: Anti-AFP (monoklonale antilichamen) gelabeld met ¹²⁵ jood in fosfaat buffer met bovien serumalbumine, azide (< 0,1%) en een inerte rode kleurstof	Ab	¹²⁵ I	1 flacon 10,5 ml 350 kBq	4 flacons 10,5 ml 4x350 kBq	Rood	Klaar voor gebruik	
Ab	¹²⁵ I						
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>0</td></tr></table> Nulkalibrator in bovien serum en azide (0.5%) en merthiolaat	CAL	0	1 flacon 10 ml	2 flacons 10 ml	Geel	Klaar voor gebruik	
CAL	0						
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>N</td></tr></table> Kalibrator - N = 1 tot 5 (raadpleeg de flaconetiketten voor de exacte waarden) in bovien serum en thymol	CAL	N	5 flacons, gevries-droogd	2 x 5 flacons, gevries-droogd	Geel	0,5 ml gedestilleerd water toevoegen	
CAL	N						
<table border="1"><tr><td>WASH</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table> Wasoplossing (Tris-HCl)	WASH	SOLN	CONC	1 flacon 10 ml	4 flacons 10 ml	Bruin	70 x met gedestilleerd water verdunnen (gebruik een magnetische roerder).
WASH	SOLN	CONC					
<table border="1"><tr><td>CONTROL</td><td>N</td></tr></table> Controles - N = 1 of 2 in humaan serum en merthiolaat	CONTROL	N	2 flacons, gevries-droogd	2 x 2 flacons, gevries-droogd	Zilver	0,5 ml gedestilleerd water toevoegen	
CONTROL	N						

Opmerking: 1. Gebruik de Nulkalibrator voor monsterverdunningen.
2. 1 IE van de kalibratorbereiding is gelijk aan 1 IE 1st IRP 72/225.

VI. NIET MEEGELEVERDE MATERIALEN

De volgende materialen zijn noodzakelijk maar worden niet meegeleverd met de kit:

- Gedestilleerd water.
- Pipetten voor een volume van 100 µl, 200 µl, 500 µl en 1 ml (het gebruik van nauwkeurige pipetten met plastic wegwerptips wordt aanbevolen).
- Automatische spuit van 5 ml (type Cornwall) voor de wasfase.
- Afzuigsysteem (facultatief).
- Vortexmenger.
- Magnetische roerder.
- Een gammateller die geschikt is voor de bepaling van ¹²⁵I (rendement van ten minste 70%).

VII. BEREIDING VAN HET REAGENS

- A. **Kalibrators:** Reconstitueer de kalibrators 1-5 met 0,5 ml gedestilleerd water.
- B. **Controles:** Reconstitueer de controles met 0,5 ml gedestilleerd water.
- C. **Werk-wasoplossing:** Bereid een voldoende hoeveelheid werk-wasoplossing door 69 eenheden gedestilleerd water toe te voegen aan 1 eenheid wasoplossing (70 x). Gebruik een magnetische roerder voor de homogenisering. Op het eind van de dag moet de ongebruikte werk-wasoplossing afgevoerd worden.

VIII. OPSLAG EN VERVALDATUM VAN REAGENTIA

- Vóór opening of reconstitutie zijn alle kitcomponenten houdbaar tot de vervaldatum, zoals vermeld op het etiket, indien zij bewaard werden bij 2 tot 8°C.
- Na reconstitutie zijn de kalibrators en controles gedurende 7 dagen houdbaar bij 2 tot 8°C. Voor een langere bewaartermijn moeten aliquots gemaakt worden, die bij –20°C bewaard moeten worden voor maximaal 3 maanden. Vermijd opeenvolgende cycli van bevriezen en ontdooien.
- Een vers bereide werk-wasoplossing moet op dezelfde dag nog gebruikt worden.
- Na het eerste gebruik is de tracer houdbaar tot de vervaldatum, indien bewaard bij 2 tot 8°C in de oorspronkelijke, goed afgesloten flacon.
- Wijzigingen in het fysieke aspect van kitreagentia kunnen wijzen op instabiliteit of op een kwaliteitsvermindering.

IX. MONSTERAFNAME EN MONSTERBEREIDING

- Serum en plasma moeten bij 2 tot 8°C bewaard worden.
- Indien de bepaling niet binnen 24 uur uitgevoerd wordt, dan wordt aanbevolen om ze, in aliquots, bij –20°C te bewaren.
- Vermijd opeenvolgende cycli van bevriezen en ontdooien
- Serum en plasma (EDTA en heparine) leveren vergelijkbare resultaten op.
Y (serum) = 1,05x (Hep. plasma) – 0,2 r = 0,98 n = 31
Y (serum) = 1,05x (EDTA plasma) – 0,5 r = 0,99 n = 32

X. PROCEDURE

- A. **Opmerkingen bij de procedure**
Gebruik de kit of de componenten niet langer dan de aangegeven vervaldatum. Materialen van kits van verschillende loten mogen niet gemengd worden. Laat alle reagentia op kamertemperatuur komen vóór gebruik.
Meng alle reagentia en monsters goed door ze voorzichtig te bewegen of door er voorzichtig mee te draaien. Om kruisbesmetting te vermijden, moet een propere wegwerpbare pipettip gebruikt worden voor toevoeging van elk reagens en monster.
Pipetten met een grote precisie of geautomatiseerde pipetteerapparatuur zullen de precisie verhogen. Respecteer de incubatietijden.
Bereid een kalibratiecurve voor elke run; men mag geen gegevens gebruiken van voorafgaande runs.

- B. **Procedure**
- Etiketeer de gecoate buisjes in duplo voor elke kalibrator, voor elke controle en voor elk monster. Etiketeer 2 normale buizen voor de bepaling van de totaal tellingen.
 - Vortex de kalibrators, controles en monsters gedurende korte tijd en pipetteer 50 µl van elk in de desbetreffende buis .
 - Schud het rek met de buizen voorzichtig met de hand zodat eventueel ingesloten luchtballen vrijkomen.
 - Incubeer gedurende 1 uur bij kamertemperatuur.
 - Zuig de inhoud van elke buis (met uitzondering van de totaal tellingen) op (of decanteer) Zorg ervoor dat de plastic tip van de aspirator tot aan de bodem van de gecoate buis komt zodat alle vloeistof verwijderd wordt.
 - Was de buizen tweemaal met 2 ml werk-wasoplossing (met uitzondering van de totaal tellingen). Vermijd schuimvorming tijdens toevoeging van de werk-wasoplossing.
 - Na de laatste wasfase moeten de buizen gedurende twee minuten rechtop blijven staan en zuig daarna de overblijvende vloeistof op.
 - Pipetteer 100 µl van de tracer in elke buis.
 - Schud het rek met de buizen voorzichtig met de hand zodat eventueel ingesloten luchtballen vrijkomen.
 - Incubeer gedurende 1 uur bij kamertemperatuur.
 - Zuig de inhoud van elke buis (met uitzondering van de totaal tellingen) op (of decanteer) Zorg ervoor dat de plastic tip van de aspirator tot aan de bodem van de gecoate buis komt zodat alle vloeistof verwijderd wordt.
 - Was de buizen met 2 ml werk-wasoplossing (met uitzondering van de totaal tellingen) en zuig de inhoud van elke buis op (of decanteer). Vermijd schuimvorming tijdens toevoeging van de werk-wasoplossing.
 - Laat de buizen gedurende twee minuten rechtop staan en zuig daarna de overblijvende vloeistof op.
 - Tel de buizen in een gammateller gedurende 60 seconden.

XI. BEREKENING VAN DE RESULTATEN

1. Bereken het gemiddelde voor de bepalingen in duplo.
2. Zet de cpm (ordinaat) uit voor elke kalibrator tegen de overeenkomstige AFP -concentratie (abscis) op semi-logaritmisch of lineair millimeterpapier en teken een kalibratiecurve door de kalibratiepunten, waarbij de duidelijke uitschieters verworpen worden.
3. Lees door interpolatie de concentratie voor elke controle en voor elk monster op de kalibratiecurve.
4. Door computergestuurde gegevensreductie worden deze berekeningen vereenvoudigd.
Indien de resultaten automatisch verwerkt worden, wordt de 4 parameter logistische functie aanbevolen voor de gepaste curve.

XII. KENMERKENDE GEGEVENS

De volgende gegevens dienen enkel ter illustratie en mogen in geen geval gebruikt worden ter vervanging van de real time kalibratiecurve.

AFP-IRMA		cpm	B/T (%)
Totaaltelling		133479	
Kalibrator	0,0 IU/ml	268	0,2
	5,3 IU/ml	2821	2,11
	15,0 IU/ml	6076	4,55
	45,0 IU/ml	19122	14,33
	155,0 IU/ml	44001	32,96
	440,0 IU/ml	66466	49,79

XIII. EIGENSCHAPPEN EN GRENZEN

- A. **Detectielimiet**
Twintig nulkalibrators werden bepaald, samen met een reeks andere kalibrators. De detectielimiet, omschreven als de schijnbare concentratie van twee standaarddeviaties boven de gemiddelde tellingen bij nulbinding, bedroeg 0,5 IE/ml.
- B. **Specificiteit**
De AFP-IRMA vertoont geen kruisreactiviteit met structureel verwante substanties. Humaan serumalbumine (HSA) bij een concentratie van 60 ng/ml is toegevoegd aan een lage (5 IU/ml) en een hoge (50 IU/ml) AFP Kalibrator, de schijnbare AFP-respons werd gemeten.

	Waargenomen AFP-waarde IU/ml
Cal 5 IU/ml + HSA (60 ng/ml) Cal 50 IU/ml + HSA (60 ng/ml)	4,8 49,0

Opmerking: deze tabel toont de kruisreactiviteit voor de AFP-IRMA.

C. **Precisie**

BINNEN EEN TEST				TUSSEN TESTEN			
Serum	N	<X> ± SD (IE/ml)	VC (%)	Serum	N	<X> ± SD (IE/ml)	VC (%)
A	10	4,2 ± 0,2	4,8%	E	22	7,8 ± 0,5	5,8%
	10	11,4 ± 0,2	1,8%		22	19,8 ± 1,2	6,0%
	10	26,2 ± 0,6	2,3%				
	10	357 ± 19,6	5,5%				

SD: standaarddeviatie; VC: variatiecoëfficiënt

D. **Nauwkeurigheid**

RECOVERY –TEST			
Monster	Toegevoegd AFP (IE/ml)	Recovery van AFP (IE/ml)	Recovery (%)
Serum 1	7,5	9,6	128%
	22,5	23,2	103%
	80	82,2	103%
Serum 2	2,5	2,4	96%
	22,5	21,4	95%
	225	218	97%

Monster	Verdunning	Theoretische concentratie (IE/ml)	Concentratie die bepaald werd (IE/ml)
Serum 1	1/1	-	444
	1/3	148,0	158
	1/6	74,0	86
	1/10	44,4	42
	1/50	8,9	9,8
Serum 2	1/1	-	87,4
	1/2	43,7	39,6
	1/4	21,9	21,8
	1/10	8,7	9,0
	1/20	4,4	4,2

De stalen zijn verdund met de nulkalibrator.

- F. **Tijdspanne tussen de laatste kalibrator en distributie van het monster**
Zoals hieronder weergegeven wordt, blijven de resultaten van de bepaling nauwkeurig, zelfs wanneer een monster 30 minuten na toevoeging van de kalibrator in de gecoate buizen gepipetteerd wordt.

TIJDSPANNE			
Serum (ng/ml)	0'	20'	30'
Serum 1 Serum 2	12,7 31,3	11,0 29,4	10,1 27,3

- G. **"Hook"-effect**
Een monster, waaraan 1460000 IE/ml AFP werd toegevoegd, levert hogere tellingen op dan het laatste kalibratiepunt.

XIV. BEPERKINGEN

- Specimens van patiënten die voor de diagnose of behandeling preparaten hebben gekregen van monoklonale antilichamen van muizen kunnen humane anti-muis-antilichamen (HAMA) bevatten. Dergelijke specimens kunnen ofwel vals-verhoogde of vals-verlaagde waarden vertonen wanneer ze met testkits worden getest waarbij gebruik wordt gemaakt van monoklonale antilichamen van muizen.
- Heterofiele antilichamen in humaan serum kunnen reageren met reagensimmunoglobulinen, wat een effect kan hebben op in vitro immunoassays.
Patiënten die regelmatig aan dieren of dierlijke serumproducten worden blootgesteld, kunnen vatbaar zijn voor een dergelijk effect, terwijl afwijkende waarden kunnen worden waargenomen wanneer heterofiele antilichamen aanwezig zijn. Beoordeel de resultaten zorgvuldig van patiënten van wie vermoed wordt dat ze deze antilichamen hebben.
Als de resultaten niet overeenstemmen met andere klinische waarnemingen moet bijkomende informatie worden verkregen voordat de diagnose wordt gesteld.

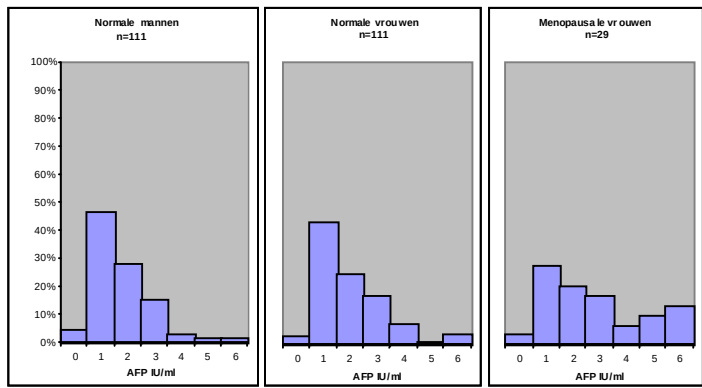
XV. INTERNE KWALITEITSCONTROLE

- Indien de resultaten, die verkregen werden voor controle 1 en/of controle 2, niet binnen het bereik vallen zoals vermeld op het flaconetiket, dan mogen de resultaten niet gebruikt worden tenzij een bevredigende uitleg gegeven wordt voor de discrepantie.
- Indien gewenst, kan elk laboratorium zijn eigen pools voor controlemonsters maken, die dan in aliquots bewaard moeten worden in de diepvriezer.
- Aanvaardingscriteria voor het verschil tussen de resultaten in duplo van monsters moeten steunen op gangbare laboratoriumpraktijken.

XVI. REFERENTIE-INTERVALS

Deze waarden worden slechts als leidraad gegeven; elk laboratorium moet zijn eigen normaal bereik van waarden uitmaken.

A. **Gezonde niet-zwangere individuen**



B. Zwangerschap(*)

Maternaal serum

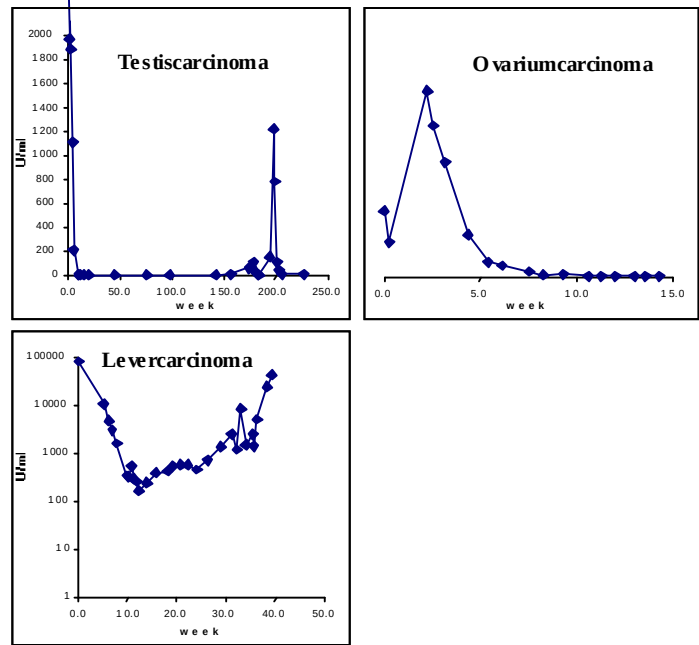
De distributie van serumwaarden bij normale zwangerschap. De normale bovenlimieten voor serummonsters zijn weergegeven als de mediaanwaarden vermenigvuldigd met 2,5

Week van de zwangerschap	Lagere waarden 2,5 Percentiel (IU AFP/ml)	Mediaan (IU AFP/ml)	Hogere waarden 97,5 Percentiel (IU AFP/ml)	2,5 Mediaan (IU AFP/ml)
15	11,1	21	59	52,5
16	15,1	28	73	70
17	19,0	36	84	90
18	23	42	93	105
19	26	50	104	125
20	30	58	113	145

(*) Studies uitgevoerd voor *DIASource ImmunoAssays S.A., Belgium*, gebaseerd op Belgische stalen.

C. Oncologie

AFP concentraties werden gemeten in serum tijdens de opvolging van de ziekte bij drie individuele gevallen van kanker van een verschillend celttype als oorsprong.



XVII. VOORZORGSMAATREGELEN EN WAARSCHUWINGEN

Veiligheid

Uitsluitend voor in vitro diagnostisch gebruik. Deze kit bevat ¹²⁵I (halfwaardetijd: 60 dagen), dat ioniserende X- (28 keV) en γ -stralen (35.5 keV) uitzendt. Dit radioactieve product mag enkel overhandigd worden aan en gebruikt worden door bevoegd personeel; ontvangst, opslag, gebruik en overdracht van radioactieve producten zijn onderworpen aan de wetgeving van het land van de eindgebruiker. In geen geval mag het product toegediend worden aan mensen of dieren. Alle handelingen met radioactief materiaal moeten plaatsvinden in een daartoe bestemde ruimte, waar uitsluitend bevoegd personeel toegelaten wordt. Een logboek met ontvangst en opslag van radioactieve materialen moet worden

bijgehouden in het laboratorium. Laboratoriumapparatuur en glaswerk, dat eventueel gecontamineerd werd met radioactieve bestanddelen, moeten worden gesegregeerd om kruisbesmetting van verschillende radioisotopen te vermijden. Als radioactief materiaal gemorst werd, dan moet dat onmiddellijk gereinigd worden in overeenstemming met de procedure voor stralingsveiligheid. Het radioactieve afval moet worden weggegooid in overeenstemming met de plaatselijke voorschriften en richtlijnen van de autoriteiten waaronder het laboratorium valt. Naleving van de basisregels van stralingsveiligheid zorgt voor een juiste bescherming.

De componenten, afkomstig van menselijk bloed, in deze kit werden getest door in Europa goedgekeurde en/of door de Amerikaanse FDA goedgekeurde methoden op aanwezigheid van HBsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 en 2 en gaven een negatief resultaat. Geen enkele bekende methode kan echter volledige garantie bieden dat derivaten van menselijk bloed geen hepatitis, aids of andere infecties overdragen. Daarom moet men reagentia, serum- of plasmamonsters behandelen in overeenstemming met de plaatselijke veiligheidsprocedures.

Alle producten en derivaten van dierlijke oorsprong zijn afkomstig van gezonde dieren. Boviene componenten komen uit landen waar BSE niet gerapporteerd werd. Toch moeten componenten die bestanddelen van dierlijke oorsprong bevatten, behandeld worden als potentieel infectieus materiaal.

Vermijd dat de reagentia (natriumazide als conserveermiddel) in contact komen met de huid. Azide in deze kit kan reageren met lood en koper in de afvoerleidingen en op die manier zeer explosieve metaalaziden vormen. Tijdens de wasfase moeten de afvoerleidingen ruimschoots met water nagespoeld worden om ophoping van azide te vermijden. Niet roken, drinken, eten of cosmetica aanbrengen in de werkruimte. Niet met de mond pipetteren.

Draag beschermende kleding en gebruik wegwerphandschoenen.

XVIII. BIBLIOGRAFIE

1. CUCKLE, H.S., WALD, N.J. 1984.
Maternal serum alpha-fetoprotein measurement : a screening test for Down Syndrome.
Lancet, i:926
2. HUNTER, W.M. BUDD, P.S. 1981.
Immunoradiometric versus radioimmunoassay a comparison using alpha-fetoprotein as the model analyte.
J. of Immunol. Meth.45:255
3. KOHN, J. WEAVER, P.C. 1974.
Serum alpha-fetoprotein in hepatocellular carcinoma.
Lancet, i:334
4. KOHN, J., ORR, A.H. MC ELWAIN, T.J. et al.
Serum alpha-fetoprotein in patients with testicular tumours.
Lancet; II:433
5. NORGAARD-PENDERSEN, B. 1976.
Human alpha-fetoprotein - A review of recent methodological and clinical studies.
Scand. J. Immunol., Suppl. 4:7.
6. U.K. Collaborative study, First report. 1977.
Maternal serum alpha-fetoprotein measurement in antenatal screening for anencephaly and spina bifida in early pregnancy.
Lancet, i:1323.
7. JEVY, L.B. et al. 1995
Hepatocellular carcinoma in a pregnant woman detected by routine screening of maternal alpha-fetoprotein.
Am. J. Obstet. Gynecology, 172(1pt1):219-220.
8. VERLOES, A. et al. 1995.
A prenatal trisomy 21 screening program using AFP, hCG and free estriol assays on maternal dried blood.
Am. J. Obstet. Gynecology, 172(1pt1):167-179.
9. CHRISTMOS, J.T. et al. 1994.
The effect of fetomaternal bleeding of the risk of adverse pregnancy outcome in patients with elevated second trimester maternal serum alpha-fetoprotein levels.
Am. J. Obstet. Gynecology, 171(2):315-320.

XIX. SAMENVATTING VAN HET PROTOCOL

	TOTAAL- TELLINGEN (ml)	KALIBRA- TORS (ml)	MONSTER(S) CONTROLES (ml)
Kalibrators (0 -5) Monsters, Controles	- -	0,05 -	- 0,05
Incubatie	1 uur bij kamertemperatuur		
Scheiding Werk-wasoplossing Scheiding Werk-wasoplossing Scheiding	- - - - -	opzuigen (of decanteren) 2,0 opzuigen (of decanteren) 2,0 opzuigen (of decanteren)	
Tracer	0,1	0,1	0,1
Incubatie	1 uur bij kamertemperatuur		
Scheiding Werk-wasoplossing Scheiding	- - -	opzuigen (of decanteren) 2,0 opzuigen (of decanteren)	
Telling	Tel de buisjes gedurende 60 seconden		

DIAsource catalogusnummer: KIP0081 – KIP0084	Nummer van de bijsluiter: 1700503/nl	Revisienummer: 101028/1
---	--	----------------------------

Revisiedatum : 2010-10-28

Prima di utilizzare il kit leggere attentamente le istruzioni per l'uso

AFP-IRMA

I. USO DEL KIT

Kit radioimmunologico per la determinazione quantitativa in vitro dell'Alfafetoproteina umana (AFP) in siero e plasma.

Tale kit non è indicato per valutazione del rischio di trisomia 21.

II. INFORMAZIONI DI CARATTERE GENERALE

- A. Nome commerciale:** DIAsource AFP-IRMA Kit
- B. Numero di catalogo:** KIP0081: 96 test
KIP0084: 4 x 96 test
- C. Prodotto da:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue de l'Industrie, 8, B-1400 Nivelles, Belgio.

Per informazioni tecniche o su come ordinare il prodotto contattare:
Tel: +32 (0) 67 88.99.99 Fax: +32 (0) 67 88.99.96

III. INFORMAZIONI CLINICHE

A. Introduzione

L' α -Fetoproteina (AFP), è una proteina oncofetale di peso molecolare pari a 70.000 Da che viene sintetizzata dalle cellule del parenchima epatico, dal sacco vitellino e dal tratto gastrointestinale del feto. Il picco di AFP è riscontrabile tra la dodicesima e la quindicesima settimana di gravidanza. Dopo la nascita, la concentrazione di AFP nel plasma scende rapidamente fino a stabilizzarsi a livelli inferiori a 5 UI/ml. Livelli elevati di AFP sono evidenziabili nelle seguenti situazioni cliniche:

B. Applicazioni cliniche

Il dosaggio di AFP trova la sua principale applicazione nel monitoraggio di neoplasie in soggetti sottoposti a terapia. Quando effettuato su campioni di siero o liquido amniotico trova interesse clinico anche nel monitoraggio della gravidanza.

- **Cancro**
 - Epatocarcinoma
 - Teratocarcinoma e carcinoma embrionale testicolare e ovarico
 - Tumore del sacco vitellino
 - Altre neoplasie (meno del 5%)
- **Malattie virali**
 - Epatite acuta (generalmente < 100 UI/ml)
 - Epatite cronica attiva (generalmente < 100 UI/ml)

IV. PRINCIPIO DEL METODO

DIAsource AFP-IRMA è un dosaggio immunoradiometrico in due fasi, con separazione in provette preadsorbite. L'anticorpo di cattura Mab1 è preadsorbito sulla superficie interna della parte inferiore di provette di plastica. I calibratori e i campioni vengono distribuiti nelle provette. Dopo incubazione, il lavaggio rimuove l'eventuale eccesso di antigene. Viene quindi aggiunto l'anticorpo Mab2 marcato con ¹²⁵I. Dopo incubazione e lavaggio, la radioattività residua all'interno delle provette riflette la concentrazione dell'antigene. Considerati gli elevati livelli di AFP(>1 mg/ml) presenti in campioni di siero di pazienti con cancro, per evitare effetti hook dovuti a concentrazioni elevate, il test DIAsource AFP-IRMA sfrutta una tecnica a due fasi.

V. REATTIVI FORNITI

Reattivi	Kit da 96 test	Kit da 4x96 test	Codice colore	Volume di ricostituzione
 Provette sensibilizzate con anticorpo anti AFP (anticorpi monoclonali)	2 x 48	8 x 48	rosso scuro	Pronte per l'uso
Ab ¹²⁵I MARCATO Anti-AFP marcato con ¹²⁵Iodio (anticorpo monoclonale) in tampone fosfato con albumina di siero bovino, azide (0,1%) e un colorante rosso inerte	1 flacone 10,5 ml 350 kBq	4 flaconi 10,5 ml 4x350 kBq	Rosso	Pronte per l'uso
CAL 0 Calibratore Zero (0 UI/ml) in siero bovino con azide (0,5%) e metiolato	1 flacone 10 ml	2 flaconi 10 ml	Giallo	Pronte per l'uso
CAL N Calibratori AFP N. 1-5 (vedi valori esatti sulle etichette dei flaconi) in siero bovino con timolo	5 flaconi liofiliz.	2 x 5 flaconi liofiliz.	Giallo	Aggiungere 0,5 ml di acqua distillata
WASH SOLN CONC Tampone di lavaggio (TRIS-HCl)	1 flacone 10 ml	4 flaconi 10 ml	Bruno	Diluire 70 x con acqua distillata usando un agitatore magnetico
CONTROL N Controlli: N = 1 o 2, in siero umano con metiolato	2 flaconi liofiliz.	2 x 2 flaconi liofiliz.	silver	Aggiungere 0,5 ml di acqua distillata

Note : Per la diluizione dei campioni, utilizzare il calibratore zero. 1 UI della preparazione del calibratore equivale a 1 UI del 1° IRP 72/225

VI. REATTIVI NON FORNITI

- Il seguente materiale è richiesto per il dosaggio ma non è fornito nel kit.
- 1. Acqua distillata.
 - 2. Pipette per dispensare 100 µl, 200 µl, 500 µl e 1 ml (Si raccomanda di utilizzare pipette accurate con puntale in plastica monouso).
 - 3. Agitatore tipo vortex.
 - 4. Agitatore magnetico.
 - 5. Pipetta a ripetizione automatica 5 ml per i lavaggi. (tipo Cornwall)
 - 6. Sistema di aspirazione dei campioni (facoltativo).
 - 7. Contatore gamma con finestra per ¹²⁵I (efficienza minima 70%)

VII. PREPARAZIONE DEI REATTIVI

- A. **Calibratore:** Ricostituire i calibratori 1-5 con 0.5 ml di acqua distillata.
- B. **Controlli:** Ricostituire i controlli con 0,5 ml di acqua distillata.
- C. **Soluzione di lavoro del tampone di lavaggio:** Preparare la quantità necessaria di soluzione di lavoro del tampone di lavaggio aggiungendo 69 parti di acqua distillata ad una parte di tampone di lavaggio concentrato (70 x). Usare un agitatore magnetico per rendere la soluzione omogenea. La soluzione di lavoro va scartata al termine della giornata.

VIII. CONSERVAZIONE E SCADENZA DEI REATTIVI

- I reattivi non utilizzati sono stabili a 2-8°C fino alla data riportata su ciascuna etichetta.
- Dopo ricostituzione, i calibratori e i controlli mantengono la loro stabilità per una settimana a 2-8°C. Per periodi di conservazione più lunghi, suddividere in aliquote e conservare a -20°C per un massimo di 3 mesi.
- La soluzione di lavoro del tampone di lavaggio deve essere preparata fresca ogni volta e usata nello stesso giorno della preparazione.
- Dopo apertura del flacone, il marcato è stabile fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta, se conservato a -2-8°C nel flacone originale ben tappato.
- Alterazioni dell'aspetto fisico dei reattivi possono indicare una loro instabilità o deterioramento.

IX. RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

- I campioni di siero e di plasma devono essere conservati a 2-8°C.
- Se il test non viene eseguito entro 24 ore, suddividere in aliquote e conservare a -20°C. Evitare successivi congelamenti e scongelamenti Siero o plasma (EDTA o Eparina) forniscono risultati simili.
 $y(\text{siero}) = 1,05 \times (\text{plasma epar.}) - 0,2$ $r = 0,98$ $n = 31$
 $y(\text{siero}) = 1,05 \times (\text{plasma EDTA}) - 0,5$ $r = 0,99$ $n = 32$

X. METODO DEL DOSAGGIO

- A. **Avvertenze generali**
Non usare il kit o suoi componenti oltre la data di scadenza. Non mescolare reattivi di lotti diversi. Prima dell'uso portare tutti i reattivi a temperatura ambiente. Mescolare delicatamente i campioni per inversione o rotazione. Per evitare cross-contaminazioni, cambiare il puntale della pipetta ogni volta che si usi un nuovo reattivo o campione. L'uso di pipette ben tarate e ripetibili o di sistemi di pipettamento automatici migliora la precisione del dosaggio. Rispettare i tempi di incubazione. Allestire una curva di taratura per ogni seduta analitica, in quanto non è possibile utilizzare per un dosaggio curve di taratura di sedute analitiche precedenti.

B. Metodo del dosaggio

- 1. Numerare le provette sensibilizzate necessarie per dosare in duplicato ogni standard, campione o controllo. Numerare 2 provette non sensibilizzate per la determinazione dell'attività totale.
- 2. Agitare brevemente su vortex standard, campioni e controlli. Dispensare 50 µl di standard, campioni e controlli nelle rispettive provette.
- 3. Agitare manualmente con delicatezza il portaprovette in modo da eliminare eventuali bolle d'aria.
- 4. Incubare 60 minuti a temperatura ambiente.
- 5. Aspirare (o decantare) il liquido contenuto in tutte le provette, tranne in quelle per l'attività totale, facendo attenzione che il puntale dell'aspiratore raggiunga il fondo delle provette e che aspiri tutto il liquido.
- 6. Lavare le provette due volte con 2 ml di Soluzione di Lavoro del Tampone di Lavaggio (eccetto quelle per l'attività totale) e aspirare (o decantare) Evitando di provocare la formazione di schiuma.
- 7. Dopo il secondo lavaggio lasciare decantare le provette in posizione verticale per due minuti circa e aspirare eventuali gocce di liquido residue.
- 8. Dispensare 100 µl di marcato in tutte le provette, comprese quelle per l'attività totale.
- 9. Agitare manualmente con delicatezza il portaprovette in modo da eliminare eventuali bolle d'aria.
- 10. Incubare 60 minuti a temperatura ambiente.
- 11. Aspirare (o decantare) il liquido contenuto in tutte le provette, tranne in quelle per l'attività totale, facendo attenzione che il puntale dell'aspiratore raggiunga il fondo delle provette e che aspiri tutto il liquido.
- 12. Lavare tutte le provette, tranne quelle per l'attività totale, con 2 ml di soluzione di lavoro di tampone di lavaggio, e aspirare (o decantare) evitando di provocare la formazione di schiuma.
- 13. Lasciare le provette in posizione verticale per due minuti e aspirare le gocce residue di liquido.
- 14. Contare tutte le provette per 1 minuto con il contatore gamma.

XI. CALCOLO DEI RISULTATI

- 1. Calcolare la media delle determinazioni in duplicato.
- 2. Costruire la curva di calibrazione su carta millimetrata semilogaritmica o lineare ponendo in ordinata le medie dei colpi per minuto (cpm) dei replicati degli standard e in ascissa le rispettive concentrazioni di AFP Scartare i duplicati palesemente discordanti.
- 3. Determinare le concentrazioni e controlli per interpolazione sulla curva di taratura.
- 4. E' possibile utilizzare un sistema di interpolazione dati automatizzato. Con un sistema automatico di interpolazione dati, utilizzare la curva a 4 parametri.

XII. CARATTERISTICHE TIPICHE

I sotto riportati sono forniti a titolo di esempio e non devono essere utilizzati per calcolare le concentrazioni di AFP in campioni e controlli al posto della curva standard, che va eseguita per ogni dosaggio.

AFP-IRMA		cpm	B/T (%)
Attività totale		133479	
Calibratore	0,0 IU/ml	268	0,2
	5,3 IU/ml	2821	2,11
	15,0 IU/ml	6076	4,55
	45,0 IU/ml	19122	14,33
	155,0 IU/ml	44001	32,96
	440,0 IU/ml	66466	49,79

XIII. CARATTERISTICHE E LIMITI DEL METODO

A. Sensibilità

Venti replicati dello standard zero sono stati dosati insieme agli altri standard. Il limite di rilevazione, definito come concentrazione apparente più 2 deviazioni standard, del valore di cpm medio dello standard zero, è risultato pari a 0,5 UI/ml.

B. Specificità

AFP-IRMA non cross-reagisce con sostanze strutturalmente correlate . L’aggiunta di albumina sierica umana (HSA) a una concentrazione di 60 ng/ml ad un Calibratore AFP basso (5 UI/ml) e ad uno alto (50 UI/ml) ha dato luogo ai seguenti valori di AFP.

	Valore AFP osservato
	UI/ml
Cal 5 IU/ml + HSA (60 ng/ml)	4,8
Cal 50 IU/ml + HSA (60 ng/ml)	49,0

Note : Questa tabella mostra la reattività crociata per AFP-IRMA.

C. Precisione

INTRA SAGGIO				INTER SAGGIO			
Siero	N	<X> ± SD (UI/ml)	CV (%)	Siero	N	<X> ± SD (UI/ml)	CV (%)
A	10	4,2 ± 0,2	4,8%	E	22	7,8 ± 0,5	5,8%
B	10	11,4 ± 0,2	1,8%	F	22	19,8 ± 1,2	6,0%
C	10	26,2 ± 0,6	2,3%				
D	10	357 ± 19,6	5,5%				

SD : Deviazione Standard; CV: Coefficiente di Variazione

D. Accuratezza

TEST DI DILUIZIONE			
Campione	Diluizione	Concentrazione teorica (UI/ml)	Concentrazione misurata (UI/ml)
Siero 1	1/1	-	444
	1/3	148,0	158
	1/6	74,0	86
	1/10	44,4	42
	1/50	8,9	9,8
Siero 2	1/1	-	87,4
	1/2	43,7	39,6
	1/4	21,9	21,8
	1/10	8,7	9,0
	1/20	4,4	4,2

I campioni sono stati diluiti con calibratore zero.

TEST DI RECUPERO			
Campione	ACTH aggiunta (UI/ml)	ACTH recuperata (UI/ml)	Recupero (%)
Siero 1	7,5	9,6	128%
	22,5	23,2	103%
	80	82,2	103%
Siero 2	2,5	2,4	96%
	22,5	21,4	95%
	225	218	97%

E. Tempo trascorso tra l’aggiunta dell’ultimo calibratore e il campione

Come mostrato nella seguente tabella, il dosaggio si mantiene accurato anche quando un campione viene aggiunto nelle provette sensibilizzate 30 minuti dopo l’aggiunta del calibratore

TEMPO TRASCORSO			
Siero (ng/ml)	0'	20'	30'
Siero 1	12,7	11,0	10,1
Siero 2	31,3	29,4	27,3

F. Effetto hook

Un campione arricchito con AFP a concentrazioni fino a 1460000 UI/ml ha prodotto valori di conteggio superiori a quelli dell’ultimo punto di calibrazione.

XIV. LIMITAZIONI

- Campioni di pazienti che abbiano assunto preparazioni a base di anticorpi monoclonali murini a scopo diagnostico o terapeutico potrebbero contenere anticorpi umani antimurini (HAMA). Tali campioni, quando testati con metodiche basate sull’impiego di anticorpi monoclonali murini, potrebbero produrre valori falsamente elevati o ridotti.
- Nell’esecuzione di tecniche di immunodosaggio in vitro, la presenza in campioni di siero umano di anticorpi eterofili che possono reagire con immunoglobuline reattive può dar luogo ad interferenze. Pazienti sistematicamente esposti al contatto con animali o con prodotti derivanti da siero animale possono essere oggetto di tale tipo di interferenza, con conseguente riscontro di risultati anomali in caso di presenza di anticorpi eterofili. Si raccomanda pertanto di valutare attentamente i risultati relativi ai pazienti con sospetta presenza di tale tipo di anticorpo. Qualora i risultati non fossero in linea con le altre osservazioni cliniche si renderà necessaria la raccolta di ulteriori informazioni prima della formulazione di una diagnosi.

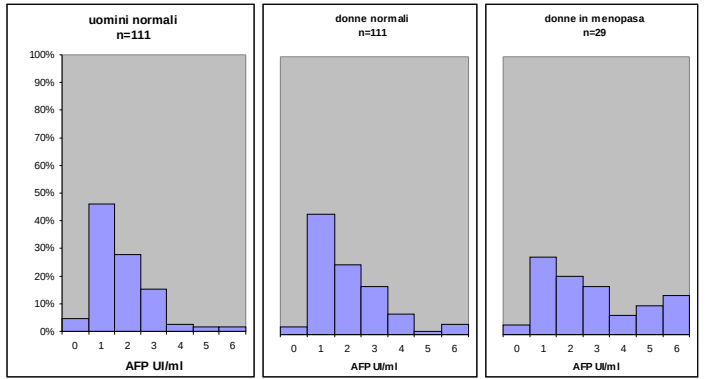
XV. CONTROLLO DI QUALITA’ INTERNO

- Se i risultati ottenuti dosando il Controllo 1 e il Controllo 2 non sono all’interno dei limiti riportati sull’etichetta dei flaconi, non è opportuno utilizzare i risultati ottenuti per i campioni, a meno che non si trovi una giustificazione soddisfacente.
- Ogni laboratorio può preparare un proprio pool di sieri da utilizzare come controllo, da conservare congelato in aliquote. Non congelare e scongelare un’aliquota più di due volte.
- I criteri di accettazione delle differenze tra i risultati in duplicato dei campioni devono basarsi sulla buona prassi di laboratorio.

XVI. INTERVALLI DI RIFERIMENTO

Questi valori vengono dati solo come guida; ogni laboratorio deve stabilire i propri intervalli normali di valori

A. Soggetti sani non in gravidanza



B. Gravidanza (*)

Siero materno

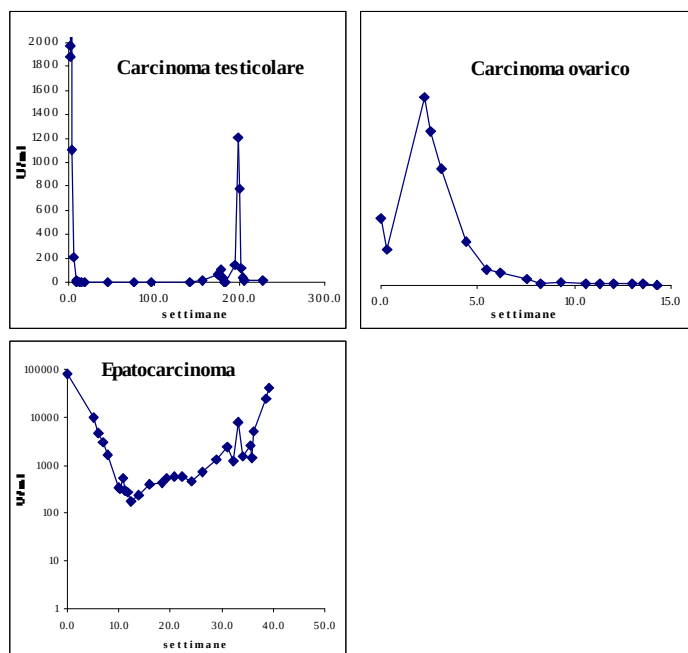
La distribuzione dei valori del siero in una normale gravidanza. I limiti normali superiori per i campioni di siero sono stati ottenuti esprimendo i dati come valore mediano moltiplicato per 2,5.

settimana di gravidanza	Valori inferiori Percentile 2,5 (UI AFP/ml)	Mediana (UI AFP/ml)	Valori superiori Percentile 97,5 (UI AFP/ml)	2,5 x Mediana (UI AFP/ml)
15	11,1	21	59	52,5
16	15,1	28	73	70
17	19,0	36	84	90
18	23	42	93	105
19	26	50	104	125
20	30	58	113	145

(*) Studi effettuati per DIAsource ImmunoAssays S.A.. Belgio, su campioni provenienti dal Belgio.

C. Oncologia

I livelli di AFP sono state misurati in campioni di siero di tre differenti soggetti con cancro di diversa origine cellulare, durante il monitoraggio della malattia.



XVII. PRECAUZIONI PER L'USO

Sicurezza

Il kit è solo per uso diagnostico in vitro.

Il kit contiene ^{125}I (emivita: 60 giorni) emettente raggi X (28 keV) e γ (35.5 keV) ionizzanti.

L'acquisto, a detenzione, l'utilizzo e il trasporto di materiale radioattivo sono soggetti a regolamentazione locale. In nessun caso il prodotto può essere somministrato ad esseri umani o animali.

Usare sempre guanti e camici da laboratorio quando si manipola materiale radioattivo. Le sostanze radioattive devono essere conservate in propri contenitori in appositi locali che devono essere interdetti alle persone non autorizzate. Deve essere tenuto un registro di carico e scarico del materiale radioattivo. Il materiale di laboratorio e la vetreria deve essere dedicato all'uso di isotopi specifici per evitare cross-contaminazioni.

In caso di contaminazione o dispersione di materiale radioattivo, fare riferimento alle norme locali di radioprotezione. I rifiuti radioattivi devono essere smaltiti secondo le norme locali di radioprotezione. Lo scrupoloso rispetto delle norme per l'uso di sostanze radioattive fornisce una protezione adeguata agli utilizzatori.

I reattivi di origine umana presenti nel kit sono stati dosati con metodi approvati da organismi di controllo europei o da FDA e si sono rivelati negativi per HBs Ag, anti HCV, anti HIV1 e anti HIV2. Non sono disponibili metodi in grado di offrire la certezza assoluta che derivati da sangue umano non possano provocare epatiti, AIDS o trasmettere altre infezioni. Manipolare questi reattivi o i campioni di siero o plasma secondo le procedure di sicurezza vigenti.

Tutti i prodotti di origine animale o loro derivati provengono da animali sani. I componenti di origine bovina provengono da paesi dove non sono stati segnalati casi di BSE. E' comunque necessario considerare i prodotti di origine animale come potenziali fonti di infezioni.

Evitare ogni contatto dell'epidermide con i reattivi contenenti sodio azide come conservante. La sodio azide può reagire con piombo rame o ottone presenti nelle

tubature di scarico per formare metallo-azidi esplosive. Smaltire questi reattivi facendo scorrere abbondante acqua negli scarichi.

Nei luoghi dove si usano sostanze radioattive non è consentito consumare cibi o bevande, fumare o usare cosmetici. Non pipettare i reattivi con pipette a bocca.

XVIII. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

1. CUCKLE, H.S., WALD, N.J. 1984.
Maternal serum alpha-fetoprotein measurement : a screening test for Down Syndrome.
Lancet, i:926
2. HUNTER, W.M. BUDD, P.S. 1981.
Immunoradiometric versusradioimmunoassay a comparison using alpha-fetoprotein as the model analyte.
J. of Immunol. Meth.45:255
3. KOHN, J. WEAVER, P.C. 1974.
Serum alpha-fetoprotein in hepatocellular carcinoma.
Lancet, i:334
4. KOHN, J., ORR, A.H. MC ELWAIN, T.J. et al.
Serum alpha-fetoprotein in patients with testicular tumours.
Lancet; II:433
5. NORGAARD-PENDERSEN, B. 1976.
Human alpha-fetoprotein - A review of recent methodological and clinical studies.
Scand. J. Immunol., Suppl. 4:7.
6. U.K. Collaborative study, First report. 1977.
Maternal serum alpha-fetoprotein measurement in antenatal screening for anencephaly and spina bifidein early pregnancy.
Lancet, i:1323.
7. JEVY, L.B. et al. 1995
Hepatocellular carcinoma in a pregnant woman detected by routine screening of maternal alpha-fetoprotein.
Am. J. Obstet. Gynecology, 172(1pt1):219-220.
8. VERLOES, A. et al. 1995.
A prenatal trisomy 21 screening program using AFP, hCG and free estriol assays on maternal dried blood.
Am. J. Obstet. Gynecology, 172(1pt1):167-179.
9. CHRISTMOS, J.T. et al. 1994.
The effect of fetomaternal bleeding of the risk of adverse pregnancy outcome in patients with elevated second trimester maternal serum alpha-fetoprotein levels.
Am. J. Obstet. Gynecology, 171(2):315-320.

XIX. SCHEMA DEL DOSAGGIO

	Attività totale ml	Calibratore ml	Campioni Controlli ml
Calibratorre (0 to 5) Campioni, controlli	- -	0.05 -	- 0.05
Incubazione	60 minuti a temperatura ambiente		
Separazione	-	Aspirare	
Soluzione di lavoro	-	2	
tampone di lavaggio	-	Aspirare	
Separazione	-	2	
Soluzione di lavoro	-	Aspirare con cautela	
tampone di lavaggio	-		
Separazione	-		
Marcato	0,1	0,1	0,1
Incubazione	60 minuti a temperatura ambiente		
Separazione	-	aspirare	
Soluzione di lavoro	-	2,0	
tampone di lavaggio	-	aspirare con cautela	
Separazione	-		
Conteggio	Contare le provette per 1 minuto		

DIAsource Catalogue Nr : KIP0081 – KIP0084	P.I. Number : 1700503/it	Revision nr : 101028/1
---	-----------------------------	---------------------------

Data di revisione : 2010-10-28

Διαβάστε ολόκληρο το πρωτόκολλο πριν από τη χρήση.

AFP-IRMA

I. ΧΡΗΣΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΟΠΟΙΑ ΠΡΟΟΡΙΖΕΤΑΙ

Ανοσοραδιομετρικός προσδιορισμός για την *in vitro* ποσοτική μέτρηση της ανθρώπινης α-φetoπρωτεΐνης (AFP) στον ορό και το πλάσμα.
Αυτό το kit δεν προορίζεται για την αξιολόγηση κινδύνου τρισωμίας 21.

II. ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

- A. Εμπορική ονομασία:** AFP-IRMA της DIASource
- B. Αριθμός καταλόγου:** KIP0081 : 96 προσδιορισμοί
KIP0084 : 4 x 96 προσδιορισμοί
- Γ. Κατασκευάζεται από την:** DIASource ImmunoAssays S.A.
Rue de l'Industrie 8, B-1400 Nivelles, Belgium.

Για τεχνική βοήθεια ή πληροφορίες σχετικά με παραγγελίες επικοινωνήστε στα:
Τηλ.: +32 (0)67 88.99.99 Fax: +32 (0)67 88.99.96

III. ΚΛΙΝΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ

A. Εισαγωγή

Η α-φetoπρωτεΐνη (AFP) είναι μια ογκοεμβρυϊκή πρωτεΐνη μοριακού βάρους 70.000 Da, η οποία συντίθεται από τα ηπατοπαρεγχυματικά κύτταρα, το λεκθικό ασκό και τη γαστρεντερική οδό του εμβρύου του ανθρώπου. Το ανώτατο σημείο συγκέντρωσης της AFP εμφανίζεται μεταξύ της 12ης και της 15ης εβδομάδας της κύησης. Μετά τη γέννα, η συγκέντρωση της AFP στο πλάσμα μειώνεται ταχέως σε επίπεδο κάτω από 5 IU/ml. Τα επίπεδα της AFP αυξάνονται στην ακόλουθη κλινική κατάσταση:

B. Κλινικές εφαρμογές

Οι κύριες κλινικές εφαρμογές των μετρήσεων της AFP έχουν να κάνουν με την παρακολούθηση του καρκίνου μετά από θεραπεία. Ωστόσο, η μέτρηση της AFP μπορεί επίσης να παρουσιάζει κλινικό ενδιαφέρον στην παρακολούθηση της κύησης, όταν γίνεται σε ορό ή αμνιακό υγρό.

· Καρκίνος

- Ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα
- Τερατοκαρκινώματα και εμβρυοκυτταρικά καρκινώματα των όρχεων και των ωοθηκών
- Όγκος του λεκθικού ασκού
- Άλλοι καρκίνοι (λιγότερο από 5 %).

· Ιογενείς νόσοι

- Οξεία ηπατίτιδα (συνήθως < 100 IU/ml)
- Χρόνια ενεργή ηπατίτιδα (συνήθως < 100 IU/ml)

IV. ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η εξέταση AFP-IRMA της DIASource είναι ένας ανοσοραδιομετρικός προσδιορισμός δύο βημάτων, που βασίζεται σε διαχωρισμό επιστρωμένων σωληναρίων. Τα Mabs 1, τα αντισώματα σύλληψης, προσκολλώνται στην κάτω και εσωτερική επιφάνεια του πλαστικού σωληναρίου. Στα σωληνάρια προστίθενται βαθμονομητές ή δείγματα. Μετά την επώαση, αφαιρείται με πλύση τυχόν περίσσεια αντιγόνου. Προστίθεται το Mab 2 - το αντίσωμα που είναι σηματομενόμενο με ¹²⁵I. Μετά την επώαση και την πλύση, η υπολειπόμενη ραδιενέργεια, που είναι δεσμευμένη στο σωληνάριο, αντανakλά τη συγκέντρωση του αντιγόνου. Λόγω της περιστασιακά εξαιρετικά υψηλής συγκέντρωσης της AFP στον ορό (> 1 mg/ml) σε περίπτωση καρκίνου, ο παρών προσδιορισμός AFP-IRMA της DIASource έχει αναπτυχθεί σε μια διαδικασία δύο βημάτων για να αποφεύγονται τα φαινόμενα αγκίστρου (hook) λόγω υψηλής δόσης.

V. ΠΑΡΕΧΟΜΕΝΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Αντιδραστήρια	Κιτ 96 προσδιορι- σμών	Κιτ 4 x 96 προσδιορι- σμών	Χρωμα- τικός κωδικός	Ανασύσταση
Σωληνάρια επιστρωμένα με αντι- AFP(μονοκλωνικά	2 x 48	8 x 48	σκούρο κόκκινο	Έτοιμο για χρήση
Ab ¹²⁵I IXNHΘΕΤΗΣ: Αντι-AFP (μονοκλωνικά αντισώματα) σημασμένα με ¹²⁵Ιωδίνη σε φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα με βόεια ορολευκωματίνη, αζίδιο (<0,1%), EDTA και μια αδρανής κόκκινη χρωστική.	1 φιαλίδιο 10,5 ml 350 kBq	4 φιαλίδια 10,5 ml 4x350 kBq	κόκκινο	Έτοιμο για χρήση
CAL 0 Μηδενικός βαθμονομητής (0 IU/ml) σε βόειο ορό με αζίδιο (0,5%) και μερθειολικό	1 φιαλίδιο 10 ml	2 φιαλίδια 10 ml	κίτρινο	Έτοιμο για χρήση
CAL N Βαθμονομητής AFP N = 1 έως 5 (δείτε τις ακριβείς τιμές πάνω στις ετικέτες των φιαλιδίων) σε βόειο ορό με θυμόλη	5 φιαλίδια λυοφιλ.	5 x 2 φιαλίδια λυοφιλ.	κίτρινο	Προσθέστε 0,5 ml απεσταγμένου νερού
WASH SOLN CONC Διάλυμα πλύ (TRIS-HCl)	1 φιαλίδιο 10 ml	4 φιαλίδια 10 ml	καφέ	Αραιώστε 70 x με απεσταγμένο νερό (χρησιμοποιήστ ε μαγνητικό αναδευτήρα).
CONTROL N Οροί ελέγχου - N = 1 ή 2 σε ανθρώπινο ορό με μερθειολικό	2 φιαλίδια λυοφιλ.	2 x 2 φιαλίδια λυοφιλ.	ασημί	Προσθέστε 0,5 ml απεσταγμένου νερού

Σημείωση: Χρησιμοποιείτε το μηδενικό βαθμονομητή για αραιώσεις δειγμάτων.
1 IU του παρασκευάσματος βαθμονομητή είναι ισοδύναμο με 1 IU του 1ου IRP 72/225.

VI. ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ ΠΟΥ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ

Τα ακόλουθα υλικά απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται στο κιτ:

- 1. Απεσταγμένο νερό
- 2. Πιπέτες για διανομή: 100 μl, 200 μl, 500 μl και 1 ml (συνιστάται η χρήση πιπετών ακριβείας με αναλώσιμα πλαστικά ρύγχη)
- 3. Αναμεικτής στροβιλισμού (τύπου vortex)
- 4. Μαγνητικός αναδευτήρας
- 5. Αυτόματη σύριγγα των 5 ml (τύπου Cornwall) για πλύση
- 6. Σύστημα αναρρόφησης (προαιρετικό)
- 7. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί οποιοσδήποτε μετρητής γ ακτινοβολίας με δυνατότητα μέτρησης της ¹²⁵I (ελάχιστη απόδοση 70%).

VII. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟΥ

- A. Βαθμονομητές:** Ανασυστήστε τους βαθμονομητές 1-5 με 0,5 ml απεσταγμένου νερού.
- B. Οροί ελέγχου:** Ανασυστήστε τους ορούς ελέγχου με 0,5 ml απεσταγμένου νερού.
- Γ. Διάλυμα πλύσης εργασίας:** Προετοιμάστε επαρκή όγκο διαλύματος πλύσης εργασίας με προσθήκη 69 όγκων απεσταγμένου νερού σε 1 όγκο διαλύματος πλύσης (70x). Χρησιμοποιήστε μαγνητικό αναδευτήρα για την ομογενοποίηση. Απορρίψτε το μη χρησιμοποιημένο διάλυμα πλύσης εργασίας στο τέλος της ημέρας.

VIII. ΦΥΛΑΞΗ ΚΑΙ ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΛΗΞΗΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

- Πριν από το άνοιγμα ή την ανασύσταση, όλα τα συστατικά του κιτ παραμένουν σταθερά έως την ημερομηνία λήξης, η οποία αναγράφεται στην ετικέτα, εφόσον διατηρούνται σε θερμοκρασία 2 έως 8° C.
- Μετά την ανασύσταση, οι βαθμονομητές και οι οροί ελέγχου παραμένουν σταθεροί για μία εβδομάδα σε θερμοκρασία 2 έως 8° C. Για μεγαλύτερες περιόδους φύλαξης, πρέπει να σχηματίζονται κλάσματα/δόσεις μιας χρήσης και να διατηρούνται στους – 20° C το πολύ για 3 μήνες.
Αποφύγετε τη διαδοχική κατάψυξη και απόψυξη.
- Φρέσκο, παρασκευασμένο διάλυμα πλύσης εργασίας θα πρέπει να χρησιμοποιείται την ίδια ημέρα.
- **Μετά την πρώτη χρήση του, ο ιχνηθέτης παραμένει σταθερός έως την ημερομηνία λήξης, εφόσον διατηρείται στο αρχικό, ερμητικά κλειστό φιαλίδιο σε θερμοκρασία 2 έως 8° C.**
- Τυχόν μεταβολές της φυσικής εμφάνισης των αντιδραστηρίων του κιτ ενδέχεται να υποδηλώνουν αστάθεια ή αλλοίωση.

IX. ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

- Τα δείγματα ορού ή πλάσματος πρέπει να φυλάσσονται σε θερμοκρασία 2-8° C.
- Εάν η εξέταση δεν πραγματοποιηθεί εντός 24 ωρών, συνιστάται η φύλαξη σε κλάσματα/δόσεις μιας χρήσης στους -20° C.
- Αποφύγετε τη διαδοχική κατάψυξη και απόψυξη.
- Ο ορός ή το πλάσμα (EDTA ή ηπαρίνη) παρέχουν παρόμοια αποτελέσματα.
Υ (ορός) = 1,05 x (ηπαρ. πλάσμα) - 0,2 r = 0,98 n = 31
Υ (ορός) = 1,05 x (ηπαρ. πλάσμα) - 0,5 r = 0,99 n = 32

X. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

- A. Σημειώσεις σχετικά με το χειρισμό**
Μη χρησιμοποιείτε το κιτ ή τα συστατικά μετά την ημερομηνία λήξης. Μην αναμειγνύετε υλικά από διαφορετικές παρτίδες κιτ. Φέρετε όλα τα αντιδραστήρια σε θερμοκρασία δωματίου πριν από τη χρήση. Αναμείξτε καλά όλα τα αντιδραστήρια και τα δείγματα με απαλή ανακίνηση ή ανάδευση. Χρησιμοποιείτε ένα καθαρό αναλώσιμο ρύγχος πιπέτας για την προσθήκη κάθε διαφορετικού αντιδραστηρίου και δείγματος προκειμένου να αποφύγετε την επιμόλυνση. Η ακρίβεια βελτιώνεται με χρήση πιπετών υψηλής ακριβείας ή αυτοματοποιημένου εξοπλισμού διανομής με πιπέτες. Τηρείτε τους χρόνους επώασης. Προετοιμάστε μια καμπύλη βαθμονόμησης για κάθε ανάλυση και μη χρησιμοποιείτε δεδομένα από προηγούμενες αναλύσεις.

- B. Διαδικασία**
 1. Σημάνετε επιστρωμένα σωληνάρια εις διπλούν για κάθε βαθμονομητή, ορό ελέγχου και δείγμα. Για τον προσδιορισμό των μετρήσεων του ιχνηθέτη ¹²⁵I ("total"), σημάνετε 2 κοινά (μη επιστρωμένα) σωληνάρια.
 2. Αναμείξτε για λίγο (με αναμεικτή στροβιλισμού τύπου vortex) βαθμονομητές, ορούς ελέγχου και δείγματα και διανείμετε 50 μl από έκαστο σε αντίστοιχα σωληνάρια.
 3. Ανακινήστε απαλά με το χέρι τη βάση στήριξης των σωληναρίων για να απελευθερώσετε τυχόν παγιδευμένες φυσαλίδες αέρα.
 4. Επώαστε επί 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.
 5. Αναρροφήστε (ή μεταγγίστε) το περιεχόμενο κάθε σωληναρίου (με εξαίρεση εκείνα που αφορούν τις μετρήσεις του ιχνηθέτη ¹²⁵I ["total"]). Βεβαιωθείτε ότι το πλαστικό ρύγχος του αναρροφητή φθάνει στον πυθμένα του επιστρωμένου σωληναρίου προκειμένου να αφαιρεθεί όλη η ποσότητα του υγρού.
 6. Πλύνετε τα σωληνάρια με 2 ml διαλύματος πλύσης εργασίας (με εξαίρεση εκείνα που αφορούν τις μετρήσεις του ιχνηθέτη ¹²⁵I ["total"]) και αναρροφήστε (ή μεταγγίστε). Αποφύγετε το σχηματισμό αφρού κατά τη διάρκεια της προσθήκης του διαλύματος πλύσης εργασίας.
 7. Μετά την τελευταία πλύση, αφήστε τα σωληνάρια να σταθούν σε όρθια θέση για δύο λεπτά και αναρροφήστε τη σταγόνα υγρού που απομένει.
 8. Διανείμετε 100 μl ιχνηθέτη αντι-AFP-¹²⁵I σε κάθε σωληνάριο, συμπεριλαμβανοντας τα μη επιστρωμένα σωληνάρια για τις μετρήσεις του ιχνηθέτη ¹²⁵I ("total").
 9. Ανακινήστε απαλά με το χέρι τη βάση στήριξης των σωληναρίων για να απελευθερώσετε τυχόν παγιδευμένες φυσαλίδες αέρα.
 10. Επώαστε επί 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.
 11. Αναρροφήστε (ή μεταγγίστε) το περιεχόμενο κάθε σωληναρίου (με εξαίρεση εκείνα που αφορούν τις μετρήσεις του ιχνηθέτη ¹²⁵I ["total"]). Βεβαιωθείτε ότι το πλαστικό ρύγχος του αναρροφητή φθάνει στον πυθμένα του επιστρωμένου σωληναρίου προκειμένου να αφαιρεθεί όλη η ποσότητα του υγρού.
 12. Πλύνετε τα σωληνάρια με 2 ml διαλύματος πλύσης εργασίας (με εξαίρεση εκείνα που αφορούν τις μετρήσεις του ιχνηθέτη ¹²⁵I ["total"]) και αναρροφήστε (ή μεταγγίστε). Αποφύγετε το σχηματισμό αφρού κατά τη διάρκεια της προσθήκης του διαλύματος πλύσης εργασίας.
 13. Αφήστε τα σωληνάρια να σταθούν σε όρθια θέση για δύο λεπτά και αναρροφήστε τη σταγόνα υγρού που απομένει.
 14. Μετρήστε τα σωληνάρια σε μετρητή γ ακτινοβολίας για 60 δευτερόλεπτα.

XI. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

- 1. Υπολογίστε τη μέση τιμή των διπλών προσδιορισμών.
- 2. Σε ημιλογαριθμικό ή γραμμικό χαρτί γραφημάτων, παραστήστε γραφικά τις c.p.m. (κρούσεις ανά λεπτό) (τεταγμένη) για κάθε βαθμονομητή έναντι της αντίστοιχης συγκέντρωσης της AFP (τετιμημένη) και σχεδιάστε μια καμπύλη βαθμονόμησης μέσω των σημείων του βαθμονομητή, απορρίπτε τις εμφανείς μη αποδεκτές τιμές.
- 3. Διαβάστε τη συγκέντρωση για κάθε ορό ελέγχου και δείγμα με αναγωγή στην καμπύλη βαθμονόμησης.
- 4. Αναγωγή δεδομένων με τη βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή θα απλοποιήσει αυτούς τους υπολογισμούς. Εάν χρησιμοποιείται αυτόματη επεξεργασία αποτελεσμάτων, συνιστάται προσαρμογή καμπύλης λογιστικής συνάρτησης 4 παραμέτρων.

XII. ΤΥΠΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Τα ακόλουθα δεδομένα προορίζονται μόνο ως παράδειγμα και δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται ποτέ αντί της καμπύλης βαθμονόμησης πραγματικού χρόνου.

AFP-IRMA		cpm	B/T (%)
Κρούσεις του ιχνηθέτη ¹²⁵ I ("total")		133479	
Βαθμονομητής	0,0 IU/ml	268	0,2
	5,3 IU/ml	2821	2,11
	15,0 IU/ml	6076	4,55
	45,0 IU/ml	19122	14,33
	155,0 IU/ml	44001	32,96
	440,0 IU/ml	66466	49,79

XIII. ΑΠΟΔΟΣΗ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

- A. Όριο ανίχνευσης**

Μετρήθηκαν είκοσι μηδενικοί βαθμονομητές μαζί με ένα σύνολο άλλων βαθμονομητών. Το όριο ανίχνευσης, οριζόμενο ως η φαινομενική συγκέντρωση δύο τυπικών αποκλίσεων πάνω από τις μέσες μετρήσεις σε μηδενική δέσμευση, ήταν 0,5 IU/ml.
- B. Ειδικότητα**

Η εξέταση AFP-IRMA δεν παρουσιάζει διασταυρούμενη αντιδραστικότητα με δομικά σχετικές ουσίες. Προστέθηκε ανθρώπινη ορολευκωματίνη (HSA) σε συγκέντρωση 60 ng/ml σε ένα βαθμονομητή AFP χαμηλής (5 IU/ml) και υψηλής (50 IU/ml) τιμής και μετρήθηκε η φαινομενική απόκριση της AFP.

	Παρατηρηθείσα τιμή AFP IU/ml
Cal 5 IU/ml + HSA (60 ng/ml)	4,8
Cal 50 IU/ml + HSA (60 ng/ml)	49,0

Σημείωση: Στον πίνακα αυτό παρουσιάζεται η διασταυρούμενη αντιδραστικότητα για τον προσδιορισμό AFP-IRMA.

- Γ. Ακρίβεια**

ΓΙΑ ΤΟΝ ΙΔΙΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ
- ΜΕΤΑΞΥ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΩΝ

Ορός	N	<X> ± T.A. (IU/ml)	Σ.Δ. (%)	Ορός	N	<X> ± T.A. (IU/ml)	Σ.Δ. (%)
A	10	4,2 ± 0,2	4,8%	E	22	7,8 ± 0,5	5,8%
B	10	11,4 ± 0,2	1,8%	ΣΤ	22	19,8 ± 1,2	6,0%
Γ	10	26,2 ± 0,6	2,3%				
Δ	10	357 ± 19,6	5,5%				

T.A.: Τυπική απόκλιση, Σ.Δ.: Συντελεστής διακύμανσης

Δ. Ορθότητα

ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΡΑΙΩΣΗΣ			
Δείγμα	Αραίωση	Θεωρητική συγκέντρωση (IU/ml)	Μετρηθείσα συγκέντρωση (IU/ml)
Ορός 1	1/1	-	444
	1/3	148,0	158
	1/6	74,0	86
	1/10	44,4	42
	1/50	8,9	9,8
Ορός 2	1/1	-	87,4
	1/2	43,7	39,6
	1/4	21,9	21,8
	1/10	8,7	9,0
	1/20	4,4	4,2

Τα δείγματα αραιώθηκαν με το μηδενικό βαθμονομητή.

ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΝΑΚΤΗΣΗΣ			
Δείγμα	Προσταθείσα AFP (IU/ml)	Ανακτηθείσα AFP (IU/ml)	Ανακτηθείσα (%)
Ορός 1	7,5	9,6	128%
	22,5	23,2	103%
	80	82,2	103%
Ορός 2	2,5	2,4	96%
	22,5	21,4	95%
	225	218	97%

- Ε. Μεσοδιάστημα μεταξύ της διανομής τελευταίου βαθμονομητή και δείγματος**

Όπως φαίνεται στη συνέχεια, τα αποτελέσματα του προσδιορισμού παραμένουν αξιόπιστα ακόμα και όταν διανέμεται ένα δείγμα 30 λεπτά μετά την προσθήκη του βαθμονομητή στα επιστρωμένα σωληνάρια.

ΜΕΣΟΔΙΑΣΤΗΜΑ			
Ορός (ng/ml)	0'	20'	30'
Ορός 1	12,7	11,0	10,1
Ορός 2	31,3	29,4	27,3

- ΣΤ. Φαινόμενο αγκίστρου (hook)**

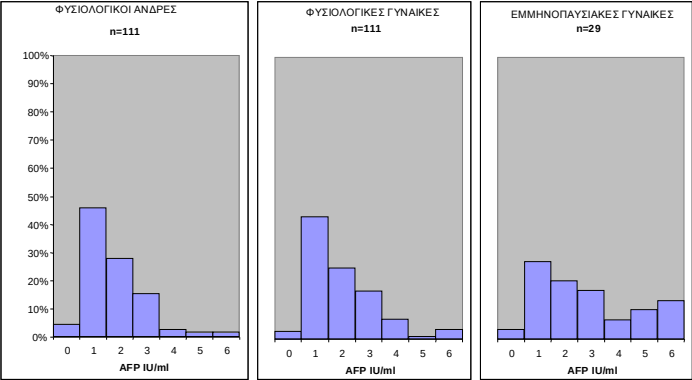
Δείγμα που εμβολιάστηκε με συγκέντρωση AFP έως 1460000 IU/ml δίνει υψηλότερες μετρήσεις από το σημείο του τελευταίου βαθμονομητή.

XIV. ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

- Δείγματα από ασθενείς που έχουν λάβει παρασκευάσματα μονοκλωνικών αντισωμάτων ποντικού για σκοπούς διάγνωσης ή θεραπείας, ενδεχομένως να περιέχουν ανθρώπινα αντισώματα αντί-ποντικού (HAMA). Σε αυτά τα δείγματα μπορούν να παρατηρηθούν ψευδώς αυξημένες ή ψευδώς μειωμένες τιμές, όταν ελέγχονται με kit προσδιορισμού που χρησιμοποιούν μονοκλωνικά αντισώματα ποντικού.
- Τα ετεροφιλικά αντισώματα στον ανθρώπινο ορό μπορούν να αντιδράσουν με ανοσοσφαιρίνες των αντιδραστηρίων, προκαλώντας παρεμβολή σε in vitro ανοσοπροσδιορισμούς. Ασθενείς που εκτίθενται τακτικά σε ζώα ή προϊόντα ζωικού ορού ενδεχομένως να είναι επιρρεπείς σε αυτήν την παρεμβολή. Παθολογικές τιμές μπορούν να παρατηρηθούν σε παρουσία ετεροφιλικών αντισωμάτων. Αξιολογείτε με προσοχή τα αποτελέσματα ασθενών, στους οποίους υπάρχει υποψία αυτών των αντισωμάτων. Εάν τα αποτελέσματα δεν είναι σύμφωνα με άλλες κλινικές παρατηρήσεις, θα χρειαστεί η λήψη περαιτέρω πληροφοριών πριν από τη θέση της διάγνωσης.

XIV. ΕΣΩΤΕΡΙΚΟΣ ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

- Εάν τα αποτελέσματα που λαμβάνονται για τον ορό ελέγχου 1 ή/και τον ορό ελέγχου 2 δε βρίσκονται εντός του πεδίου τιμών που καθορίζεται στην ετικέτα του φιαλιδίου, τα αποτελέσματα δεν είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν, εκτός εάν έχει δοθεί ικανοποιητική εξήγηση για την ασυμφωνία.
- Εάν είναι επιθυμητό, κάθε εργαστήριο μπορεί να δημιουργήσει τα δικά του μείγματα δειγμάτων ελέγχου (pools), τα οποία πρέπει να διατηρούνται κατενυγμένα σε κλάσματα/δόσεις μιας χρήσης.
- Τα κριτήρια αποδοχής για τη διαφορά μεταξύ των διπλών αποτελεσμάτων των δειγμάτων θα πρέπει να βασίζονται σε ορθές εργαστηριακές πρακτικές.



XV. ΤΙΜΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Οι τιμές αυτές παρέχονται μόνον ως οδηγός. Κάθε εργαστήριο θα πρέπει να καθιερώσει το δικό του πεδίο φυσιολογικών τιμών.

- A. Υγιή άτομα που δεν είναι σε κατάσταση εγκυμοσύνης**
- B. Κύηση (*)**

Ορός μητέρας

Η κατανομή των τιμών του ορού σε φυσιολογική κύηση. Τα άνω φυσιολογικά όρια για δείγματα ορού ελήφθησαν εκφράζοντας τα δεδομένα ως το διάμεσο πολλαπλασιασμένο επί 2,5.

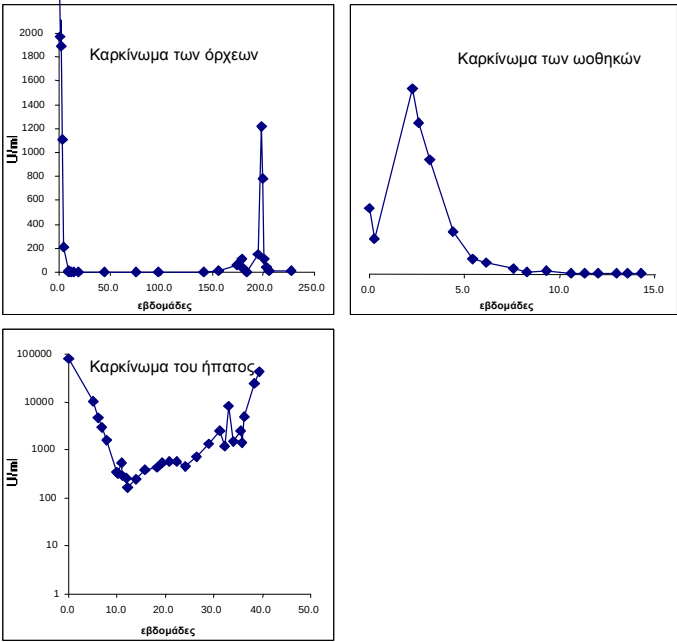
Εβδομάδα κύησης	Χαμηλότερες τιμές 2,5 εκατοστημόρι	Διάμεσος (IU AFP/ml)	Υψηλότερες τιμές 97,5 εκατοστημόρι	2,5 Διάμεσος (IU AFP/ml)
-----------------	------------------------------------	----------------------	------------------------------------	--------------------------

	ο (IU AFP/ml)		ο (IU AFP/ml)	
15	11,1	21	59	52,5
16	15,1	28	73	70
17	19,0	36	84	90
18	23	42	93	105
19	26	50	104	125
20	30	58	113	145

(*) Μελέτες που εκτελέστηκαν για την *DIAsource ImmunoAssays S.A. Belgium* με βάση δείγματα από το Βέλγιο.

Γ. Ογκολογία

Μετρήθηκαν συγκεντρώσεις AFP σε ορό κατά τη διάρκεια παρακολούθησης νόσου σε τρεις μεμονωμένες περιπτώσεις καρκίνου διαφορετικούκυτταρικού τύπου.



XVI. ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ

Ασφάλεια

Μόνο για διαγνωστική χρήση in vitro.
 Το kit αυτό περιέχει το ¹²⁵I (Χρόνος ημιζωής: 60 ημέρες), μια ραδιενεργή ουσία η οποία εκπέμπει ιονίζουσα ακτινοβολία Χ (28 keV) και γ (35.5 keV). Αυτό το ραδιενεργό προϊόν είναι δυνατό να μεταφερθεί και να χρησιμοποιηθεί μόνο από εξουσιοδοτημένα άτομα. Η αγορά, φύλαξη, χρήση και ανταλλαγή ραδιενεργών προϊόντων υπόκεινται στη νομοθεσία της χώρας του τελικού χρήστη. Σε καμία περίπτωση δεν πρέπει να χορηγείται το προϊόν σε ανθρώπους ή ζώα.
 Όλος ο χειρισμός του ραδιενεργού υλικού θα πρέπει να εκτελείται σε καθορισμένο χώρο, μακριά από χώρους τακτικής διέλευσης. Στο εργαστήριο πρέπει να διατηρείται ημερολόγιο για την παραλαβή και τη φύλαξη ραδιενεργών υλικών. Εξοπλισμός και γυάλινα σκεύη του εργαστηρίου, τα οποία θα μπορούσαν να μολυνθούν με ραδιενεργές ουσίες, θα πρέπει να φυλάσσονται σε ξεχωριστό χώρο για την πρόληψη επιμόλυνσης των διαφόρων ραδιοϊσοτόπων.
 Τυχόν διαρροές ραδιενεργών υγρών πρέπει να καθαρίζονται αμέσως σύμφωνα με τις διαδικασίες ασφάλειας από ραδιενέργεια. Τα ραδιενεργά απόβλητα πρέπει να απορρίπτονται σύμφωνα με τους τοπικούς κανονισμούς και τις κατευθυντήριες οδηγίες των αρχών που έχουν δικαιοδοσία στο εργαστήριο. Η τήρηση των βασικών κανόνων ασφάλειας από ραδιενέργεια παρέχει επαρκή προστασία.
 Τα συστατικά ανθρώπινου αίματος που περιλαμβάνονται στο kit αυτό έχουν ελεγχθεί με μεθόδους εγκεκριμένες στην Ευρώπη ή/και από τον FDA και έχει διαπιστωθεί ότι είναι αρνητικά ως προς την παρουσία HBsAg, αντι-HCV, αντι-HIV-1 και 2. Καμία γνωστή μέθοδος δεν είναι δυνατό να παρέχει πλήρη διασφάλιση ότι παράγωγα του ανθρώπινου αίματος δε θα μεταδώσουν ηπατίτιδα, AIDS ή άλλες λοιμώξεις. Επομένως, ο χειρισμός αντιδραστηρίων, δειγμάτων ορού ή πλάσματος θα πρέπει να γίνεται σύμφωνα με τις τοπικές διαδικασίες περί ασφάλειας.
 Όλα τα ζωικά προϊόντα και παράγωγα έχουν συλλεχθεί από υγιή ζώα. Τα βόεια συστατικά προέρχονται από χώρες όπου δεν έχει αναφερθεί BSE. Παρ' όλ' αυτά, συστατικά που περιέχουν ζωικές ουσίες θα πρέπει να αντιμετωπίζονται ως δυνητικώς μολυσματικά. Αποφύγετε οποιαδήποτε επαφή του δέρματος με αντιδραστήρια (χρησιμοποιείται αζίδιο του νατρίου ως συντηρητικό). Το αζίδιο στο kit αυτό ενδέχεται να αντιδράσει με μολύβδο και χαλκό των υδραυλικών σωληνώσεων και να σχηματίσει με τον τρόπο αυτό ιδιαίτερα εκρηκτικά αζίδια μετάλλων. Κατά τη διάρκεια του βήματος πλύσης, εκπλύνετε την αποχέτευση με μεγάλη ποσότητα νερού, για την πρόληψη τυχόν συσσώρευσης αζιδίου. Μην καπνίζετε, μην πίνετε, μην τρώτε και μη χρησιμοποιείτε καλλυντικά στο χώρο εργασίας. Μην διανέμετε με πιπέτα χρησιμοποιώντας το στόμα σας. Χρησιμοποιείτε προστατευτικό ρουχισμό και γάντια μιας χρήσης.

XVII. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. CUCKLE, H.S., WALD, N.J. 1984.
Maternal serum alpha-fetoprotein measurement : a screening test for Down Syndrome.
Lancet, i:926
2. HUNTER, W.M. BUDD, P.S. 1981.
Immunoradiometric versusradioimmunoassay a comparison using alpha-fetoprotein as the model analyte.
J. of Immunol. Meth.45:255
3. KOHN, J. WEAVER, P.C. 1974.
Serum alpha-fetoprotein in hepatocellular carcinoma.
Lancet, i:334
4. KOHN, J., ORR, A.H. MC ELWAIN, T.J. et al.
Serum alpha-fetoprotein in patients with testicular tumours.
Lancet; II:433
5. NORGAARD-PENDERSEN, B. 1976.
Human alpha-fetoprotein - A review of recent methodological and clinical studies.
Scand. J. Immunol., Suppl. 4:7.
6. U.K. Collaborative study, First report. 1977.
Maternal serum alpha-fetoprotein measurement in antenatal screening for anencephaly and spina bifidein early pregnancy.
Lancet, i:1323.
7. JEVY, L.B. et al. 1995
Hepatocellular carcinoma in a pregnant woman detected by routine screening of maternal alpha-fetoprotein.
Am. J. Obstet. Gynecology, 172(1pt1):219-220.
8. VERLOES, A. et al. 1995.
A prenatal trisomy 21 screening program using AFP, hCG and free estriol assays on maternal dried blood.
Am. J. Obstet. Gynecology, 172(1pt1):167-179.
9. CHRISTMOS, J.T. et al. 1994.
The effect of fetomaternal bleeding of the risk of adverse pregnancy outcome in patients with elevated second trimester maternal serum alpha-fetoprotein levels.
Am. J. Obstet. Gynecology, 171(2):315-320.

XVIII. ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΤΟΥ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟΥ

	ΚΡΟΥΣΕΙ Σ "TOTAL" ml	ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΤΕ Σ ml	ΔΕΙΓΜΑ(ΤΑ) ΟΡΟΙ ΕΛΕΓΧΟΥ ml
Βαθμονομητές (0 έως 5) Δείγματα, οροί ελέγχου	- -	0,05 -	- 0,05
Επώαση	1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου		
Διαχωρισμός	-	αναρρόφηση	
Διάλυμα πλύσης	-	2,0	
Διαχωρισμός	-	αναρρόφηση	
Διάλυμα πλύσης	-	2,0	
Διαχωρισμός	-	προσεκτική αναρρόφηση	
Ιχνηθέτης	0,1	0,1	0,1
Επώαση	1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου		
Διαχωρισμός	-	αναρρόφηση	
Διάλυμα πλύσης	-	2,0	
Διαχωρισμός	-	προσεκτική αναρρόφηση	
Μέτρηση	Μέτρηση σωληναρίων επί 60 δευτερόλεπτα		

Αρ. καταλόγου DIAsource: KIP0081 – KIP0084	Αριθμός P.I.: 1700503/el	Αρ. αναθεώρησης: 101028/1
---	-----------------------------	------------------------------

Przed zastosowaniem należy przeczytać cały protokół.

AFP-IRMA

I. PRZEZNACZENIE

Oznaczenie immunoradiometryczne do ilościowego pomiaru ludzkiej alfa-fetoproteiny (AFP) w surowicy i osoczu metodą *in vitro*.

Ten zestaw nie jest przeznaczony do oceny ryzyka wystąpienia trisomii 21 chromosomu.

II. INFORMACJE OGÓLNE

- A. Nazwa firmowa:** DIAsource AFP-IRMA Kit
- B. Numer katalogowy:** KIP0081: 96 oznaczeń
KIP0084: 4 x 96 oznaczeń
- C. Wyprodukowano przez:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue de l'Industrie, 8, B-1400 Nivelles, Belgia.

Dział pomocy technicznej oraz informacje dotyczące zamówień:

Tel: +32 (0)67 88.99.99

Fax: +32 (0)67 88.99.96

III. INFORMACJE KLINICZNE

A. Wprowadzenie

Alfa-fetoproteina (AFP) jest płodowym białkiem o masie 70 000 Da syntetyzowanym przez komórki tkanki mezenchymatycznej, woreczka żółtkowego i przewodu pokarmowego ludzkiego płodu. Szczytowe stężenia AFP występują w 12 – 15 tygodniu ciąży. Po urodzeniu, stężenie AFP gwałtownie maleje do wartości poniżej 5 IU/ml. Poziomy AFP są podwyższone w następujących sytuacjach klinicznych:

B. Zastosowania kliniczne

Głównym zastosowaniem pomiarów AFP jest monitorowanie skuteczności leczenia przeciwnowotworowego. Pomiar AFP może być również wykorzystywany w monitorowaniu ciąży, jeżeli dotyczy surowicy lub płynu owodniowego.

- **Nowotwory**
 - Rak wątrobowokomórkowy
 - Teratocarcinoma i rak komórek embrionalnych jąder i jajników
 - Guz woreczka żółtkowego
 - Inne nowotwory (poniżej 5%).
- **Choroby wirusowe**
 - Ostre zapalenie wątroby (zwykle < 100 IU/ml)
 - Przewlekłe, aktywne zapalenie wątroby (zwykle < 100 IU/ml)

IV. ZAGADNIENIA DOTYCZĄCE METODY

DIASource AFP-IRMA jest dwuetapowym oznaczeniem immunoradiometrycznym opartym na separacji w opłaszczonych probówkach. Mab 1 – przeciwciała przechwytyjące – są umocowane do dolnej i wewnętrznej powierzchni plastikowej próbówki. Do próbek są dodawane kalibratory lub próbki. Po inkubacji, w wyniku płukania usuwa się nadmiar antygenu. Mab 2 – dodawane jest przeciwciało oznakowane ¹²⁵I. Po inkubacji i płukaniu, radioaktywność pozostałych cząstek związanych z powierzchnią próbówki odzwierciedla stężenie antygenu. Z uwagi na rzadko występujące, ekstremalnie wysokie stężenie AFP w surowicy (>1 mg/ml) w przypadku procesu nowotworowego, obecne oznaczenie DIASource AFP-IRMA zostało zaprojektowane w taki sposób, że przebiega dwuetapowo, aby uniknąć efektów haka związanych z wysokimi dawkami antygenu.

V. DOSTARCZONE ODCZYNNIKI

Odczynniki	Zestaw 96 oznaczeń	Zestaw 4x 96 oznaczeń	Kolor	Rekonstytucja			
 Probówki opłaszczone anty- AFP (przeciwciała monoklonalne)	2 x 48	8 x 48	ciemno-czerwony	Gotowe do zastosowania.			
<table border="1"><tr><td>Ab</td><td>¹²⁵I</td></tr></table> ZNACZNIK IZOTOPOWY : Przeciwciała (monoklonalne) anty-AFP oznakowane Jodem I ¹²⁵ w buforze fosforanowym zawierającym bydlęcą albuminę surowiczą, azydek (0,1%) i czerwony barwnik.	Ab	¹²⁵ I	1 fiolka 10,5 ml 350 kBq	4 fiolek 10,5 ml 4 x 350 kBq	czerwony	Gotowe do zastosowania.	
Ab	¹²⁵ I						
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>0</td></tr></table> Kalibrator zerowy (0 IU/ml) w surowicy bydlęcej wraz z azydkiem (0,5%) i mertiolatem	CAL	0	1 fiolka 10 ml	2 fiolek 10 ml	żółty	Gotowe do zastosowania.	
CAL	0						
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>N</td></tr></table> Kalibratory AFP 1 - 5 (dokładne wartości na etykietach fiolek) w surowicy bydlęcej z tymolem	CAL	N	5 fiolek liofil.	2 x 5 fiolek liofil.	żółty	Dodać 0,5 ml wody destylowanej	
CAL	N						
<table border="1"><tr><td>WASH</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table> Roztwór płuczący (TRIS-HCl)	WASH	SOLN	CONC	1 fiolka 10 ml	4 fiolek 10 ml	brązowy	Rozcieńczyć 70x wodą destylowaną (wykorzystać mieszadło magnetyczne).
WASH	SOLN	CONC					
<table border="1"><tr><td>CONTROL</td><td>N</td></tr></table> Kontrolne 1 i 2 w surowicy pochodzenia ludzkiego z mertiolatem	CONTROL	N	2 fiolek liofil.	2 x 2 fiolek liofil.	srebrny	Dodać 0,5 ml wody destylowanej	
CONTROL	N						

Uwaga: Do rozcieńczania próbek należy użyć kalibratora zerowego. 1 IU preparatu kalibratora jest równoważne 1 IU z 1st IRP 72/225

VI. MATERIAŁY WYMAGANE, ALE NIEDOSTARCZONE

Poniższe materiały są wymagane, ale nie są dostarczone w zestawie:

- Woda destylowana
- Pipety do dostarczania objętości: 100 µl, 200 µl, 500 µl i 1 ml. (zaleca się stosowanie właściwych pipet z jednorazowymi końcówkami plastikowymi)
- Mieszadło wirowe
- Mieszadło magnetyczne
- Strzykawka automatyczna o objętości 5 ml (rodzaj Cornwall) do płukania
- Układ do aspiracji (opcjonalnie)
- Może być wykorzystywany jakikolwiek licznik gamma odpowiedni do pomiaru ¹²⁵I (minimalny uzysk 70%).

VII. PRZYGOTOWANIE ODCZYNNIKÓW

- A. **Kalibratory:** Rozpuścić kalibratory 1-5 za pomocą 0,5 ml wody destylowanej.
- B. **Kontrola:** Kontrolę należy rekonstruować przy pomocy 0,5 ml wody destylowanej.

- C. **Roboczy roztwór płuczący:** Właściwą objętość roboczego roztworu płuczającego należy przygotować dodając 69 objętości wody destylowanej do 1 objętości roztworu płuczającego (70x). Do homogenizacji należy wykorzystać mieszadło magnetyczne. Niewykorzystany roboczy roztwór płuczający należy wylać pod koniec dnia.

VIII. PRZECHOWYWANIE I DATA WAŻNOŚCI ODCZYNNIKÓW

- Przed otwarciem lub rekonstytucją wszystkie składniki zestawu zachowują trwałość do daty ważności przedstawionej na etykiecie, jeżeli są przechowywane w temperaturze od 2 do 8°C.
- Po rekonstytucji, kalibratory i kontrole zachowują trwałość przez 1 tydzień, pod warunkiem przechowywania w temperaturze od 2 do 8°C. W razie konieczności przechowywania przez dłuższy okres czasu, należy przygotować niewielkie objętości kontroli, co pozwala przechowywać je w temperaturze -20 °C przez 3 miesiące. Unikać powtarzanych cykli zamrażania-odmrażania
- Świeżo przygotowany roboczy roztwór płuczający powinien być wykorzystany w tym samym dniu.
- Po jego pierwszym zastosowaniu, znacznik izotopowy zachowuje trwałość do podanej daty ważności jeżeli jest przechowywany w oryginalnej, dobrze zamkniętej fiołce w temperaturze od 2 do 8°C.
- Zmiany w wyglądzie fizycznym odczynników w zestawie mogą wskazywać na ich niestabilność lub zużycie.

IX. POBIERANIE I PRZYGOTOWANIE MATERIAŁU DO BADANIA

- Próbki surowicy lub osocza muszą być przechowywane w temperaturze 2-8°C.
- Jeżeli oznaczenie nie jest wykonywane w ciągu 24 godzin, zaleca się przechowywanie w temperaturze -20°C.
- Unikać powtarzanych cykli zamrażania-odmrażania.
- Oznaczanie surowicy lub osocza (EDTA lub heparyna) prowadzi do podobnych wyników.
Y (surowica) = 1,05 x (osocze heparynizowane) – 0,2 r = 0,98 n = 31
Y (surowica) = 1,05 x (osocze z EDTA) – 0,5 r = 0,99 n = 32

X. PROCEDURA

- A. **Uwagi dotyczące obsługi**
- Nie wolno wykorzystywać składników zestawu po upływie daty ważności. Nie wolno mieszać materiałów pochodzących z różnych serii zestawów. Przed wykorzystaniem wszystkie odczynniki powinny osiągnąć temperaturę pokojową. Wszystkie odczynniki i próbki należy dokładnie wymieszać przez delikatne potrząsanie lub obracanie. Aby uniknąć zanieczyszczenia krzyżowego do dodawania poszczególnych odczynników i próbek należy wykorzystywać czyste, jednorazowe końcówki pipet. Pipety wysokiej precyzji lub pipety automatyczne poprawiają precyzję wykonania oznaczenia. Przestrzegać czasów inkubacji. Przygotować krzywą kalibracyjną dla każdego cyklu pomiarowego, nie wolno wykorzystywać danych z poprzednich oznaczeń.

B. Procedura

- Dla każdego kalibratora, próbki i kontroli należy oznaczyć opłaszczone próbówki w badaniach podwójnych. W celu określenia całkowitych zliczeń należy oznaczyć 2 zwykłe próbówki.
- Szybko wymieszać wirując: kalibratory, próbki i kontrole, i dozować po 50 µl każdej substancji do odpowiednich próbek.
- Delikatnie potrząsać (ręcznie) stojak z próbkami, aby uwolnić wszelkie, uwięzione pęcherzyki powietrza.
- Inkubować przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej.
- Aspirować (lub odlać) zawartość każdej próbówki (z wyjątkiem próbek do całkowitego zliczania). Aby usunąć cały płyn należy upewnić się, że plastikowa końcówka aspiratora osiągnęła dno opłaszczonej próbówki.
- Ponownie przepłukać próbki dwukrotnie za pomocą 2 ml roztworu roboczego (z wyjątkiem próbek do całkowitego zliczania) a następnie aspirować (lub osuszyć). W trakcie dodawania roztworu roboczego należy unikać wytwarzania piany.
- Po ostatnim płukaniu, pozostawić próbówki w pozycji stojącej do góry na dwie minuty i aspirować pozostałe krople płynu.
- Dodać 100 µl anty-AFP-¹²⁵I (znacznik izotopowy) do wszystkich próbek w tym do nieopłaszczonych próbek do całkowitego zliczania.
- Delikatnie potrząsać (ręcznie) stojak z próbkami, aby uwolnić wszelkie, uwięzione pęcherzyki powietrza.
- Inkubować przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej.
- Aspirować (lub odlać) zawartość każdej próbówki (z wyjątkiem próbek do całkowitego zliczania). Aby usunąć cały płyn należy upewnić się, że plastikowa końcówka aspiratora osiągnęła dno opłaszczonej próbówki.
- Przepłukać próbki przy pomocy 2 ml roboczego roztworu płuczającego (z wyjątkiem próbek do całkowitego zliczania) i aspirować zawartość (lub odlać ją). W trakcie dodawania roboczego roztworu płuczającego należy unikać wytwarzania piany.

13. Pozostawić próbówki w pozycji stojącej do góry na dwie minuty i aspirować pozostałe krople płynu.
14. Zliczać próbówki w liczniku gamma przez 60 sekund.

XI. OBLICZANIE WYNIKÓW

1. Obliczyć średnią oznaczeń podwójnych.
2. Na papierze milimetrowym lub w kratkę wykreślić c.p.m. (rzędna) dla każdego kalibratora wobec odpowiadającego stężenia AFP (odcięta) oraz wykreślić krzywą kalibracji przez punkty kalibratora, odrzucając oczywiste wartości odbiegające od linii środkowej.
3. Odczytać stężenie dla każdej kontroli i próbki przez naniesienie na krzywą kalibracyjną.
4. Redukcja danych przy pomocy komputera pozwoli uprościć te obliczenia. Jeżeli ma być zastosowane automatyczne przetwarzanie wyników, zaleca się dopasowanie krzywej logistycznej 4 parametrowej.

XII. PRZYKŁAD DANYCH TYPOWYCH

Poniższe dane są przedstawione wyłącznie w celach przykładowych i nie powinny być nigdy stosowane zamiast rzeczywistych krzywych kalibracyjnych.

AFP-IRMA		cpm	B/T (%)
Zliczanie całkowite		133479	
Kalibrator	0,0 IU/ml	268	0,2
	5,3 IU/ml	2821	2,11
	15,0 IU/ml	6076	4,55
	45,0 IU/ml	19122	14,33
	155,0 IU/ml	44001	32,96
	440,0 IU/ml	66466	49,79

XIII. DZIAŁANIE I OGRANICZENIA

A. Granica wykrywania

Dwadzieścia kalibratorów zerowych oznaczano wraz z zestawem innych kalibratorów. Granica wykrywania, zdefiniowana jako odmienne stężenie dwóch odchyłeń standardowych powyżej przeciętnej wartości zliczania przy wiązaniu zerowym kształtowała się na poziomie 0,5 IU/ml.

B. Swoistość

W oznaczeniu AFP-IRMA nie dochodzi do reakcji krzyżowej substancji strukturalnie podobnych. Dodawano ludzką albuminę surowiczą (HSA) w stężeniu 60 ng/ml do kalibratora o poziomie niskim (5 IU/ml) i wysokim (50 IU/ml) AFP. Mierzono przybliżoną odpowiedź na AFP.

	Obserwowana wartość AFP IU/ml
Kal 5 IU/ml + HSA (60 ng/ml) Kal 50 IU/ml + HSA (60 ng/ml)	4,8 49,0

Nota : w tej tabeli przedstawiono reaktywność krzyżową dla AFP-IRMA.

C. Precyzja

W SERII				POMIĘDZY SERIAMI			
Surowica	N	X ± S.D. (IU/ml)	CV %	Surowica	N	X ± S.D. (IU/ml)	CV %
A	10	4,2 ± 0,2	4,8%	E	22	7,8 ± 0,5	5,8%
B	10	11,4 ± 0,2	1,8%	F	22	19,8 ± 1,2	6,0%
C	10	26,2 ± 0,6	2,3%				
D	10	357 ± 19,6	5,5%				

SD Odchylenie standardowe; CV: Współczynnik zmienności

D. Dokładność

BADANIE ROZCIEŃCZENIA			
Próbka	Rozcieńczenie	Stęż. teoretyczne (IU/ml)	Stęż. zmierzone (IU/ml)
Surowica 1	1/1	-	444
	1/3	148,0	158
	1/6	74,0	86
	1/10	44,4	42
	1/50	8,9	9,8
Surowica 2	1/1	-	87,4
	1/2	43,7	39,6
	1/4	21,9	21,8
	1/10	8,7	9,0
	1/20	4,4	4,2

Próbki zostały rozcieńczone przy pomocy kalibrator zerowy.

BADANIE ODZYSKU			
Próbka	AFP dodana (IU/ml)	AFP odzyskany (IU/ml)	Odzysk (%)
Surowica 1	7,5	9,6	128%
	22,5	23,2	103%
	80	82,2	103%
Surowica 2	2,5	2,4	96%
	22,5	21,4	95%
	225	218	97%

E. Opóźnienie pomiędzy oznaczeniem ostatniego kalibratora i dozowaniem próbki

Jak wykazano, wyniki pomiaru pozostają dokładne nawet wówczas, gdy od momentu dodania kalibratora do opłaszczonych próbek minęło 30 minut.

OPÓŹNIENIE			
Surowica (ng/ml)	0'	20'	30'
Surowica 1	12,7	11,0	10,1
Surowica 2	31,3	29,4	27,3

F. Efekt hook'a

Próbka nasycona AFP o stężeniu do 1460000 IU/ml daje wyższe wartości zliczeń niż ostatni punkt kalibracyjny.

XIV. OGRANICZENIA

-
- Próbki od pacjentów, którzy w celach diagnostycznych lub terapeutycznych otrzymywali preparaty z mysich przeciwciał monoklonalnych, mogą zawierać ludzkie przeciwciała anty-mysie (HAMA). Próbki takie, oznaczane z użyciem zestawów testowych wykorzystujących mysie przeciwciała monoklonalne, mogą wykazywać wartości fałszywie zawyżone lub zaniżone.
-
- Przeciwciała heterofilne w ludzkiej surowicy mogą reagować z immunoglobulinami odczynnika, interferując z oznaczeniami immunologicznymi przeprowadzanymi in vitro. Pacjenci rutynowo ekspozowani na zwierzęta lub produkty z surowic zwierzęcych mogą wykazywać skłonność do takich interferencji i w razie obecności przeciwciał heterofilnych występować mogą u nich nieprawidłowe wyniki testów. Wyniki oznaczeń próbek od pacjentów z takimi przeciwciałami należy interpretować z ostrożnością. Jeżeli wyniki nie są zgodne z obserwacjami klinicznymi, przed postawieniem rozpoznania powinny być uzyskane dodatkowe informacje.

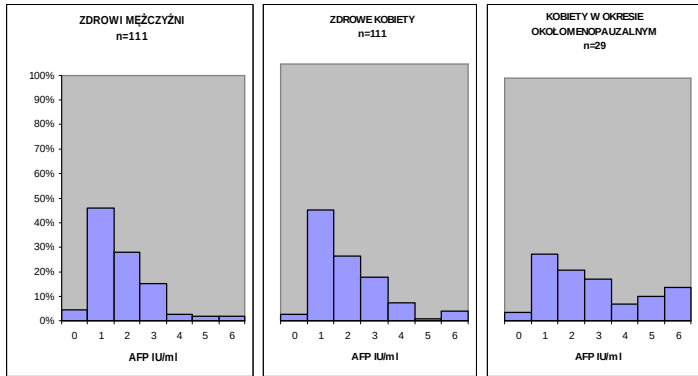
XV. WEWNĘTRZNA KONTROLA JAKOŚCI

-
- Jeżeli wyniki uzyskane dla kontroli 1 i/lub 2 nie znajdują się w zakresie określonym na etykietce fiołki, wyniki nie mogą zostać wykorzystane dopóki nie uda się znaleźć właściwego wyjaśnienia tego odchylenia.
-
- Jeżeli to konieczne, każde laboratorium może wykonać własne próbki zbiorcze w celach kontrolnych, które powinny być zamrożone w małych objętościach. Nie wolno zamrażać i rozmrażać więcej niż dwukrotnie.
-
- Dopuszczalne kryteria dotyczące różnicy pomiędzy wynikami oznaczeń podwójnych próbek powinny być zgodne z zasadami prawidłowej pracy w laboratorium.

XVI. ZAKRESY REFERENCYJNE

Te wartości są przedstawione wyłącznie w celach orientacyjnych; każde laboratorium powinno opracować własne zakresy norm.

A. Zdrowi osobnicy nieciążarni



B. Cięża (*)

Surowica matki

Rozkład wartości w surowicy w prawidłowej ciąży.

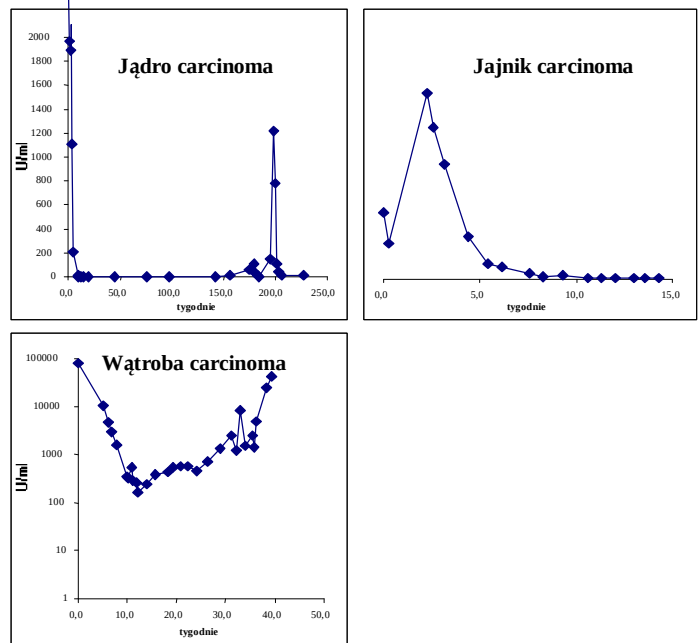
Górne wartości normalne dla próbek surowicy uzyskano wyrażając dane jako średnią pomnożoną o 2,5.

Tydzień ciąży	Dolne wartości 2,5 percentyl (IU AFP/ml)	Mediana (IU AFP/ml)	Górne wartości 97,5 percentyl (IU AFP/ml)	2,5 Mediana (IU AFP/ml)
15	11,1	21	59	52,5
16	15,1	28	73	70
17	19,0	36	84	90
18	23	42	93	105
19	26	50	104	125
20	30	58	113	145

(*) Badania przeprowadzono dla DIASource ImmunoAssays S.A. w Belgii w oparciu o próbki pochodzące z Belgii.

C. Onkologia

Stężenia AFP zostały oznaczone w surowicy w trakcie choroby – monitorowane w trzech przypadkach nowotworów o różnym pochodzeniu.



XVII. ŚRODKI OSTROŻNOŚCI I OSTRZEŻENIA

Bezpieczeństwo

Tylko do diagnostyki in vitro.

Zestaw zawiera ¹²⁵I (Okres połowicznego rozpadu: 60 dni), emitujący promieniowanie jonizujące X (28 keV) i γ (35,5 keV).

Ten produkt radioaktywny może być transportowany i wykorzystany wyłącznie przez osoby autoryzowane; zakup, przechowywanie, stosowanie i wymiana produktów radioaktywnych podlega regulacjom prawnym kraju użytkownika końcowego. W żadnym wypadku produkt nie może być podawany ludziom lub zwierzętom.

Obsługa materiałów radioaktywnych powinno być przeprowadzana w miejscach do tego przeznaczonych, z dala od miejsc ogólnej użyteczności. W laboratorium musi być przechowywany rejestr przyjęć i przechowywania materiałów radioaktywnych. Wyposażenie laboratorium oraz szkło, które może być skażone substancjami radioaktywnymi powinno być oddzielone w celu uniknięcia krzyżowego zanieczyszczenia różnych radioizotopów.

Wszelkie plamy z substancji radioaktywnych muszą być natychmiast oczyszczone zgodnie z procedurami dotyczącymi bezpieczeństwa radiologicznego. Odpady radioaktywne muszą być usuwane zgodnie z miejscowymi przepisami i ogólnie przyjętymi wytycznymi obowiązującymi w laboratorium. Przestrzeganie podstawowych zasad bezpieczeństwa radiologicznego zapewnia wystarczające zabezpieczenie.

Składniki zawierające ludzką krew, dostarczone w zestawie, zostały przebadane metodami zaaprobowanymi przez instytucje europejskie i/lub FDA. Stwierdzono, że nie zawierają one HbsAg, przeciwciał anti-HCV, anti-HIV-1 i 2. Żadna ze znanych metod nie może dać całkowitej pewności że materiały pochodzenia ludzkiego nie przeniosą czynników zakaźnych wirusowego zapalenia wątroby, AIDS i innych. Dlatego postępowanie z odczynnikami i próbkami surowicy lub osocza powinno być zgodne z miejscowymi procedurami dotyczącymi bezpieczeństwa.

Produkty pochodzenia zwierzęcego były pobierane od zdrowych zwierząt. Składniki bydlęce pochodzą z krajów, w których nie odnotowano występowania BSE. Pomimo to, składniki zawierające substancje pochodzenia zwierzęcego powinny być traktowane jako potencjalnie zakaźne.

Unikać kontaktu skóry z odczynnikami (zawierają azydek sodowy jako środek konserwujący). Azydek znajdujący się w zestawie może reagować z miedzią i ołowiem w układzie kanalizacyjnym tworząc związki o właściwościach wybuchowych. W czasie płukania odprowadzany płyn należy płukać dużymi objętościami wody, aby zapobiec kumulacji azydów.

Nie wolno palić, spożywać napojów ani pokarmów, bądź używać kosmetyków w miejscu pracy. Nie pipetować ustami. Zakładać ubranie ochronne i rękawiczki jednorazowe.

XVIII. BIBLIOGRAFIA

1. CUCKLE, H.S., WALD, N.J. 1984. **Maternal serum alpha-fetoprotein measurement : a screening test for Down Syndrome.** Lancet, i:926
2. HUNTER, W.M. BUDD, P.S. 1981. **Immunoradiometric versus radioimmunoassay a comparison using alpha-fetoprotein as the model analyte.** J. of Immunol. Meth.45:255
3. KOHN, J. WEAVER, P.C. 1974. **Serum alpha-fetoprotein in hepatocellular carcinoma.** Lancet, i:334
4. KOHN, J., ORR, A.H. MC ELWAIN, T.J. et al. **Serum alpha-fetoprotein in patients with testicular tumours.** Lancet; II:433
5. NORGAARD-PENDERSEN, B. 1976. **Human alpha-fetoprotein - A review of recent methodological and clinical studies.** Scand. J. Immunol., Suppl. 4:7.
6. U.K. Collaborative study, First report. 1977. **Maternal serum alpha-fetoprotein measurement in antenatal screening for anencephaly and spina bifida in early pregnancy.** Lancet, i:1323.
7. JEVY, L.B. et al. 1995 **Hepatocellular carcinoma in a pregnant woman detected by routine screening of maternal alpha-fetoprotein.** Am. J. Obstet. Gynecology, 172(1pt1):219-220.
8. VERLOES, A. et al. 1995. **A prenatal trisomy 21 screening program using AFP, hCG and free estriol assays on maternal dried blood.** Am. J. Obstet. Gynecology, 172(1pt1):167-179.
9. CHRISTMOS, J.T. et al. 1994. **The effect of fetomaternal bleeding of the risk of adverse pregnancy outcome in patients with elevated second trimester maternal serum alpha-fetoprotein levels.** Am. J. Obstet. Gynecology, 171(2):315-320.

XIX. PODSUMOWANIE PROTOKOŁU

	CAŁKOWITA LICZBA ZLICZEŃ ml	KALIBRATORY ml	PRÓBK(A)I KONTROLE ml
Kalibratory (0-5) Próbki, kontrole	- -	0,05 -	- 0,05
Inkubacja	1 godzinę w temperaturze pokojowej		
Rozdzielenie Roztwór płuczący Rozdzielenie Roztwór płuczący Rozdzielenie	- - - - -	aspiracja 2,0 aspiracja 2,0 aspiracja ostrożna	
Znacznik izotopowy	0,1	0,1	0,1
Inkubacja	1 godzinę w temperaturze pokojowej		
Rozdzielenie Roztwór płuczący Rozdzielenie	- - -	aspiracja 2,0 aspiracja ostrożna	
Zliczanie	Zliczanie próbek przez 60 sekund		

Nr katalogowy DIAsource KIP0081 – KIP0084	Numer P.I. 1700503/pl	Nr aktualizacji : 101028/1
--	--------------------------	-------------------------------

Data wydania : 2010-10-28

	<u>Used symbols</u>
	Consult instructions for use
	Storage temperature
	Use by
LOT	Batch code
REF	Catalogue number
CONTROL	Control
I V D	In vitro diagnostic medical device
	Manufacturer
	Contains sufficient for <n> tests
WASH SOLN CONC	Wash solution concentrated
CAL 0	Zero calibrator
CAL N	Calibrator #
CONTROL N	Control #
Ag 125I	Tracer
Ab 125I	Tracer
Ag 125I CONC	Tracer concentrated
Ab 125I CONC	Tracer concentrated
	Tubes
INC BUF	Incubation buffer
ACETONITRILE	Acetonitrile
SERUM	Serum
DIL SPE	Specimen diluent
DIL BUF	Dilution buffer
ANTISERUM	Antiserum
IMMUNOADSORBENT	Immunoabsorbent
DIL CAL	Calibrator diluent
REC SOLN	Reconstitution solution
PEG	Polyethylene glycol
EXTR SOLN	Extraction solution
ELU SOLN	Elution solution
GEL	Bond Elut Silica cartridges
PRE SOLN	Pre-treatment solution
NEUTR SOLN	Neutralization solution
TRACEUR BUF	Tracer buffer
U	Microtiterplate
Ab HRP	HRP Conjugate
Ag HRP	HRP Conjugate
Ab HRP CONC	HRP Conjugate concentrate
Ag HRP CONC	HRP Conjugate concentrate
CONJ BUF	Conjugate buffer
CHROM TMB CONC	Chromogenic TMB concentrate
CHROM TMB	Chromogenic TMB solution
SUB BUF	Substrate buffer
STOP SOLN	Stop solution
INC SER	Incubation serum
BUF	Buffer
Ab AP	AP Conjugate
SUB PNPP	Substrate PNPP
BIOT CONJ CONC	Biotin conjugate concentrate
AVID HRP CONC	Avidine HRP concentrate
ASS BUF	Assay buffer
Ab BIOT	Biotin conjugate
Ab	Specific Antibody
SAV HRP CONC	Streptavidin HRP concentrate
NSB	Non-specific binding
2nd Ab	2nd Antibody
ACID BUF	Acidification Buffer

	<u>Symboles utilisés</u>
	Consulter les instructions d'utilisation
	Température de conservation
	Utiliser jusqu'à
LOT	Numéro de lot
REF	Référence de catalogue
CONTROL	Contrôle
I V D	Dispositif médical de diagnostic in vitro
	Fabricant
	Contenu suffisant pour <n> tests
WASH SOLN CONC	Solution de lavage concentrée
CAL 0	Calibrateur zéro
CAL N	Calibrateur #
CONTROL N	Contrôle #
Ag 125I	Traceur
Ab 125I	Traceur
Ag 125I CONC	Traceur concentré
Ab 125I CONC	Traceur concentré
	Tubes
INC BUF	Tampon d'incubation
ACETONITRILE	Acétonitrile
SERUM	Sérum
DIL SPE	Diluant du spécimen
DIL BUF	Tampon de dilution
ANTISERUM	Antisérum
IMMUNOADSORBENT	Immunoabsorbant
DIL CAL	Diluant de calibrateur
REC SOLN	Solution de reconstitution
PEG	Glycol Polyéthylène
EXTR SOLN	Solution d'extraction
ELU SOLN	Solution d'élution
GEL	Cartouches Bond Elut Silica
PRE SOLN	Solution de pré-traitement
NEUTR SOLN	Solution de neutralisation
TRACEUR BUF	Tampon traceur
TIT	Microplaque de titration
Ab HRP	HRP Conjugué
Ag HRP	HRP Conjugué
Ab HRP CONC	HRP Conjugué concentré
Ag HRP CONC	HRP Conjugué concentré
CONJ BUF	Tampon conjugué
CHROM TMB CONC	Chromogène TMB concentré
CHROM TMB	Solution chromogène TMB
SUB BUF	Tampon substrat
STOP SOLN	Solution d'arrêt
INC SER	Sérum d'incubation
BUF	Tampon
Ab AP	AP Conjugué
SUB PNPP	Tampon PNPP
BIOT CONJ CONC	Biotine conjugué concentré
AVID HRP CONC	Avidine HRP concentré
ASS BUF	Tampon de test
Ab BIOT	Biotine conjugué
Ab	Anticorps spécifique
SAV HRP CONC	Concentré streptavidine HRP
NSB	Liant non spécifique
2nd Ab	Second anticorps
ACID BUF	Tampon d'acidification

	<u>Gebruikte symbolen</u>
	Raadpleeg de gebruiksaanwijzing
	Bewaartemperatuur
	Houdbaar tot
LOT	Lotnummer
REF	Catalogusnummer
CONTROL	Controle
IVD	Medisch hulpmiddel voor in-vitro diagnostiek
	Fabrikant
	Inhoud voldoende voor <n> testen
WASH SOLN CONC	Wasoplossing, geconcentreerd
CAL 0	Nulkalibrator
CAL N	Kalibrator #
CONTROL N	Controle #
Ag 125I	Tracer
Ab 125I	Tracer
Ag 125I CONC	Tracer geconcentreerd
Ab 125I CONC	Tracer geconcentreerd
	Buisjes
INC BUF	Incubatiebuffer
ACETONITRILE	Acetonitrile
SERUM	Serum
DIL SPE	Specimen diluent
DIL BUF	Verdunningsbuffer
ANTISERUM	Antiserum
IMMUNOADSORBENT	Immunoabsorbent
DIL CAL	Kalibratorverdunner
REC SOLN	Reconstitutieoplossing
PEG	Polyethyleen glycol
EXTR SOLN	Extractieoplossing
ELU SOLN	Elutieoplossing
GEL	Bond Elut Silica kolom
PRE SOLN	Pre-behandelingsoplossing
NEUTR SOLN	Neutralisatieoplossing
TRACEUR BUF	Tracerbuffer
	Microtiterplaat
Ab HRP	HRP Conjugaat
Ag HRP	HRP Conjugaat
Ab HRP CONC	HRP Conjugaat geconcentreerd
Ag HRP CONC	HRP Conjugaat geconcentreerd
CONJ BUF	Conjugaat buffer
CHROM TMB CONC	Chromogene TMB geconcentreerd
CHROM TMB	Chromogene Oplossing TMB
SUB BUF	Substraatbuffer
STOP SOLN	Stopoplossing
INC SER	Incubatieserum
BUF	Buffer
Ab AP	AP Conjugaat
SUB PNPP	Substraat PNPP
BIOT CONJ CONC	Geconcentreerd Biotine conjugaat
AVID HRP CONC	Geconcentreerd Avidine-HRP conjugaat
ASS BUF	Assay buffer
Ab BIOT	Biotine conjugaat
Ab	Specifiek antilichaam
SAV HRP CONC	Streptavidine-HRP concentraat
NSB	Aspecifieke binding
2nd Ab	2de antilichaam
ACID BUF	Verzurringsbuffer

	<u>Simboli utilizzati</u>
	Consultare le istruzioni per l'uso
	Limitazioni di temperatura
	Utilizzare entro
LOT	Numero di lotto
REF	Numero di catalogo
CONTROL	Controllo
I V D	Dispositivo medico-diagnostico in vitro
	Fabbricante
	Contenuto sufficiente per <n> saggi
WASH SOLN CONC	Tampone di lavaggio concentrato
CAL 0	Calibratore zero
CAL N	Standard #
CONTROL N	Controllo #
Ag 125I	Marcato
Ab 125I	Marcato
Ag 125I CONC	Marcato concentrato
Ab 125I CONC	Marcato concentrato
	Provette
INC BUF	Tampone incubazione
ACETONITRILE	Acetonitrile
SERUM	Siero
DIL SPE	Diluente campione
DIL BUF	Tampone diluizione
ANTISERUM	Antisiero
IMMUNOADSORBENT	Immunoassorbente
DIL CAL	Diluente calibratore
REC SOLN	Soluzione di ricostituzione
PEG	Polietilenglicole
EXTR SOLN	Soluzione di estrazione
ELU SOLN	Soluzione di eluizione
GEL	Cartucce di silice bond elut
PRE SOLN	Soluzione di pretrattamento
NEUTR SOLN	Soluzione di neutralizzazione
TRACEUR BUF	Tracer Buffer
	Piastra di microtitolazione
Ab HRP	HRP Coniugato
Ag HRP	HRP Coniugato
Ab HRP CONC	HRP Coniugato concentrato
Ag HRP CONC	HRP Coniugato concentrato
CONJ BUF	Buffer coniugato
CHROM TMB CONC	Cromogena TMB concentrato
CHROM TMB	Soluzione cromogena TMB
SUB BUF	Tampone substrato
STOP SOLN	Soluzione di arresto
INC SER	Incubazione con siero
BUF	Buffer
Ab AP	AP Coniugato
SUB PNPP	Substrato PNPP
BIOT CONJ CONC	Concentrato coniugato con biotina
AVID HRP CONC	Concentrato avidina HRP
ASS BUF	Soluzione tampone per test
Ab BIOT	Coniugato con biotina
Ab	Anticorpo Specifico
SAV HRP CONC	Streptavidina-HRP concentrata
NSB	Legame non-specifico
2nd Ab	2° Anticorpo
ACID BUF	Tampone Acidificante

	<u>Επεξήγηση συμβόλων</u>
	Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης
	Θερμοκρασία αποθήκευσης
	Ημερομηνία λήξης
LOT	Αριθμός παρτίδας
REF	Αριθμός καταλόγου
CONTROL	Πρότυπο ελέγχου
I V D	In Vitro Διαγνωστικό Ιατροτεχνολογικό προϊόν
	Κατασκευαστής
	Περιεχόμενο επαρκές για «n» εξετάσεις
WASH SOLN CONC	Συμπυκνωμένο διάλυμα έκπλυσης
CAL 0	Μηδενικός βαθμονομητής
CAL N	Βαθμονομητής #
CONTROL N	Ορός ελέγχου #
Ag 125I	Ιχνηθέτης
Ab 125I	Ιχνηθέτης
Ag 125I CONC	Χρωμογόνος Ιχνηθέτης
Ab 125I CONC	Χρωμογόνος Ιχνηθέτης
	Σώληνάρια
INC BUF	Ρυθμιστικό διάλυμα επώασης
ACETONITRILE	Ακετονιτρίλιο
SERUM	Ορός
DIL SPE	Διάλυμα αραίωσης δειγμάτων
DIL BUF	Ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης
ANTISERUM	Αντιορός
IMMUNOADSORBENT	Ανοσοπροσροφητικό
DIL CAL	Αραιωτικό βαθμονομητών
REC SOLN	Διάλυμα ανασύστασης
PEG	Πολυαιθυλενογλυκόλη
EXTR SOLN	Διάλυμα εκχύλισης
ELU SOLN	Διάλυμα έκλουσης
GEL	Φύσιγγες πυριτίου Bond Elut
PRE SOLN	Διάλυμα προεπεξεργασίας
NEUTR SOLN	Διάλυμα εξουδετέρωσης
TRACEUR BUF	Ρυθμιστικό διάλυμα
	Πλάκα μικροτιτλοδότησης
Ab HRP	HRP Σύζευγμα
Ag HRP	HRP Σύζευγμα
Ab HRP CONC	Χρωμογόνος HRP Σύζευγμα
Ag HRP CONC	Χρωμογόνος HRP Σύζευγμα
CONJ BUF	Ρυθμιστικό διάλυμα συζεύγματος
CHROM TMB CONC	Χρωμογόνος TMB
CHROM TMB	Διάλυμα χρωμογόνου TMB
SUB BUF	Ρυθμιστικό διάλυμα υποστρώματος
STOP SOLN	Ανασχετικό αντιδραστήριο
INC SER	Ορός επώασης
BUF	Ρυθμιστικό διάλυμα
Ab AP	AP Σύζευγμα
SUB PNPP	PNPP υποστρώματος
BIOT CONJ CONC	Συμπυκνωμένο αντιδραστήριο συζευγμένο με βιοτίνη
AVID HRP CONC	Συμπυκνωμένο διάλυμα αβιδίνης-HRP
ASS BUF	Ρυθμιστικό διάλυμα προσδιορισμού
Ab BIOT	αντιδραστήριο συζευγμένο με βιοτίνη
Ab	Ειδικό Αντίσωμα
SAV HRP CONC	Συμπυκνωμένη στρεπταβιδίνη συνεξευγμένη με HRP
NSB	μη-ειδική δέσμευση
2nd Ab	2ο Αντίσωμα
ACID BUF	Ρυθμιστικό Διάλυμα όξινο

		<u>Stosowane symbole</u>
		Przed zastosowaniem zapoznać się z instrukcją
		Temperatura przechowywania
		Zużyć przed
LOT		Kod serii
REF		Numer katalogowy
CONTROL		Kontrola
I V D		Urządzenie medyczne do diagnostyki in vitro
		Producent
		Zawartość wystarczająca do <n> testów
WASH SOLN CONC		Roztwór płuczący stężony
CAL 0		Kalibrator zerowy
CAL N		Kalibrator nr
CONTROL N		Kontrola nr
Ag 125I		Znacznik izotopowy
Ab 125I		Znacznik izotopowy
Ag 125I CONC		Znacznik izotopowy stężony
Ab 125I CONC		Znacznik izotopowy stężony
		Probówki
INC BUF		Wymagana inkubacja buforu
ACETONITRILE		Acetonitryl
SERUM		Surowica
DIL SPE		Rozcieńczalnik próbek
DIL BUF		Bufor do rozcieńczania
ANTISERUM		Antysurowica
IMMUNOADSORBENT		Immunoabsorbent
DIL CAL		Rozcieńczalnik kalibratora
REC SOLN		Roztwór do rozcieńczania
PEG		Glikol poli(oksy)etylenowy
EXTR SOLN		Roztwór ekstrakcyjny
ELU SOLN		Roztwór elucyjny
GEL		Kolumny krzemionkowe Bond Elut
PRE SOLN		Roztwór do przygotowania wstępnego
NEUTR SOLN		Roztwór neutralizujący
TRACEUR BUF		Bufor znacznika
ULI		mikropłytki
Ab HRP		Koniugat peroksydazy chrzanowej
Ag HRP		Koniugat peroksydazy chrzanowej
Ab HRP CONC		Koncentrat koniugatu peroksydazy chrzanowej
Ag HRP CONC		Koncentrat koniugatu peroksydazy chrzanowej
CONJ BUF		Bufor do koniugacji
CHROM TMB CONC		Koncentrat chromogenu TMB (czterometylobenzydyny)
CHROM TMB		Roztwór chromogenu TMB (czterometylobenzydyny)
SUB BUF		Bufor substratu
STOP SOLN		Roztwór zatrzymujący reakcję
INC SER		Wymagana inkubacja surowicy
BUF		Bufor
Ab AP		Koniugat AP (fosfatazy alkalicznej)
SUB PNPP		p-nitrofenylofosforan substratowy
BIOT CONJ CONC		Koncentrat koniugatu biotyny
AVID HRP CONC		Koncentrat peroksydazy chrzanowej z awidyną
ASS BUF		Bufor do oznaczania
Ab BIOT		Koniugatu biotyny
Ab		Przeciwciało swoiste
SAV HRP CONC		Koncentrat streptawidyny HRP
NSB		Wiązanie nieswoiste
2nd Ab		Drugie przeciwciało
ACID BUF		Bufor zakwaszający