

# AFP

## (Alfafetoproteína)

### Uso Previsto:

El ensayo AFP es un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) para la determinación cuantitativa in vitro de alfafetoproteína (AFP) en suero humano.

### Resumen:

La AFP es una glicoproteína con un peso molecular de entre 65.000 y 70.000 Daltons que incluye un 4 % de carbohidratos durante el desarrollo fetal. La AFP mantiene niveles elevados en el suero y desciende a niveles muy bajos durante el resto de la vida. La AFP está elevada en las enfermedades malignas de origen hepatocelular, testicular no seminomatoso y, en ocasiones, de otro origen de la endodermis puede estar ligeramente elevada o persistir en los pacientes con grandes metástasis hepáticas o hepatitis viral. La medición de AFP es ampliamente aceptada como marcador tumoral y para monitorear la efectividad terapéutica del cáncer hepatocelular y el cáncer testicular no seminomatoso. La concentración más alta de AFP aparece en el líquido amniótico en las primeras etapas del embarazo y disminuye en concentración durante el resto del embarazo. Se encontraron niveles elevados de AFP en el líquido amniótico en fetos con defectos del tubo neural abierto, espina bífida o anencefalia también se encontraron en fetos con enfermedad hemolítica fetal grave, onfalocelo, atresia esofágica, nefrosis congénita, muerte intrauterina o hemorragia fetal en el líquido amniótico. Para fines de diagnóstico, la ultrasonografía y la medición de acetilcolinesterasa deben realizarse junto con la medición de AFP.<sup>1,2,3</sup> El ensayo AFP proporciona un sistema de inmunoensayo enzimático con alta sensibilidad para la medición de AFP humana en suero.

### Principio de Prueba:

Duración total de la prueba: 50 minutos.

El ensayo AFP es un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) cuantitativo en fase sólida. Los pocillos están recubiertos con anticuerpos anti-AFP. Las muestras, los estándares y los controles se incuban en los pocillos con un conjugado enzimático, que es otro anticuerpo dirigido hacia una región diferente de las moléculas de AFP y conjugado químicamente con peroxidasa de rábano picante. El conjugado enzimático no unido se lava y la cantidad de peroxidasa unida es proporcional a la concentración de AFP presente en las Muestras, Estándares y Controles, la intensidad del color desarrollado es proporcional a la concentración de AFP en el suero, La densidad óptica de las muestras coloreadas se lee con un lector de microplacas a 450 nm.

### Materiales Proporcionados:

- Microplaca recubierta, 8 x 12 tiras, 96 pocillos
- Calibradores, 6 viales, 1 mL cada uno, listos para usar; con concentraciones indicadas en cada envase.
- Conjugado enzimático 1 vial, 11 ml
- Sustrato, 1 vial, 11mL, listo para usar, (tetrametilbencidina) TMB.
- Solución de parada, 1 vial, 6,0 mL de ácido sulfúrico 1 mol/L.
- Concentrado de solución de lavado, 1 vial, 25 ml (concentrado 40X), solución de lavado PBS-Tween.
- Inserto: 1 copia.
- Tapa Placa: 1 pieza.

### Materiales Requeridos (Pero no provistos):

- Lector de microplacas con capacidad absorbente de longitudes de ondas de 450 nm y 620 nm.
- Micropipetas y micropipetas multicanal que suministran 50 µl con una precisión superior al 1,5%.
- Sacudidor de placas.
- Incubadora.
- Lavador de microplacas.
- Papel absorbente.
- Agua destilada.

### Precauciones y Advertencias:

- Sólo para uso diagnóstico in vitro.
- Tome las precauciones normales requeridas para el manejo de todos los reactivos de laboratorio.
- La eliminación de todos los materiales de desecho debe realizarse de acuerdo con las pautas locales.
- No utilice reactivos más allá de la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.
- No mezcle ni utilice componentes de kits con diferentes códigos de lote.
- Todos los desechos de muestras y reacciones deben considerarse potencialmente biopeligrosos. La manipulación de las muestras y los residuos de la reacción debe realizarse de acuerdo con las normativas y directrices locales.

- La solución de parada contiene ácido sulfúrico, que puede causar quemaduras graves. En caso de contacto con los ojos, lávense inmediata y abundantemente con agua y acúdase a un médico.
- Los ácidos neutralizados y otros desechos líquidos deben descontaminarse agregando un volumen suficiente de hipoclorito de sodio para obtener una concentración final de al menos 1,0%. Puede ser necesaria la exposición a hipoclorito de sodio al 1,0 % durante 30 minutos para garantizar una descontaminación eficaz.
- Algunos reactivos contienen 0,05 % o 0,1 % de ProClin 300 que puede causar sensibilización por contacto con la piel, por lo que debe evitarse. Los reactivos y sus recipientes deben desecharse de forma segura. En caso de ingestión, acúdase inmediatamente al médico y muéstresela la etiqueta o el envase.
- El sustrato tiene un efecto irritante sobre la piel y las mucosas. En caso de posible contacto, lavar los ojos con abundante agua y la piel con jabón y abundante agua. Lave los objetos contaminados antes de reutilizarlos. Si es inhalado, lleve a la persona al aire libre.
- Para obtener información sobre las sustancias peligrosas incluidas en el kit, consulte la Hoja de datos de seguridad de materiales (MSDS), que está disponible a pedido.
- No pipetear con la boca. Use ropa protectora, guantes desechables y protección para los ojos y la cara al manipular muestras y reactivos. Lávese las manos después de su uso.
- Si alguno de los reactivos entra en contacto con la piel o los ojos, lavar abundantemente la zona con agua.

### Almacenamiento y Estabilidad:

- Almacenar a 2-°C.
- Selle y devuelva los reactivos no utilizados a 2-8°C, en cuyas condiciones se mantendrá la estabilidad durante 2 meses o hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta, lo que ocurra primero.

### Recolección y Preparación de Muestras:

- Se recomienda suero humano para esta prueba.
- Tapar y almacenar las muestras a 18-25°C por no más de 8 horas. Estable durante 7 días a 2-8°C y 1 mes a -20°C. Congelar una sola vez.
- No utilice muestras inactivadas por calor.
- Los sedimentos y los sólidos en suspensión en las muestras pueden interferir con el resultado de la prueba, por lo que se deben eliminar mediante centrifugación. Asegúrese de que se haya formado completamente el coágulo en las muestras de suero antes de la centrifugación.
- Evite muestras muy hemolíticas, lipémicas o turbias.

### Control de Calidad:

Cada laboratorio debe tener controles de ensayo a niveles en el rango bajo, normal y elevado para monitorear el rendimiento del ensayo. Los controles deben tratarse como desconocidos y los valores deben determinarse en cada procedimiento de prueba realizado. El requisito de control recomendado para este ensayo es utilizar un control de veracidad por separado y analizarlos junto con las muestras en la misma serie. El resultado es válido si los valores de control se encuentran dentro de los rangos de concentración impresos en las etiquetas.

### Solución de Lavado (Dilución 40X):

Agregue agua desionizada al concentrado de solución de lavado concentrado 40X. Diluya 25 ml de solución de lavado concentrada con 975 ml de agua desionizada hasta un volumen final de 1000 ml. Estable durante 2 meses a temperatura ambiente.

### Procedimiento de Prueba:

Asegúrese de que las muestras, los calibradores y los controles de los pacientes estén a temperatura ambiente (18-25°C) antes de la medición. Mezcle todos los reactivos invirtiéndolos suavemente antes de usarlos.

- Utilice solo el número de pocillos necesarios e identifique los pocillos de las microplacas para cada calibrador y muestra que vaya a analizar.
- Agregue 100 µL de calibradores o muestras a cada pozo, luego incube por 20 minutos a 37°C.
- Agregue 350 µL de solución de lavado, decante (golpee y seque) o aspire. Repita 4 veces adicionales para un total de 5 lavados. Un lavador automático de tiras de microplacas puede ser usado. Al final del lavado, invierta la placa y saque la solución de lavado residual sobre papel absorbente.
- Agregue 100 µL de conjugado enzimático a cada pocillo. Agite la microplaca suavemente durante 30 segundos para mezclar. Cubra la placa con una tapa para placas e incube a 37°C durante 20 minutos.
- Desechar el contenido de la microplaca por decantación o aspiración. Si se decanta, golpee y seque la placa con papel absorbente.
- Agregue 350 µL de solución de lavado, decante (golpee y seque) o aspire. Repita 4 veces adicionales para un total de 5 lavados. Se puede utilizar un lavador automático de tiras de microplacas. Al final del lavado, invierta la placa y saque la solución de lavado residual sobre papel absorbente.
- Agregue 100 µL de sustrato a cada pocillo.
- Cubra e incube a temperatura ambiente (18-25°C) en la oscuridad durante 10 minutos para que reaccione. No agite la placa después de agregar el sustrato.

- Agregue 50 µL de solución de parada a cada pocillo.
- Agite durante 15 a 20 segundos para mezclar el líquido dentro de los pocillos. Es importante asegurarse de que el color azul cambie a amarillo por completo.
- Lea la absorbancia de cada pocillo a 450 nm (usando de 620 a 630 nm como longitud de onda de referencia para minimizar las imperfecciones de los pocillos) en un lector de microplacas. Los resultados deben leerse dentro de los 30 minutos posteriores a la adición de la solución de parada.

#### Cálculo:

- Registre la absorbancia obtenida de la impresión del lector de microplacas.
  - Calcule la absorbancia media de cualquier medición duplicada y utilice la media para el siguiente cálculo.
  - Grafique el logaritmo común de absorbancia frente a la concentración en ng/mL para cada calibrador.
  - Dibuje la curva que mejor se ajuste a través de los puntos trazados en papel cuadrículado lineal. Se sugiere el método punto a punto para generar una curva de calibración.
- Los siguientes datos son solo para demostración y no se pueden usar en lugar de las generaciones de datos en el momento del ensayo.

Muestra	Valor de la Muestra (ng/mL)	Absorbancia
Calibrador A	0	0.018
Calibrador B	10	0.251
Calibrador C	20	0.586
Calibrador D	50	1.293
Calibrador E	100	2.114
Calibrador F	400	2.588
Control 1	11.13	0.289
Control 2	55.05	1.376
Muestra	16.48	0.468

#### Limitaciones e Interferencias:

- La AFP tiene una baja sensibilidad y especificidad clínica como marcador tumoral. Clínicamente, un valor elevado de AFP por sí solo no tiene valor diagnóstico como prueba para el cáncer y solo debe usarse con otras manifestaciones clínicas (observaciones) y parámetros diagnósticos. Se sabe que los niveles de AFP están elevados en una serie de enfermedades y afecciones benignas, incluido el embarazo y enfermedades hepáticas no malignas, como la hepatitis y la cirrosis.
- Para fines de diagnóstico, los resultados siempre deben evaluarse junto con el historial médico del paciente, el examen clínico y otros hallazgos.

#### Rango de Medición:

1,0-400 ng/mL (definido por el límite inferior de detección y el máximo de la curva maestra). Los valores por debajo del límite de detección inferior se notifican como <1,0 ng/ml. Los valores por encima del rango de medición se reportan como >400 ng/mL.

#### Límite Inferior de Detección:

1,0 ng/mL.

El límite de detección representa el nivel de analito más bajo que se puede distinguir de cero. Se calcula como el valor que se encuentra dos desviaciones estándar por encima del estándar más bajo (calibrador maestro, estándar 1 + 2 SD, estudio de reproducibilidad, n = 18).

#### Valores Esperados:

Hombre y mujer: < 8,5 ng/mL (97-98 %).

Aproximadamente el 97-98% de la población sana normal tiene niveles de AFP inferiores a 8,5 ng/ml. En pacientes de alto riesgo, valores de AFP entre 100-350 ng/ml sugieren carcinoma hepatocelular. Las concentraciones superiores a 350 ng/ml suelen indicar la enfermedad.

Los valores de AFP para una población normal sana y mujeres embarazadas, durante el ciclo de gestación, se detallan a continuación. Los valores que se muestran a continuación representan estudios internos limitados de acuerdo con la literatura publicada.<sup>5,6,7</sup>

#### Valores Medios de Durante la Gestación:

Gestación (Semana)	AFP (ng/mL)
15	39.20
16	42.45
17	51.26
18	60.88
19	74.87
20	82.98
21	89.78

Cada laboratorio debe investigar la transferibilidad de los valores esperados a su propia población de pacientes y, si es necesario, determinar sus propios rangos de referencia.

#### Datos de Rendimiento Específicos:

Los datos de rendimiento representativos se dan a continuación. Los resultados obtenidos en laboratorios individuales pueden diferir.

#### Precisión:

La precisión se determinó usando reactivos, sueros humanos agrupados y controles en un protocolo modificado (EP5-A) del CLSI (Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio): 2 veces al día durante 20 días (n = 40). Los siguientes resultados fueron obtenidos:

Muestra	Reproducibilidad			Precisión Intermedia		
	Media ng/mL	SD ng/mL	CV %	Media ng/mL	SD ng/mL	CV %
Suero 1	2.36	0.195	8.26	2.98	0.278	9.33
Suero 2	18.45	1.415	7.67	19.17	1.522	7.94
Suero 3	128.28	8.877	6.92	128.57	9.321	7.25
PC Universal 1	22.57	1.677	7.43	23.24	2.038	8.77
PC Universal 2	84.21	5.962	7.08	86.62	6.522	7.53

\*Reproducibilidad = Precisión dentro de la ejecución

#### Comparación de Métodos:

Una comparación del ensayo AFP (y) con Elecsys AFP ELISA (x) usando muestras clínicas arrojó las siguientes correlaciones:

Número de muestras medidas: 119

Regresión Lineal.

$y = 1,0346X - 0,4253$

$r = 0,9856$

Las concentraciones de la muestra estaban entre aprox. 2,0 y 380 ng/ml.

#### Sensibilidad Funcional:

1,20 ng/mL

La sensibilidad funcional es la concentración de analito más baja que se puede medir de forma reproducible con un CV de precisión intermedia del 20 %.

#### Referencias:

1. Ruosiahti, E., H. Pihko y M. Seppaia. Transplant Rev. 20:38-60, 1974.
2. Sliver, HKB, P. Goid, S. Feder, S.O. Freeman y J. Shuster. proc. nacional Acad. Sci. USA 70: 526-530, 1973
3. Braunstein, G.D., K.R. McIntire y T.A. Walaman. Cáncer 32:1065-1068, 1973.
4. Li D, Mallory T, Satomura S, "AFP; una nueva generación de marcadores tumorales para el carcinoma hepatocelular", Clin Chem Acta, 313, 15-9 (2001).
5. Canick JA, Rish S. 'La precisión de los riesgos asignados en la detección del suero materno', Diagnóstico prenatal; 18:413-415 (1998).
6. Declaración de la conferencia sobre el estado de la ciencia de los NIH sobre el manejo de los síntomas relacionados con la menopausia. NIH Consensus State Sci Declaraciones. 21-23 de marzo; 22(1), 1-38 (2005).
7. Tietz NW, ED: Clinical Guide to Laboratory Tests 3rd Ed, Philadelphia, WA Saunders Co (1995).

