

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АЛЬФА-ФЕТОПРОТЕИНА В СЫВОРОТКЕ И ПЛАЗМЕ КРОВИ «АФП-ИФА»

Рекомендована к утверждению Научно-экспертным Советом по медицинским изделиям

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «АФП-ИФА» предназначен для количественного определения концентрации альфа-фетопротеина в сыворотке и плазме крови методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Альфа-фетопротеин (АФП) – гликопротеин с молекулярной массой около 65 кДа, секретирующийся плодной печенью и желточным мешком. АФП является основным белком плодной сыворотки, у взрослых содержание АФП в сыворотке крови незначительно. Определение АФП в сыворотке крови используется для первичной диагностики и мониторинга гепатоцеллюлярного рака печени, эмбриональноклеточных опухолей яичников и яичек, тератом и тератокарцином любой локализации. Определение АФП в сыворотке крови беременных женщин или в амниотической жидкости в период с 15 до 20 недели служит одним из лабораторных методов выявления тяжелой врожденной патологии плода – синдрома Дауна и дефектов нервной трубки.

2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

Определение альфа-фетопротеина основано на использовании «сэндвич»-варианта твердофазного иммуноферментного анализа. На внутренней поверхности лунок планшета иммобилизованы мышинные моноклональные антитела к АФП человека. В лунках планшета, при добавлении исследуемого образца, происходит связывание АФП, содержащегося в исследуемом образце, с антителами на твердой фазе. Образовавшийся комплекс выявляют с помощью конъюгата мышинных моноклональных антител к АФП человека с пероксидазой хрена. В результате образуется связанный с пластиком «сэндвич», содержащий пероксидазу. Во время инкубации с раствором субстрата тетраметилбензидина (ТМБ) происходит окрашивание растворов в лунках. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации альфа-фетопротеина в исследуемом образце. Концентрацию альфа-фетопротеина в исследуемых образцах определяют по калибровочному графику зависимости оптической плотности от содержания альфа-фетопротеина в калибровочных пробах.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность. Перекрестная реакция мышинных моноклональных антител к АФП человека с другими аналитами приведена в таблице:

Аналит	Перекрестная реакция, %
Сывороточный альбумин	<0.1
ХГ	<0.1
Плацентарный лактоген	<0.1

3.2. Воспроизводимость.

Коэффициент вариации результатов определения содержания АФП в одном и том же образце сыворотки (плазмы) крови с использованием Набора «АФП-ИФА» не превышает 8.0%.

3.3. Линейность.

Зависимость концентрации АФП в образцах сыворотки (плазмы) крови при разведении их сывороткой (плазмой) крови, не содержащей АФП, имеет линейный характер в диапазоне концентраций 5–500 МЕ/мл и составляет $\pm 10.0\%$.

3.4. Точность.

Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» – соответствие измеренной концентрации АФП предписанной, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы 15.0 МЕ/мл. Процент «открытия» составляет 90–110%.

3.5. Чувствительность.

Минимальная достоверно определяемая Набором «АФП-ИФА» концентрация АФП в сыворотке (плазме) крови не превышает 0.9 МЕ/мл.

3.6. Хук-эффект (hook-effect) высоких концентраций.

При использовании Набора «АФП-ИФА» хук-эффект не обнаружен до концентрации АФП 12000 МЕ/мл.

4. СОСТАВ НАБОРА

Код компонента	Символ	Наименование	Кол-во	Ед.	Описание
1	P225Z	SORB MTP	1	шт.	-
2	C225Z	CAL 1-6	6	шт.	прозрачные жидкости красного цвета (калибровочная проба 0 – прозрачная бесцветная жидкость)
3	Q225Z	CONTROL	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
4	T225Z	CONJ HRP	1	шт.	прозрачная жидкость красного цвета
5	R055Z	SUBS TMB	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
6	S008Z	BUF WASH 26X	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
7	R050Z	STOP	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
8	N003	-	2	шт.	-
9	K225I	-	1	шт.	-
10	K225Q	-	1	шт.	-

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

5.1. Потенциальный риск применения Набора – класс 26 (ГОСТ Р 51609-2000).

5.2. Все компоненты Набора, за исключением стоп-реагента (5.0% раствор серной кислоты), в используемых концентрациях являются нетоксичными.

Раствор серной кислоты обладает раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. При попадании на кожу и слизистые пораженный участок следует промыть большим количеством проточной воды.

5.3. При работе с Набором следует соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противозидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

5.4. При работе с Набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированный материал, способный длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

6. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

- фотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность содержимого лунок планшета при длине волны 450 нм;
- термостат, поддерживающий температуру $+37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.1\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- дозаторы со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы в диапазоне 25–250 мкл;
- цилиндр мерный вместимостью 1000 мл;
- вода дистиллированная;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- бумага фильтровальная.

7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

7.1. Перед проведением анализа компоненты Набора и исследуемые образцы сыворотки (плазмы) крови следует выдержать при комнатной температуре ($+18...+25\text{ }^{\circ}\text{C}$) не менее 30 мин.

7.2. Приготовление планшета.

Вскрыть пакет с планшетом и установить на рамку необходимое количество стрипов. Оставшиеся неиспользованными стрипы, чтобы предотвратить воздействие на них влаги, тщательно заклеить бумагой для заклеивания планшета и хранить при температуре $+2...+8\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности Набора.

7.3. Приготовление отмывочного раствора.

Содержимое флакона с концентратом отмывочного раствора (22 мл), перенести в мерный цилиндр вместимостью 1000 мл, добавить 550 мл дистиллированной воды и тщательно перемешать. В случае дробного использования Набора следует отобрать необходимое количество концентрата отмывочного раствора и развести дистиллированной водой в 26 раз (1 мл концентрата отмывочного раствора + 25 мл дистиллированной воды).

8. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

8.1. Набор реагентов «АФП-ИФА» должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности, указанного на упаковке Набора.

Допускается хранение (транспортировка) Набора при температуре до +25 °С не более 15 суток. Не допускается замораживание целого набора.

Допускается однократное замораживание (-20 °С) калибровочных проб и контрольной сыворотки в аликвотах.

8.2. Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 41 исследуемых образцов, 6 калибровочных проб и 1 пробы контрольной сыворотки (всего 96 определений).

8.3. В случае дробного использования Набора компоненты следует хранить следующим образом:

- оставшиеся неиспользованными стрипы необходимо тщательно заклеить бумагой для заклеивания планшета и хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора;
- конъюгат, субстрат, стоп-реагент после вскрытия флаконов следует хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора;
- калибровочные пробы и контрольную сыворотку после вскрытия флаконов следует хранить при температуре +2...+8 °С не более 2 месяцев;
- оставшийся неиспользованным концентрат отмывочного раствора следует хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора. Приготовленный отмывочный раствор следует хранить при комнатной температуре (+18...+25 °С) не более 15 суток или при температуре +2...+8 °С не более 45 суток.

Примечание. После использования реагента немедленно закрывайте крышку флакона. Закрывайте каждый флакон своей крышкой.

8.4. Для проведения анализа не следует использовать гемолизированную, мутную сыворотку (плазму) крови, а также сыворотку (плазму) крови, содержащую азид натрия. Если анализ производится не в день взятия крови, сыворотку (плазму) следует хранить при температуре -20 °С. Повторное замораживание-оттаивание образцов сыворотки (плазмы) крови не допускается. Допускается исследование сывороток, хранение которых с момента забора крови осуществлялось при температуре от +2 °С до +8 °С не более 7 суток.

8.5. Исключается использование для анализа образцов сыворотки (плазмы) крови людей, получавших в целях диагностики или терапии препараты, в состав которых входят мышинные антитела.

8.6. При использовании Набора для проведения нескольких независимых серий анализов следует иметь в виду, что для каждого независимого определения необходимо построение нового калибровочного графика; кроме этого, рекомендуется определение концентрации альфа-фетопротейна в контрольной сыворотке.

8.7. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение Инструкции по применению Набора.

8.8. Не используйте компоненты из других наборов или из аналогичных наборов других серий.

9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

1	Поместите в рамку необходимое количество стрипов – исследуемые образцы в 2 повторах и 14 лунок для калибровочных проб и контрольной сыворотки.
2	Если предполагается концентрация АФП в исследуемом образце превышает 500 МЕ/мл, его следует дополнительно развести; используя калибровочную пробу 0. Использование других буферов и реагентов для разбавления образцов может исказить результаты определения! Примечание. Для получения надежных результатов рекомендуется использовать несколько последовательных разведений исследуемого образца сыворотки (плазмы) крови.
3	Внесите во все лунки по 100 мкл конъюгата.
4	Внесите в соответствующие лунки в дубликатах по 50 мкл калибровочной пробы и контрольной сыворотки. В остальные лунки внесите в дубликатах по 50 мкл исследуемых образцов сыворотки (плазмы) крови. Внесение калибровочных проб, контрольной сыворотки и исследуемых образцов необходимо произвести в течение 15 минут.
5	Заклейте планшет бумагой для заклеивания планшета и инкубируйте его в течение 60 минут при температуре +37 °С.
6	По окончании инкубации удалите содержимое лунок и отмойте лунки 5 раз. При каждой отмывке добавьте во все лунки по 250 мкл отмывочного раствора (см. п. 7.3), встряхните планшет круговыми движениями по горизонтальной поверхности с последующей аспирацией или декантированием. Задержка при отмывке (замачивание лунок) не требуется. При каждом декантировании необходимо тщательно удалять остатки жидкости из лунок постукиванием планшета в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.
7	Внесите во все лунки по 100 мкл раствора субстрата тетраметилбензидина. Внесение раствора субстрата тетраметилбензидина в лунки необходимо произвести в течение 2–3 мин. Инкубируйте планшет в темноте при комнатной температуре (+18...+25 °С) в течение 10–20 минут в зависимости от степени развития синего окрашивания.
8	Внесите во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор субстрата тетраметилбензидина, по 100 мкл стоп-реагента , при этом содержимое лунок окрашивается в ярко-желтый цвет.
9	Измерьте величину оптической плотности (ОП) содержимого лунок планшета на фотометре вертикального сканирования при длине волны 450 нм. Измерение ОП содержимого лунок планшета необходимо произвести в течение 15 мин после внесения стоп-реагента. Бланк фотометра представляйте по калибровочной пробе С1.
10	Постройте в линейных координатах калибровочный график: ось абсцисс (х) – концентрация АФП в калибровочных пробах (МЕ/мл), ось ординат (у) – оптическая плотность калибровочных проб (ОП 450 нм). Для алгоритма обчета (аппроксимации) калибровочного графика используйте интервальный (кусочно-линейный, «от точки к точке») метод.
11	Определите по калибровочному графику содержание АФП в исследуемых образцах. Если исследуемый образец предразводили (см. п.2), умножьте полученный результат на фактор разведения.

10. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ И НОРМЫ

10.1. Основываясь на результатах исследований, проведенных ООО «ХЕМА», рекомендуем пользоваться нормами, приведенными ниже. Вместе с тем, в соответствии с правилами *GLP* (Хорошей лабораторной практики), каждая лаборатория должна сама определить параметры нормы, характерные для обследуемой популяции.

Примечание. Значения концентраций АФП в исследуемых образцах, находящиеся ниже границы чувствительности Набора (0.9 МЕ/мл), а также превышающие значение верхней калибровочной пробы (500 МЕ/мл) следует приводить в следующей форме: в исследуемом образце X концентрация АФП ниже 0.9 МЕ/мл или выше 500 МЕ/мл.

В Наборе «АФП-ИФА» значения концентраций калибровочных проб выражены в МЕ/мл. Для пересчета концентраций в нг/мл, полученное значение концентрации в МЕ/мл следует умножить на 1.25.

$$1 \text{ МЕ/мл} = 1.25 \text{ нг/мл}$$

Исследуемая группа	Единицы, МЕ/мл		Единицы доп., нг/мл	
	Нижний предел	Верхний предел	Нижний предел	Верхний предел
Здоровые доноры	-	10.0	-	12.5

Медианы и СКО (рекомендуемый диапазон норм 0.5-2.0 MOM)

Беременные, неделя	Медиана, МЕ/мл	СКО
14	21.7	0.43
15	28.3	0.47
16	30.0	0.51
17	36.3	0.49
18	43.8	0.52
19	53.3	0.50
20	60.0	0.55
21	63.3	0.57

11. ЛИТЕРАТУРА

1. Johnson, P.J, (2002) Tumor Markers in Primary Malignancies of the liver. In «Tumor Markers: Physiology, pathobiology, technology and clinical applications», ed. Dimandis E.P. AACCC Press, Washington pp 269-276.
2. Stenman, U-H and Alfthan, H. (2002) Markers for Testicular Cancer. In «Tumor Markers: Physiology, pathobiology, technology and clinical applications», ed. Dimandis E.P. AACCC Press, Washington, pp 351-359.
3. Christiansen, M. et al. Alpha-fetoprotein in plasma and serum of healthy adults: preanalytical, analytical and biological sources of variation and construction of age-dependent reference intervals. Scand J Invest 2001 61: 205-216.
4. Trape, J. et al. Reference change value for a-Fetoprotein and its application in early detection of hepatocellular carcinoma in patients with hepatic disease. Clin Chem 2003 49(7): 1209-1211.

По вопросам, касающимся качества Набора **«АФП-ИФА»**, следует обращаться в ООО «ХЕМА» по адресу:
105043, г. Москва, а/я 58
105264, г. Москва, ул. 9-я Парковая, д. 48, 1-й под., 5 этаж,
тел/факс (495) 737-39-36, 737-00-40, 510-57-07 (многоканальный)

электронная почта: info@xema.ru; rqc@xema.ru
интернет: www.xema.ru; www.xema-medica.com

Руководитель службы клиентского сервиса ООО «ХЕМА»,
к. б. н. Д. С. Кострикин

Instruction for use

A SOLID-PHASE ENZYME IMMUNOASSAY FOR THE QUANTITATIVE DETERMINATION OF ALPHA-FETOPROTEIN IN HUMAN SERUM OR PLASMA

1. INTENDED USE

A solid-phase enzyme immunoassay for the quantitative determination of alpha-fetoprotein in blood serum or plasma.

This kit is designed for measurement of alpha-fetoprotein in blood serum or plasma. For possibility of use with other sample types, please, refer to Application Notes (on request). The kit contains reagents sufficient for 96 determinations and allows to analyze 42 unknown samples in duplicates.

2. SUMMARY AND EXPLANATION

Alpha-fetoprotein (AFP) is a glycoprotein with a MW ca. 65 kDa which is secreted by fetal liver and yolk sac. AFP represents the main protein of fetal serum while being found in trace quantities in adults. Serum AFP quantitative determination is used in primary diagnostics and monitoring of hepatocellular liver cancer, trophoblastic tumours of testicles and ovary as well as theratomas and theratocarcinomas. Quantitative determination of AFP in serum of pregnant women or in amniotic fluid during week 15-20 of gestation is widely used for laboratory screening of Down syndrome and defects of spinal cord.

3. PRINCIPLE OF THE TEST

This test is based on two-site sandwich enzyme immunoassay principle. Tested specimen is placed into the microwells coated by specific murine monoclonal to human AFP-antibodies. Antigen from the specimen is captured by the antibodies coated onto the microwell surface. Second antibodies – murine monoclonal to human AFP, labelled with peroxidase enzyme, are then added into the microwells. After washing procedure, the remaining enzymatic activity bound to the microwell surface is detected and quantified by addition of chromogen-substrate mixture, stop solution and photometry at 450 nm. Optical density in the microwell is directly related to the quantity of the measured analyte in the specimen.

4. WARNINGS AND PRECAUTIONS

4.1. For professional use only.

4.2. This kit is intended for in vitro diagnostic use only.

4.3. INFECTION HAZARD: There is no available test methods that can absolutely assure that Hepatitis B and C viruses, HIV-1/2, or other infectious agents are not present in the reagents of this kit. All human products, including patient samples, should be considered potentially infectious. Handling and disposal should be in accordance with the procedures defined by an appropriate national biohazard safety guidelines or regulations.

4.4. Avoid contact with stop solution containing 5.0% H₂SO₄. It may cause skin irritation and burns.

4.5. Wear disposable latex gloves when handling specimens and reagents. Microbial contamination of reagents may give false results.

4.6. Do not use the kit beyond the expiration date.

4.7. All indicated volumes have to be performed according to the protocol. Optimal test results are only obtained when using calibrated pipettes and microplate readers.

4.8. Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics in areas where specimens or kit reagents are handled.

4.9. Chemicals and prepared or used reagents have to be treated as hazardous waste according to the national biohazard safety guidelines or regulations.

4.10. Do not mix reagents from different lots.

4.11. Replace caps on reagents immediately. Do not swap caps.

4.12. Do not pipette reagents by mouth.

4.13. Specimens must not contain any AZIDE compounds – they inhibit activity of peroxidase.

4.14. Material Safety Data Sheet for this product is available upon request directly from XEMA Co., Ltd.

4.15. The Material Safety Data Sheet fit the requirements of EU Guideline 91/155 EC.

5.1. Contents of the Kit

5. KIT COMPONENTS

Symbol	Description	Qty	Units	Colour code	Stability of opened/diluted components	
1	SORB MTP AFP EIA strips, 8x12 wells	polystyrene microwells coated with murine monoclonal to human AFP	1	pcs	until exp. date	
2	CAL 1-6 Calibrator set, 0.8 ml each, zero calibrator C1 - 6 ml. The set contains 6 calibrators: 0; 5; 15; 50; 150; 500 IU/ml	human alpha-fetoprotein diluted in tris buffered BSA solution, preservative - 0.01% Bronidox L, 0.01% 2-Methyl-4-isothiazolin-3-one-hydrochloride; also contains red dye	6	pcs	red (C1 - colourless)	2 months
3	CONTROL Control serum (0.8 ml)	dilution of preselected human serum, with high content of alpha-fetoprotein with BSA solution; preservative - 0.01% Bronidox L, 0.01% 2-Methyl-4-isothiazolin-3-one-hydrochloride, colourless	1	pcs	colourless	2 months
4	CONJ HRP Conjugate, 14 ml	aqueous solution of murine monoclonal to human AFP coupled with horseradish peroxidase diluted on phosphate buffered solution with casein from bovine milk and detergent (Tween-20), contains 0.1% phenol as preservative and red dye	1	pcs	red	until exp. date
5	SUBS TMB Substrate solution, 14 ml	ready-to-use single-component tetramethylbenzidine (TMB) solution	1	pcs	colourless	until exp. date
6	BUF WASH 26X Washing solution concentrate 26X, 22 ml	aqueous solution of sodium chloride and detergent (Tween 20), contains proClin300 as a preservative	1	pcs	colourless	Concentrate - until exp. date Diluted washing solution - 45 days at 2-8 °C or 15 days at RT
7	STOP Stop solution, 14 ml	5.0% vol/vol solution of sulphuric acid	1	pcs	colourless	until exp. date
8	N003 Plate sealing tape		2	pcs		N/A
9	K2251 Instruction AFP EIA		1	pcs		N/A
10	K225Q QC data sheet AFP EIA		1	pcs		N/A

5.2. Equipment and material required but not provided

- Distilled or deionized water;
- Automatic or semiautomatic multichannel micropipettes, 100–250 µl, is useful but not essential;
- Calibrated micropipettes with variable volume, range volume 25–250 µl;
- Dry thermostat for 37 °C ±0.1 °C;
- Calibrated microplate photometer with 450 nm wavelength and OD measuring range 0–3.0.

5.3. Storage and stability of the Kit

Store the whole kit at +2...+8 °C upon receipt until the expiration date.

After opening the pouch keep unused microtiter wells TIGHTLY SEALED BY ADHESIVE TAPE (INCLUDED) to minimize exposure to moisture.

6. SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE

This kit is intended for use with serum or plasma (ACD- or heparinized). Grossly hemolytic, lipemic, or turbid samples should be avoided.

Specimens may be stored for up to 48 hours at +2...+8 °C before testing. For a longer storage, the specimens should be frozen at -20 °C or lower. Repeated freezing/thawing should be avoided.

7. TEST PROCEDURE**7.1. Reagent Preparation**

- All reagents (including unsealed microstrips) should be allowed to reach room temperature (+18...+25 °C) before use.
- All reagents should be mixed by gentle inversion or vortexing prior to use. Avoid foam formation.
- It is recommended to spin down shortly the tubes with calibrators on low speed centrifuge.
- Prepare washing solution from the concentrate BUF WASH 26X by 26 dilutions in distilled water.

7.2. Procedural Note:

It is recommended that pipetting of all calibrators and samples should be completed within 3 minutes.

7.3. Assay flowchart

See the example of calibration graphic in Quality Control data sheet.

7.4. Alternative units:

1 IU/ml = 1.25 ng/ml

7.5. Assay procedure

1	Put the desired number of microstrips into the frame; allocate 14 wells for the calibrators CAL 1-6 and control samples CONTROL and two wells for each unknown sample. DO NOT REMOVE ADHESIVE SEALING TAPE FROM UNUSED STRIPS.
2	If suggested analyte concentration in the sample exceeds the highest calibrator, additionally dilute this sample accordingly, using zero calibrator. Use of other buffers or reagents for sample dilution may lead to incorrect measurement.
3	Dispense 100 µl of CONJ HRP into the wells.
4	Pipet 50 µl of calibrators CAL 1-6, control samples CONTROL and unknown samples into the wells. Cover the wells by plate adhesive tape (included into the kit).
5	Incubate 60 minutes at 37 °C.
6	Prepare washing solution by 26X dilution of washing solution concentrate (BUF WASH 26X) by distilled water. Wash the strips 5 times.
7	Dispense 100 µl of SUBS TMB into the wells.
8	Incubate 10-20 minutes at 18...+25 °C.
9	Dispense 100 µl of STOP into the wells.
10	Measure OD (optical density) at 450 nm.
11	Set photometer blank on first calibrator.
12	Apply point-by-point method for data reduction.

7.6. Handling notes

Calibrators and control sample(s) – only one freezing/thawing cycle is allowed.

8. QUALITY CONTROL

It is recommended to use control samples according to state and federal regulations. The use of control samples is advised to assure the day to day validity of results.

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

The test results are valid only if all controls are within the specified ranges and if all other test parameters are also within the given assay specifications.

9. CALCULATION OF RESULTS

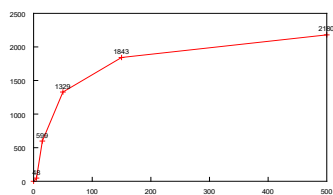
9.1. Calculate the mean absorbance values (OD450) for each pair of calibrators and samples.

9.2. Plot a calibration curve on graph paper: OD versus alpha-fetoprotein concentration.

9.3. Determine the corresponding concentration of alpha-fetoprotein in unknown samples from the calibration curve. Manual or computerized data reduction is applicable on this stage. Point-by-point or linear data reduction is recommended due to non-linear shape of curve.

9.4. Below is presented a typical example of a standard curve with the XEMA Co. Not for calculations!

Calibrators	Value	Absorbance Units (450 nm)
CAL 1	0 IU/ml	0.05
CAL 2	5 IU/ml	0.098
CAL 3	15 IU/ml	0.604
CAL 4	50 IU/ml	1.334
CAL 5	150 IU/ml	1.893
CAL 6	500 IU/ml	2.230



10. EXPECTED VALUES

Therapeutical consequences should not be based on results of IVD methods alone – all available clinical and laboratory findings should be used by a physician to elaborate therapeutically measures. Each laboratory should establish its own normal range for AFP. Based on data obtained by XEMA, the following normal range is recommended (see below). NOTE: the patients that have received murine monoclonal antibodies for radioimaging or immunotherapy develop high titered anti-mouse antibodies (HAMA). The presence of these antibodies may cause false results in the present assay. Sera from HAMA positive patients should be treated with depleting adsorbents before assaying.

Sex, age	Units, IU/ml		Units alternative, ng/ml	
	Lower limit	Upper limit	Lower limit	Upper limit
Healthy donors	-	10.0	-	12.5

Pregnancy, week	Median, IU/ml	SKO
14	21.7	0.43
15	28.3	0.47
16	30.0	0.51
17	36.3	0.49
18	43.8	0.52
19	53.3	0.50
20	60.0	0.55
21	63.3	0.57

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

11.1. Analytical specificity / Cross reactivity

Analyte	Cross-reactivity, % wt/wt
Albumin	<0.1
hCG	<0.1
Lactogen	<0.1

11.2. Analytical sensitivity

Sensitivity of the assay was assessed as being 0.9 IU/ml.

11.3. Linearity

Linearity was checked by assaying dilution series of 5 samples with different alpha-fetoprotein concentrations. Linearity percentages obtained ranged within 90 to 110%.

11.4. Recovery

Recovery was estimated by assaying 5 mixed samples with known alpha-fetoprotein concentrations. The recovery percentages ranged from 90 to 110%.

11.5. Hook-effect

No hook-effect has been noticed with samples up to 12000 IU/ml.

12. LITERATURE

1. Johnson, P.J, (2002) Tumor Markers in Primary Malignancies of the liver. In «Tumor Markers: Physiology, pathobiology, technology and clinical applications», ed. Dimandis E.P. AACC Press, Washington pp 269-276.
2. Stenman, U-H and Alfthan, H. (2002) Markers for Testicular Cancer. In «Tumor Markers: Physiology, pathobiology, technology and clinical applications», ed. Dimandis E.P. AACC Press, Washington, pp 351-359.
3. Christiansen, M. et al. Alpha-fetoprotein in plasma and serum of healthy adults: preanalytical, analytical and biological sources of variation and construction of age-dependent reference intervals. Scand J Invest 2001 61: 205-216.
4. Trape, J. et al. Reference change value for a-Fetoprotein and its application in early detection of hepatocellular carcinoma in patients with hepatic disease. Clin Chem 2003 49(7): 1209-1211.