

AFP kit

ELISA Testkit zur quantitativen Bestimmung
 von Alpha-Fetoprotein in humanem Blutserum

(Gebrauchsanweisung: Seite 4)

Enzyme immunoassay for quantitative determination
 of Alpha-Fetoprotein in human serum

(Instructions for use: page 31)

Manueller Test / Manual test

Abschnitt / Section 13

Automatisierter Test / Automated test

Abschnitt / Section 14

IVD

AFP Kit (Manueller Test)
 AFP kit (manual test)



96 Untersuchungen
 96 tests

22-02

REF

AFP Kit (Automatisierter
 Test für "Alisei")
 AFP kit (automated test
 for "Alisei")









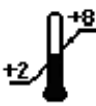



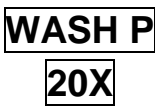













96 Untersuchungen
 96 tests

22-02 A

REF

1.KENNZEICHEN / SYMBOLS LEGEND

	In-vitro Diagnostika In vitro diagnostic medical device		EG-Konformitätserklärung EC Declaration of conformity
	Bestellnummer Catalogue number		Chargenbezeichnung Batch code
	Verwendbar bis Use by		Hersteller Manufacturer
	Herstellungsdatum Date of manufacture		Gebrauchsanweisung beachten Consult operating instructions
	Temperaturbegrenzung Temperature limitation		Biogefährdung Biological risks
	Beschichtete Mikrotiterplatte (96 Kavitäten) Coated microplate (96 wells)		Konjugat Conjugate
	Waschlösung, 20x konzentriert Wash solution, 20X concentrated		Substrat Substrate
	Kalibratoren Calibrators		Stopplösung Stop solution
	Kontrolle Control		Probenverdünnungspuffer Sample Diluent
	Ausreichend für <n> Prüfungen Contains sufficient for <n> tests		Optische Dichte Optical density
	Auflösen mit angegebenem Volumen Reconstitute with specified volume of liquid		Deionisiertes, destilliertes Wasser Deionized or distilled water
	Trial-Lösung, 5000x konzentriert Trial, 5000X concentrated		Reizend Irritant
		Warning	

2. VERWENDUNGSZWECK

Der **AFP-Testkit** wird für die **quantitative** Bestimmung von **Alpha-Fetoprotein (AFP)** in **humanem Blutserum** verwendet.

Der Testkit ist in zwei Variationen erhältlich:

REF 22-02 Für den manuellen Gebrauch

REF 22-02 A Für den Gebrauch mit ELISA-Automat "Alisei",
hergestellt durch die Firma Next Level S.r.l.

Die Gebrauchsanweisungen befinden sich:

Abschnitt 13 Manueller Test

Abschnitt 14 Automatisierter Test "Alisei"

Anmerkung 1: *Die Konzentrationswerte der Kalibratoren können bei manuellem und automatisiertem Testkit variieren.*

Anmerkung 2: *Wir garantieren verlässliche Testergebnisse bei folgender Anwendung der Testkits:*

REF 22-02 A nur für ELISA-Automat "Alisei"

REF 22-02 nur für den manuellen Gebrauch.

Bei Verwendung einer nicht vordefinierten Methode ist der Anwender dafür verantwortlich, sicherzustellen, dass diese für ELISA-Kits angemessen getestet wurde.

Alpha-Fetoprotein (AFP) ist ein Glykoprotein mit einer Molekularmasse von ca. 70 000 Da.

Während der Embryonalentwicklung wird AFP hauptsächlich im Dottersack, der embryonalen Leber und in kleineren Mengen im Magen-Darm-Trakt gebildet. AFP ist das Haupt-Serumprotein des frühen Fötus. Zwischen der 12. bis 15. Schwangerschaftswoche erreicht AFP die maximale Konzentration im Blutserum des Fötus (bis 240 000 IU/ml).

Danach fällt die AFP-Konzentration bis zum Ende des zweiten Lebensjahres des Kindes wieder ab und erreicht den Normwert (0-16 IU/ml), der während der übrigen Lebensdauer im Normalfall konstant bleibt.

AFP wird über die Nieren des Fötus ins Fruchtwasser ausgeschieden und gelangt dabei über die Plazenta und die Nabelschnur in den Blutkreislauf der Mutter. Der AFP-Wert steigt im Blut schwangerer Frauen ständig und erreicht sein Maximum (bis 400 IU/ml) zur Mitte des dritten Schwangerschaftsdrittels.

Die Messung der AFP-Konzentration im Blutserum einer Schwangeren ist ein wichtiges Verfahren zur pränatalen Diagnostik einiger angeborener Krankheiten. In der Geburtshilfe wird dieses Verfahren außerdem oft bei der Diagnose einer Mehrlingsschwangerschaft, eines intrauterinen Fruchttodes und bei Gefahr einer Fehlgeburt verwendet.

Die Ermittlung des AFP-Wertes kann aber auch bei der Diagnose und dem Monitoring verschiedener Karzinomarten hilfreich sein. Beispielsweise stehen sehr oft anhaltende und hohe AFP-Werte (800-80000 IU/ml und höher) in Zusammenhang mit primären Hepatomen oder Hoden-Teratomen und Eierstock-Tumoren.

3. TESTPRINZIP

Im **AFP Testkit** ist ein "Sandwich"-Typ des Festphasen-Enzymimmunoassay, basierend auf zwei monoklonalen Antikörpern, die spezifisch an unterschiedliche Epitope des AFP-Moleküls binden. Einer dieser Antikörper ist mit der Meerrettich Peroxidase (HRP) konjugiert, der zweite ist an die Innenfläche der Kavität gebunden.

Die AFP-Moleküle der Blutserumprobe binden sowohl den immobilisierten Antikörper als auch das Anti-AFP-Peroxidase-Konjugat (Abb. 1).

Beim Waschen der Kavitäten mit der Waschlösung werden alle ungebundenen Komponenten entfernt. Die Menge des gebundenen Konjugates ist direkt proportional zur AFP-Konzentration der zu testenden Probe.

Während der Inkubation mit der TMB-Lösung entwickelt sich eine Farbreaktion. Die Intensität der Färbung korreliert mit der AFP-Menge der Probe oder des Kalibrators. Die AFP-Konzentration in der Patientenprobe wird mit einer Standardkurve, die mit dem Testkit erarbeitet wird, ausgelesen.

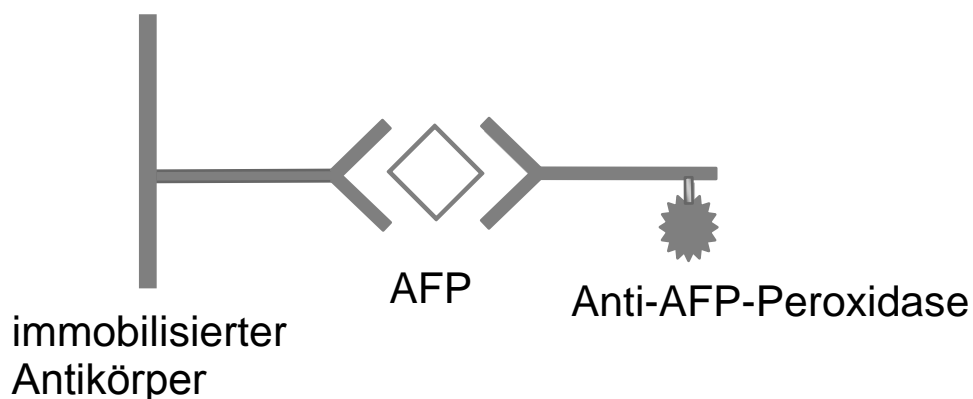


Abb. 1 Testschema

4. LAGERUNG UND STABILITÄT DES TESTKITS

Das Verfallsdatum des kompletten Testkits ist auf dem Außenetikett angegeben; das Verfallsdatum jeder einzelnen Testkomponente ist auf dem jeweiligen Etikett angegeben.

Der **AFP Testkit** ist nach dem Empfang und bis zur Verwendung bei +2...+8 °C in der Originalverpackung des Herstellers zu lagern.

Eine Lagerung bei Temperaturen bis +25 °C ist maximal für 5 Tage zulässig.

Die Haltbarkeitsdauer des Kits beträgt 18 Monate.

Nach dem Öffnen ist der Testkit bei einer Lagerung von +2...+8 °C bis zu 12 Monate haltbar. Wenn der Testkit in mehreren getrennten Experimenten verwendet wird, ist der Inhalt nach dem Öffnen wie folgt zu lagern aber die Komponenten dürfen nie länger als bis zu ihrem Ablaufdatum verwendet werden:

- Die ungenutzten Mikrotiterplatten-Streifen: in einem fest verschlossenen Druckverschlussbeutel: bei +2...+8 °C bis zum Verfallsdatum;
- Fläschchen mit Probenverdünnungspuffer, Konjugat, Kalibratoren und Kontrolle (gebrauchsfertig): bei +2...+8 °C für 12 Monate; Fläschchen mit Kalibratoren und Kontrolle (gelöst aus Lyophilisat): bei +2...+8 °C für maximal 1 Monat nach dem Öffnen;
- Fläschchen mit Substrat-Lösung: bei einer Temperatur von +2...+8 °C bis zum Verfallsdatum, **lichtgeschützt**;
- Fläschchen der konzentrierten Trial-Lösung, des Probenverdünnungspuffers, des Waschlösungskonzentrats und der Stopplösung: bei +2...+8 °C bis zum Verfallsdatum;
- Gebrauchsfertige Waschlösung: in einem dicht verschlossenen Behälter bei Raumtemperatur (+18...+25 °C) für maximal 5 Tage oder bei +2...+8 °C für maximal 4 Wochen;
- Gebrauchsfertige Trial-Lösung: in einem dicht verschlossenen Behälter bei Raumtemperatur (+18...+25 °C) für maximal 5 Tage.

Beschädigte Testkits

Im Falle einer schweren Beschädigung des Testkits oder der Komponenten muss Astra Biotech GmbH schriftlich innerhalb einer Woche nach dem Empfang der Ware informiert werden. Der Gebrauch stark beschädigter Komponenten für einen Testlauf wird nicht empfohlen.

5. PROBENGEWINNUNG UND -LAGERUNG

Blut durch Venenpunktion entnehmen. Nach der Gerinnung wird das Serum durch Zentrifugation abgetrennt.

Es ist nicht zulässig, für eine Analyse Blutplasma, hämolysiertes (hell rot) oder lipämisches (milchig) Serum sowie Natriumazid-haltige Serumproben zu benutzen.

Die Proben sind bei der Temperatur von + 2...+8 °C nicht länger als 2 Tage zu lagern. Bei Notwendigkeit einer dauerhaften Aufbewahrung wird empfohlen, die Probe zu aliquotieren und bei Temperatur von ≤ -20 °C gefroren zu lagern. Ein wiederholtes Einfrieren ist zu vermeiden.

6. REFERENZWERTE

Mit Hilfe des **AFP Testkits** wurden Blutserumproben von 200 offenbar gesunden Probanden (beider Geschlechter) untersucht. Der ermittelte AFP-Konzentrationsbereich betrug 0- 14,4 IU/ml. Der angegebene Bereich dient jedoch nur als eine Orientierungshilfe.

22 058 Blutserumproben schwangerer Frauen wurden von 2009 bis 2010 mit dem **AFP Kit** untersucht:

Schwangerschaft nach FDLMP, Schwangerschafts- woche	AFP			
	Median, ng/ml	Toleranz- grenzen, ng/ml	Median, IU/ml	Toleranz- grenzen, IU/ml
14	35	17-59	28	13-47
15	39	22-87	31	17-70
16	44	24-77	35	19-62
17	48	28-86	38	22-69
18	56	31-76	45	25-60
19	60	35-115	48	28-92
20	68	37-130	54	29-104

FDLMP (First Day of the Last Menstrual Period) = der erste Tag der letzten Menstruationsperiode.

Toleranzgrenze = Grenze, in welcher mit 95% Wahrscheinlichkeit alle physiologischen Werte einer Biomarkers liegen.

Es wird ausdrücklich empfohlen, dass jedes Labor einen eigenen Referenzbereich für die AFP–Normkonzentrationen bestimmt.

7. QUALITÄTSKONTROLLE

Es wird empfohlen, Kontrollproben entsprechend nationaler und regionaler Vorschriften zu benutzen. Der Einsatz der Kontrollproben sichert die Tag-zu-Tag Gültigkeit der Ergebnisse.

8. REAGENZIVORBEREITUNG

Vor dem Gebrauch müssen alle Reagenzien auf Raumtemperatur (+18...+25 °C) gebracht und gründlich gemischt werden.

MP Mikrotiterplatte

Die Verpackung der **Mikrotiterplatte** vor der Öffnung mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur (+18...+25 °C) lagern und anschließend wie folgt vorbereiten:

- Notwendige Anzahl der Streifen in den Rahmen einsetzen. Die unbenutzten Streifen in einen Druckverschlussbeutel legen und gut verschließen.

CAL CONTROL Kalibratoren und Kontrolle

Flüssige Kalibratoren und die flüssige Kontrolle sind gebrauchsfertig. Die lyophilisierten Kalibratoren und die Kontrolle wie folgt vorbereiten:

- Durch leichtes Klopfen auf den Deckel wird der Feststoff vom Flaschenrand gelöst.
- Die Fläschchen werden vorsichtig geöffnet und die Deckelkappen umgedreht auf eine trockene und saubere Oberfläche gelegt.
- 0,5 ml destilliertes oder deionisiertes Wasser wird jeweils in die lyophilisierten Kalibratoren oder Kontrolle pipettiert, diese wieder mit jeweiligem Deckel verschlossen und 10 Minuten bei Raumtemperatur ohne Mischen inkubiert.
- Danach unter Vermeidung einer Schaumbildung sorgsam rühren bis der Feststoff komplett gelöst ist. Weitere 10 Minuten bei Raumtemperatur (+18...+25°C) unter periodischem Schütteln inkubieren. Es darf kein Feststoff im

Deckel oder an den Wänden der Fläschchen zurückbleiben.

WASH P Waschlösung

Zubereitung der benötigten Menge der Waschlösung durch 20fache Verdünnung des Konzentrates mit destilliertem Wasser:

5 ml **WASH P** **20X** + 95 ml Wasser.

Sorgfältig mischen, Schaumbildung vermeiden.

SUB **Substrat** vor direktem Licht schützen.

9. PROBENVORBEREITUNG

Proben auf Raumtemperatur bringen und sorgfältig mischen, um Homogenität zu erreichen.

Sollte die erwartete AFP-Konzentration in der Probe größer als im Kalibrator 5 sein, sollte die Probe (sowohl beim manuellen Gebrauch als auch beim automatisierten Test, entsprechend jeweiliger Gebrauchsanweisung) zusätzlich verdünnt werden:

20fach (Probe 1) oder **400fach** (Probe 2):

Probe 1 (20fache Verdünnung):

380 µl Probenverdünnungspuffers **DIL** +20 µl Probe

Probe 2 (400 fache Verdünnung):

380 µl Probenverdünnungspuffers **DIL** +20 µl Probe1

Vortexen und gut mischen.

10. TESTCHARAKTERISTIKA

10.1 Eichung:

Der **AFP Testkit** wurde gemäß dem Ersten Internationalen Standard der WHO 72/225 kalibriert.

10.2 Spezifität:

Es konnte keine Kreuzreaktion zwischen den beiden monoklonalen Anti-AFP-Antikörpern des Testkit mit Serumalbumin, Choriongonadotropin, humanen Plazenta-Laktogen und humanen Immunglobulin festgestellt werden.

10.3 Analytische Sensitivität:

Die analytische Sensitivität des **AFP Testkits**, die minimale Konzentration, die sich vom Kalibrator 0 sicher unterscheiden lässt, beträgt 0,9 IU/ml. Zur Ermittlung wurde der Mittelwert einer 10fach-Bestimmung der Optischen Dichte des Kalibrators 0 unter Berücksichtigung der Standardabweichung (+ 2 SD) gebildet.

10.4 Messeinheiten:

Die Konzentrationen der Kalibratoren im **AFP Testkit** sind in IU/ml angegeben. Zur Umrechnung in ng/ml, wird die Konzentration (IU/ml) mit 1,21 multipliziert.

10.5 Messbereich:

Der **AFP Testkit** (manuelles Testkit und Alisei Testkit) ist validiert für die Detektion einer AFP-Konzentration (unverdünnt) innerhalb eines Bereiches von 0,9- 300 IU/ml.

10.6 High-Dose-Hook-Effekt:

Der High-Dose-Hook-Effekt wurde bis zu einer AFP-Konzentration von 12500 IU/ml nicht nachgewiesen.

10.7 Intra-assay und Inter-assay Varianz:

Um einen **intra-assay Variationskoeffizienten (VK)** festzulegen, wurden 8 Blutserumproben, jeweils in 9fach-Bestimmung untersucht. Die Testresultate sind in der Tabelle dargestellt:

Manuelles Testkit

Probe	Mittlere AFP-Konzentration, IU/ml	Intra-assay VK	
		SD	VK, %
1	4,8	0,47	9,8
2	24,3	1,85	7,6
3	46,8	2,46	5,2
4	49,2	2,19	4,4
5	61,3	4,12	6,7
6	72,5	3,14	4,3
7	86,3	6,75	7,8
8	167,6	4,99	2,9

Alisei Testkit

Probe	Mittlere AFP-Konzentration, IU/ml	Intra-assay VK	
		SD	VK, %
1	5,1	0,21	4,1
2	10,7	0,83	7,8
3	24,5	1,67	6,8
4	57,1	3,26	5,7
5	72,2	2,59	3,6
6	93,4	3,21	3,4
7	125,0	6,40	5,1
8	189,9	9,94	5,2

Um einen **inter-assay Variationskoeffizient** festzulegen, wurden 8 Blutserumproben dreimal mit einem Intervall von 1 Woche von verschiedenen Anwendern untersucht. Jede Probe wurde 9 Mal gemessen. Die Testergebnisse sind in der Tabelle dargestellt:

Manuelles Testkit

Probe	Mittlere AFP-Konzentration, IU/ml			Inter-assay VK	
	1 Test	2 Test	3 Test	SD	VK,%
1	5,0	4,3	5,2	0,46	9,6
2	26,2	22,0	24,4	2,09	8,6
3	48,0	43,8	48,6	2,61	5,6
4	49,3	46,9	51,3	2,22	4,5
5	63,5	56,5	63,7	4,1	6,7
6	72,7	69,3	75,0	2,89	4,0
7	89,4	79,3	90,4	6,14	7,1
8	166,2	167,0	172,2	3,28	1,9

Alisei Testkit

Probe	Mittlere AFP-Konzentration, IU/ml			Inter-assay VK	
	1 Test	2 Test	1 Test	SD	VK,%
1	5,2	4,7	5,4	0,36	7,1
2	11,5	12,0	10,3	0,87	7,7
3	25,7	23,8	26,9	1,56	6,1
4	61,1	54,0	55,7	3,70	6,5
5	78,0	69,9	72,1	4,19	5,7
6	100,0	93,1	89,9	5,16	5,5
7	119,9	125,9	130,3	5,22	4,2
8	201,6	194,3	188,5	6,56	3,4

10.8 Parallelen in der Verdünnung der Serumproben:

Serielle Verdünnungen von drei menschlichen Serumproben mit bekannter AFP-Konzentration wurden mit dem **AFP Kit** mit folgenden Ergebnissen getestet:

Manuelles Testkit

Probe	Verdünnung mit Probenverdünnungspuffer	Gemessene Konzentration, IU/ml	Erwartete Konzentration, IU/ml	Gemessene / Erwartete Konzentration Ratio, %
1	Unverdünnt	273,2		
	1:2	133,4	136,6	98
	1:4	70,2	68,3	103
	1:8	36,7	34,15	107
	1:16	17,0	17,075	100
	1:32	8,90	8,54	104
2	Unverdünnt	179,4		
	1:2	83,9	89,7	93,5
	1:4	44,5	44,9	99,2
	1:8	21,7	22,4	96,7
	1:16	9,80	11,2	87,3
	1:32	5,41	5,6	96,7
3	Unverdünnt	288,0		
	1:2	135,1	144,0	93,8
	1:4	70,7	72,0	98,2
	1:8	38,6	36,0	107
	1:16	20,2	18,0	112

Alisei Testkit


Probe	Verdünnung mit Probenverdünnungspuffer	Gemessene Konzentration, IU/ml	Erwartete Konzentration, IU/ml	Gemessene / Erwartete Konzentration Ratio, %
1	Unverdünnt	270,5		
	1:2	140,9	136,6	103
	1:4	72,7	68,3	106
	1:8	32,1	34,15	94
	1:16	18,6	17,075	109
	1:32	7,8	8,54	91
2	Unverdünnt	177,1		
	1:2	81,6	89,7	91
	1:4	44,9	44,9	100
	1:8	22,9	22,4	102
	1:16	11,8	11,2	105
	1:32	6,1	5,6	109
3	Unverdünnt	284,6		
	1:2	148,2	144	103
	1:4	76,9	72	107
	1:8	35,4	36	98
	1:16	19,6	18	109

11. GRENZEN DER METHODE




Eine klinische Diagnose sollte nicht allein mit Hilfe der Ergebnisse einer einzelnen diagnostischen Methode erhoben werden. Zur Diagnosestellung sollten vom Arzt alle verfügbaren klinischen und Laborbefunde berücksichtigt werden.

12. VORSICHTSMAßNAHMEN

- **Der Testkit ist ausschließlich zum in vitro–Gebrauch bestimmt.** Um zuverlässige Testergebnisse zu erhalten, ist die Arbeitsanleitung strikt einzuhalten. Diese Gebrauchsanweisung ist nur für den vorliegenden Testkit mit dem aufgeführten Inhalt gültig. Jeglicher Austausch der Kitkomponenten ist durch die CE-Regularien nicht gestattet.
- Der Testkit oder einzelne Kit-Komponenten dürfen nach Ablauf des auf der Verpackung angegebenen Verfallsdatums nicht mehr verwendet werden. Die vorn angegebene Haltbarkeit der verdünnten Komponenten muss ebenfalls berücksichtigt werden.
- Das Mischen oder die gleichzeitige Verwendung von Reagenzien verschiedener Testchargen, ausgenommen TMB-, Stopp- und Waschlösung, ist nicht gestattet.
- TMB-, Stopp- und Waschlösung anderer Hersteller nicht verwenden.
- Nur “P”-gekennzeichnete Astra Biotech-Waschlösung benutzen.
- Die Stopplösung ist eine 1 N Salzsäure (HCl–Lösung). Vermeiden Sie Haut- und Schleimhautkontakt. Bei Haut- oder Schleimhautkontakt den betroffenen Bereich mit fließendem Wasser spülen und gegebenenfalls einen Arzt aufsuchen.
- Bitte folgende bekannte Verfahrensregeln beachten:
 - Reagenzien unmittelbar nach dem Waschen in die Kavitäten pipettieren;

- Kontamination der Lösungen vermeiden;
- Bei teilweiser Nutzung des Testkits nur benötigtes Volumen in ein gesonderten Behälter geben, nicht benutzte Reagenzien NICHT zurück in die ursprünglichen Original-Fläschchen füllen;
- Direkte Sonneneinstrahlung während der Inkubation vermeiden;
- Reagenzien in gleicher Reihenfolge pipettieren, um Unterschiede in den Reaktionszeiten zwischen den Kavitäten zu vermeiden. Die gesamte Pipettierzeit für Kalibratoren, Kontrolle und Proben darf 15 Minuten nicht überschreiten;
- Die Temperatur der Inkubation aller immunologischer Reaktionen muss bei +37 °C liegen;
- Den Boden der Kavitäten nicht berühren;
- Kalibratoren müssen bei jedem Testlauf gemessen werden. Es wird außerdem empfohlen, die AFP-Konzentration der Kontrolle zu bestimmen.
- Entfernen Sie die Klebeschutzfolie vorsichtig um eine Kontamination zu vermeiden und verwenden Sie dieselbe Klebeschutzfolie nicht erneut.
- Die TMB-Lösung sollte farblos sein. Eine helle Färbung der Lösung ist zulässig. Vermeiden Sie direkte Sonneneinstrahlung des Substrates.
-  Alle Reagenzien dieses Testkits, die humanen Ursprungs sind, ergaben bei der Prüfung auf HBsAg (Hepatitis B surface

Antigen) bzw. Antikörper gegen HIV (Human Immunodeficiency Virus) und HCV (Hepatitis C Virus) ein negatives Ergebnis. Dennoch kann das Vorhandensein infektiöser Erreger durch keinen Test mit absoluter Sicherheit ausgeschlossen werden. Die Reagenzien und Patienten Proben sollten deshalb immer wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.

-  Nach dem Gebrauch werden Streifen, Kalibratoren, Kontrollen, Proben und alle Verbrauchsmittel (Reaktionsgefäße, Fläschchen, Handschuhe, Pipettenspitzen), die mit den Proben während der Bearbeitung oder Lagerung in Kontakt kamen, separat gesammelt und autoklaviert. Pipettenspitzen können anstelle des Autoklavierens durch Inkubation in desinfizierenden Substanzen sterilisiert werden. Nach der Sterilisation können alle Komponenten und Einmal-Artikel als nicht gefährlicher Müll behandelt werden. Andere Kitbestandteile werden auf konventionelle Weise entsorgt.
-  Während der manuellen Waschprozedur Überstände nicht in den Abfluss geben, sondern in einen Behälter mit Desinfektionsmittel.
-  Beim Umgang mit potentiell infektiösem Material müssen die folgenden Vorsichtsmaßnahmen beachtet werden:
 - Im Laborraum nicht rauchen, nicht trinken und nicht essen;
 - Schutzhandschuhe verwenden;
 - Nie mit dem Mund pipettieren;

- Verspritzen von Flüssigkeiten vermeiden. Sollte doch Flüssigkeit vergossen worden sein, diese sofort aufnehmen und die verschmutzte Oberfläche desinfizieren.
- Bei der Verwendung des Testkits müssen die Anforderungen der guten Laborpraxis (GLP) inklusive aller Richtlinien beachtet werden.



Der Testkit beinhaltet Reizstoffe (**CONJ**, **DIL**, **CAL**, **CONTROL**). Daher sollten folgende Vorsichtsmaßnahmen beachtet werden:

- P261 - Einatmen von Staub / Rauch / Gas / Nebel / Dampf / Aerosol vermeiden;
- P272 - Kontaminierte Arbeitskleidung nicht außerhalb des Arbeitsplatzes tragen;
- P280 - Schutzhandschuhe / Schutzkleidung / Augenschutz / Gesichtsschutz tragen;
- P302+P352 - Bei Berührung mit der Haut: Mit viel Wasser und Seife waschen;
- P333+P313 - Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen;
- P363 - Kontaminierte Kleidung vor erneutem Tragen waschen;
- P501 - Inhalt/Behälter den nationalen Vorschriften entsprechend der Entsorgung zuführen.

Die Vorsichtsmaßnahmen entsprechen der Verordnung EG Nr. 1272/2008.

13. MANUELLER TEST (REF 22-02)

13.1.Packungsinhalt

MP	Mikroplatte: Zwölf Streifen mit acht Kavitäten (insgesamt 96 Kavitäten), beschichtet mit monoklonalen Anti-AFP-Antikörpern	1 Platte
CONJ	Konjugat: Lösung aus monoklonalen Anti-AFP-Antikörpern konjugiert mit Meerrettich Peroxidase (HRP)	14 ml, gebrauchsfertig
0-5 CAL	AFP Kalibratoren: Protein-Puffer oder Lyophilisate mit definierter AFP - Konzentration- 0; 10; 50; 100; 200; 300 IU/ml (ungefähre Werte - verwenden Sie die Daten nicht für die Auswertung des Assays). Die Konzentrationen der Kalibratoren können sich zwischen Protokoll 1 und 2 unterscheiden. Die exakten Lot spezifischen AFP-Konzentrationen sind im Quality Control Sheet angegeben.	6 Fläschchen mit je 0,5 ml, gebrauchsfertig oder lyophilisiert
CONTROL	AFP Kontrolle: Protein-Puffer oder Lyophilisate mit definierter AFP-Konzentration. Der Konzentrationsbereich kann sich zwischen Protokoll 1 und 2 unterscheiden. Der Lot spezifische AFP-Konzentrationsbereich ist im Quality Control Sheet angegeben.	0,5 ml, gebrauchsfertig oder lyophilisiert
SUB	Substrat (TMB-Lösung): 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin-Lösung in Citrat-Puffer, mit Wasserstoffperoxid	14 ml, gebrauchsfertig
WASH P 20X	Waschlösung P, 20x konzentriert: Tensid in Salzlösung, ausreichend für die Vorbereitung von 560 ml Lösung.	2x14 ml, konzentriert
STOP	Stopplösung: 1 N HCl - Lösung	14 ml, gebrauchsfertig

DIL	Probenverdünnungspuffer	10 ml, gebrauchsfertig
	Klebeschutzfolie	2x1 Folie (optional)

13.2 Erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien und Equipment

- kalibrierte, verstellbare Einkanal-Pipetten mit Einweg-Pipettenspitzen;
- kalibrierte, verstellbare 8-Kanal-Pipette mit Einweg-Pipettenspitzen;
- Mikrotiterplatten-Inkubator (+37 °C) oder Mikrotiterplatten/Inkubator-Schüttler (+37 °C, 500-800 rpm);
- Equipment zum manuellen oder automatischen Waschen
- Vortexer;
- Spektralphotometer für Mikrotiterplatten (450 nm);
- Messzylinder, Becherglas;
- Destilliertes oder entionisiertes Wasser;
- Labor-Handschuhe;
- separate Behälter zum Pipettieren mit der 8-Kanal-Pipette;
- Desinfektionsmittel;
- Absorbierendes Material (zum manuellen Waschen).

13.3 TESTABLAUF

Der **AFP Testkit** ist für 96 Untersuchungen bestimmt. Vorbehaltlich einer gleichzeitigen Anwendung aller Streifen reicht ein Testkit für eine quantitative Doppelbestimmung von 40 Serumproben, 6 Kalibratoren, 1 Kontrolle und für die Bestimmung des Leerwertes (Blank = OD der TMB-Lösung).

13.3.1 Assay-Durchführung

Anmerkung: Bitte überprüfen Sie auf dem mit dem Kit gelieferten Qualitätskontrollblatt, für welches Assay-Protokoll Ihr Kit validiert wurde. Wenn Ihr Kit für das Assay Protocol 1 validiert wurde, folgen Sie bitte dem unten beschriebenen Assay Protocol 1. Wenn Ihr Kit zusätzlich für das Assay Protocol 2 validiert wurde, beachten Sie bitte die Ergänzung 1 zu der mit dem Kit gelieferten Gebrauchsanweisung.

Assay-Protokoll 1

(siehe auch Assay-Schema für Assay-Protokoll 1, Abschnitt 13.5)

Anmerkung: Dazugehörige Konzentrationen der Kalibratoren und Kontrollbereiche für das Assay-Protokoll 1 sind im Quality Control Sheet enthalten.

- A. **100 µl** Konjugat **CONJ** in alle Kavitäten **außer** Kavitäten **A1-A2** (Blank) **pipettieren**.
- B. **20 µl** der Kalibratoren **CAL**, Kontrolle **CONTROL** und die vorbereiteten **Serumproben in Zweifachbestimmung** in entsprechende Kavitäten pipettieren.
Kavitäten A1-A2 bleiben frei (Blank).

Anmerkung: Die Gesamtzeit der Pipettiertschritte darf 15 Minuten nicht überschreiten, da es somit zu einer erheblichen Variation der Inkubationszeit zwischen den Proben kommt und das Testergebnis somit unzuverlässig sein kann.

Anmerkung: Wenn eine Klebeschutzfolie verwendet wird, nutzen sie diese jetzt um die Mikrotiterplatten zu verschließen.

- C. **60 Minuten** bei **+37 °C** unter Schütteln (**500 bis 800 rpm**) inkubieren.

Anmerkung: *Wenn eine Klebeschutzfolie verwendet wird, entfernen sie diese nun vorsichtig von der Mikrotiterplatte.*

- D. 5x, wie unten beschrieben, waschen.
- E. **100 µl Substrat** **SUB** in jede Kavität (auch Blank) pipettieren.
- F. Streifen **entweder bei Raumtemperatur (+18...+25 °C) im Dunkeln** für **15–30 Minuten** (abhängig von der Farbintensität) oder für **10 Minuten bei +37 °C** unter Schütteln (**500-800 rpm**) inkubieren.
- G. **100 µl Stopplösung** **STOP** in **alle Kavitäten** (auch Blank) (in selber Reihenfolge und Geschwindigkeit wie das Substrat) pipettieren und für **1-2 Minuten** bei **Raumtemperatur schütteln**.
- H. Messen der **Optischen Dichte** bei **450 nm innerhalb von 20 Minuten**.

13.3.2 Waschen

Es wird empfohlen, ein automatisches Mikroplatten-Waschgerät mit 5 Waschzyklen und einem jeweiligen Waschvolumen von 300 µl pro Kavität und Zyklus zu benutzen.

Die Waschprozedur kann ebenso manuell durchgeführt werden:

- Überstand aus den Kavitäten in einen Behälter mit Desinfektionsmittel verwerfen;
- 300 µl der vorbereiteten Waschlösung (Abschnitt 8) in jede Kavität geben, die Platte für 5 bis 10 Sekunden sorgfältig schütteln und den Überstand verwerfen. 5 Mal wiederholen;
- Ausklopfen der Kavitäten auf einer saugfähigen Unterlage bis alle Flüssigkeit entfernt ist.

13.4 Datenverarbeitung

Bei Benutzung eines Photometers, welcher keine Nullstellung erlaubt, wird der OD-Wert der Kavitäten A1-A2 (=Blank) von allen anderen OD-Werten vor weiterer Kalkulation subtrahiert. *Beispiel:*

OD (Kalibrator 5) gemessen = 2,28 und OD (Blank) = 0,06;

OD (Kalibrator 5) berechnet = $2,28 - 0,06 = \underline{2,22}$.

13.4.1 Datenverlässlichkeit (OD gemessen bei 450 nm)

Die Daten sollten folgende Kriterien erfüllen:

- Mittelwert der OD des Blank (der Kavität A1-A2) $\leq 0,100$
- Mittelwert der OD des Kalibrator 5 $\geq 1,0$ (nach Blank Subtraktion)
- Konzentration der Kontrolle muss innerhalb des Bereiches liegen, welcher auf dem Quality Control Sheet angegebenen ist

Sollten die gemessenen Daten die Bedingungen nicht erfüllen, werden die Resultate als unzulässig betrachtet und der Test sollte wiederholt werden.

13.4.2 Quantitative Bestimmung

Eine spezialisierte Software zur quantitativen Bestimmung wird empfohlen. Die Mittelwerte der OD der Kalibratoren werden gegen deren jeweilige AFP-Konzentration mittels **4PL oder 5PL Näherung** (Abb. 2 Typische Standardkurve) aufgetragen. Die AFP-Konzentration der Probe wird mit der Standardkurve ermittelt.

Eine Extrapolation der Standardkurve für AFP-Konzentrationswerte, die die Konzentration in Kalibrator 5 überschreiten (etwa 300 IU/ml), ist nicht zulässig. In diesem Fall sollte die Probe 50- oder 2000fach mit Probenverdünnungspuffer verdünnt und erneut getestet werden. Die gemessene Konzentration der vorverdünnten Probe muss mit dem jeweiligen Verdünnungsfaktor multipliziert werden.

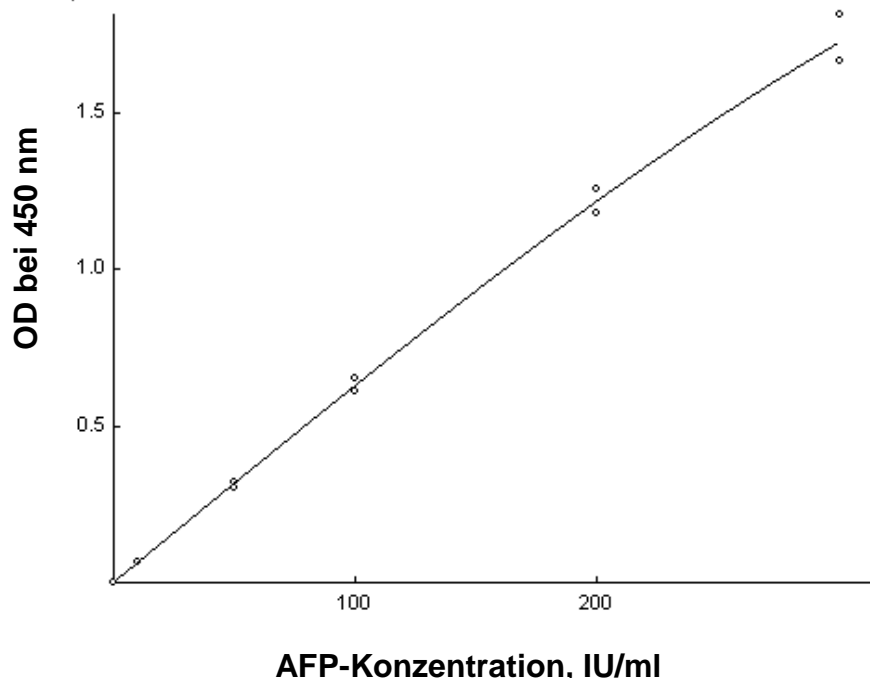


Abb. 2. Beispiel einer typischen Standardkurve

Beispielstandardkurve! Nicht zur Auswertung benutzen

13.5 Assay-Schema zum Assay-Protokoll 1

Kavität \ Reagenzien	«Blank»	CAL CONTROL	Proben
CONJ	–	100 µl	100 µl
CAL CONTROL	–	20 µl	–
Proben	–	–	20 µl
Inkubation No. 1	60 Min, +37 °C, 500–800 rpm		
WASH P (verdünnt)	5 x 300 µl		
SUB	100 µl	100 µl	100 µl
Inkubation No. 2	15–30 Min +18...+25 °C im Dunkeln		
	10 Min, +37 °C, 500–800 rpm		
STOP	100 µl	100 µl	100 µl
Rühren	1–2 Min, +18...+25 °C		
OD-Messung	450 nm		
Berechnung	Spezielle Software		

14. AUTOMATISIERTER TEST (REF 22-02 A)

14.1 Packungsinhalt

MP	Mikrotiterplatte: Zwölf Streifen mit acht Kavitäten (insgesamt 96 Kavitäten), beschichtet mit monoklonalen Anti- AFP-Antikörpern.	1 Platte
CONJ	Konjugat: Lösung aus Anti-AFP-Antikörpern konjugiert mit Meerrettich Peroxidase (HRP).	14 ml, gebrauchsfertig
0-5 CAL	AFP Kalibratoren: Protein-Puffer oder Lyophilisate mit definierter AFP-Konzentration – 0; 10; 50; 100; 200; 300 IU/ml (ungefähre Werte- bitte nicht für die Auswertung von realen Testdaten verwenden). Für Lot spezifische AFP-Konzentrationen siehe Werte im Quality Control Sheet.	8 Fläschchen, je 0,5ml CAL 1, 4- 2 × 0,5 ml; CAL 0, 2, 3, 5- 1 × 0,5 ml; gebrauchsfertig oder lyophilisiert
CONTROL	AFP Kontrolle: Protein-Puffer oder Lyophilisat mit definierter AFP-Konzentration. Der AFP-Konzentrationsbereich ist im Quality Control Sheet angegeben.	2 x 0,5 ml gebrauchsfertig oder lyophilisiert
WASH P 20X	Waschlösung P, 20x konzentriert: Tensid in Salzlösung, ausreichend für die Vorbereitung von 1000 ml Lösung.	50 ml, konzentriert
SUB	Substrat (TMB-Lösung): 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin in Citrat-Puffer mit Wasserstoffperoxid.	14 ml, gebrauchsfertig
STOP	Stopplösung: 1 N HCl-Lösung	19 ml, gebrauchsfertig
TRIAL 5000X	Trial-Lösung, 5000x konzentriert: Reinigungslösung	Ist separat zu bestellen
DIL	Probenverdünnungspuffer: Protein-Puffer	2x 10 ml, gebrauchsfertig

Anmerkung: *Extra Fläschchen der **CAL** 1 und 4 sowie **CONTROL** werden zur Rekalibrierung der Referenz-Standardkurve bereitgestellt. Genauere Informationen sind in der Gebrauchsanleitung des ELISA-Automaten "Alisei" zu finden.*

14.2 Erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien und Equipment

- ELISA-Automat "Alisei";
- Polypropylen Röhren 12x 75, Volumen: 5,5 ml;
- **TRIAL 5000X** Trial-Lösung, 5000x konzentriert;
- Deionisiertes oder destilliertes Wasser,
- Laborhandschuhe.

14.3 Testverfahren

Der **AFP Testkit** ist für 96 Untersuchungen bestimmt. Vorbehaltlich einer gleichzeitigen Anwendung aller Streifen reicht ein Testkit für eine Einzelbestimmung von 88 Serumproben, 6 Kalibratoren, 1 Kontrolle und für die Bestimmung des Blank (=OD der TMB-Lösung).

14.3.1 Reagenzien Vorbereitung

Vor dem Gebrauch müssen alle Reagenzien auf Raumtemperatur (+18...+25°C) gebracht und gründlich gemischt werden.

Anmerkung: *Vorbereitung der anderen Reagenzien siehe Abschnitt 8.*

TRIAL Trial-Lösung zum Reinigen der gerät-internen Hydraulikleitungen und Nadeln des ELISA-Automaten. Zubereitung der benötigten Menge der Trial-Lösung vor der Analyse durch 5000fache Verdünnung des Konzentrates mit

destilliertem oder deionisiertem Wasser:

2 ml **TRIAL** **5000X** + 9998 ml Wasser

Sorgfältig mischen, Schaumbildung vermeiden.

14.3.2 Testablauf des automatisierten Tests

Bei Benutzung des ELISA-Automaten „Alisei“ ist die entsprechende Gebrauchsanweisung des Gerätes zu verwenden.

Die Durchführung des Enzymassays mit „Alisei“ ist komplett automatisch: Pipettieren der Reagenzien, Waschschrte, Inkubation, OD-Messung und Analyse der Testergebnisse.

Das Programm zur Berechnung der AFP-Konzentration ist im Gerät ebenfalls enthalten.

14.4 Datenverarbeitung

14.4.1 Datenverlässlichkeit (OD 450 nm)

Siehe Kriterien des Abschnittes **13.4.1**.

14.5 Vorsichtsmaßnahmen

- Bei mehrfacher Nutzung des Testkit in einem ELISA-Automaten müssen die Reagenzien aufgrund der Verdunstung unmittelbar nach Beenden des Pipettiervorganges aus dem Automaten genommen werden, um einen möglichen Verlust durch Verdunstung zu vermeiden. Die Reagenzien sind in den Kühlschrank zu stellen.
- Die Rekalibrierung anhand der Standardkurve eines Testkits mit anderer Lotnummer ist nicht zulässig.

2. INTENDED USE

The **AFP kit** is provided for the **quantitative** determination of **alpha-fetoprotein (AFP) in human serum**.

This test has 2 complete sets:

REF 22-02 for manual use,
REF 22-02 A must be used with ELISA automatic instrument "Alisei" manufactured by NEXT Level S.r.l. hereinafter referred to as analyser "Alisei"

Instructions for use:

Section 13 for manual test,
Section 14 for *analyser*.

Note 1: *Take into account that calibrators' nominals can be different for manual and automatic test kits.*

Note 2: *We guarantee applications of test:*

REF 22-02 A only on analyser "Alisei",
REF 22-02 only for manual use.

While using non predefined methods of use, it is under end user responsibility, to make sure that it was appropriately tested for ELISA kits.

AFP is a glycoprotein with a molecular mass of about 70 000 Da. During the ontogenesis AFP is produced mostly in yolk-sac and embryonal liver and, in less extent, in gastrointestinal tract. AFP is the main serum protein of early fetus. AFP concentration in fetal serum reaches its climax of up to 240 000 IU/mL between 12 and 15 weeks of gestation.

Then its concentration decreases and at the end of second year reaches the normal level (0-16 IU/mL). Normally, AFP concentration maintains at this level for life.

AFP is excreted through the fetus' kidneys into the amniotic fluid. From there it penetrates into maternal blood through placenta and umbilical cord. AFP level in serum of pregnant women continuously increases and reaches the maximum (up to 400 IU/mL) at the middle of the third trimester. Serum AFP measurement in pregnant women is an important method of early diagnostics of some inborn diseases. Besides, this method is widely used in obstetrics for diagnostics of multiple pregnancy, prenatal death and threatening abortion.

AFP measurement can be also used for the diagnostics and monitoring of different forms of cancer. For instance, high and maintaining AFP level (800...80 000 IU/mL) is often connected with primary hepatomas, testis teratomas and ovary tumors.

3. PRINCIPLE OF TEST

The **AFP kit** is a “sandwich” type of solid-phase enzyme immunoassay, based on two monoclonal antibodies that are specific for different epitopes of AFP molecule. One of these antibodies is conjugated with horseradish peroxidase (HRP); the other is coated onto the inner surface of microwells. The AFP molecules from the serum sample bound to both immobilized antibody and anti-AFP-peroxidase conjugate (Fig. 1). Then the wells are washed with wash solution to remove any material not bound to the inner surface of the wells. Quantity of the bound conjugate is directly proportional to AFP level in the sample.

During incubation with substrate the colour is developing. The intensity of the colour correlates to the concentration of AFP in specimens or calibrators. AFP concentration in the patient sample is read from a standard curve that is processed in each assay.

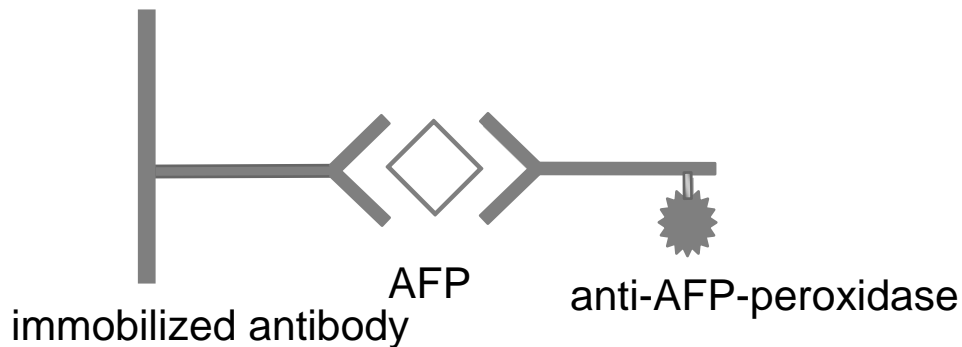


Fig. 1 Assay scheme

4. STORAGE AND STABILITY OF THE KIT

The expiration date of the kit is printed on the box label; expiration date for each component is printed on the respective label.

The **AFP kit** should be stored at +2...+8 °C upon receipt, preferably in the original kit box, until the expiration date. Storage at +25 °C is allowed but for no more than 5 days.

Shelf life of the kit is 18 months.

After initial opening the kit is stable for 12 months if stored at +2...+8 °C. If used in several separate experiments, after initial opening kit contents should be stored as follows but never used longer than the expiration date:

- unused strips: in a firmly closed resealable zipper bag at +2...+8 °C until the expiration date;
- vials with conjugate, calibrators and control (ready-to-use): at +2...+8 °C for 12 months; vials with calibrators and

control (reconstituted): at +2...+8 °C for no more than 1 month after opening;

- vial with substrate: at +2...+8 °C until the kit expiration date, protected from light;
- vials with concentrated Trial, sample diluent, concentrated wash solution and stop solution: at +2...+8 °C until the expiration date;
- wash solution prepared for use: at room temperature (+18...+25 °C) for no more than 5 days or at +2...+8°C for no more than 4 weeks, in a firmly closed bottle;
- Trial solution prepared for use: at room temperature (+18...+25 °C) for no more than 5 days, in a firmly closed bottle.

Damaged Test Kits

In case of any severe damage of the test kit or components, Astra Biotech GmbH has to be informed in writing, during one week after receiving the kit. Usage of severely damaged single components for a test run is not recommended.

5. SAMPLE COLLECTION AND STORAGE

Collect blood by venipuncture. After clotting, the serum is separated by centrifugation.

Do not use plasma, haemolyzed (bright red) or lipaemic (milky) serum samples as well as samples containing sodium azide as preservative. Store serum and plasma samples at +2...+8 °C for no more than 2 days. Aliquot and freeze the samples for a longer storage (≤ -20 °C). Avoid repeated freezing.

6. EXPECTED VALUES

Serum samples of 200 apparently healthy people (both males and females) were assayed with **AFP kit**, the AFP range was 0–14.4 IU/mL. These limits should be considered as guidelines only.

22 058 blood samples of pregnant women have been measured with the Astra Biotech AFP kit (2009-2010).

Pregnancy term on FDLMP, quantity of completed weeks	AFP			
	Median, ng/mL	Tolerant limits, ng/mL	Median, IU/mL	Tolerant limits, IU/mL
14	35	17-59	28	13-47
15	39	22-87	31	17-70
16	44	24-77	35	19-62
17	48	28-86	38	22-69
18	56	31-76	45	25-60
19	60	35-115	48	28-92
20	68	37-130	54	29-104

FDLMP – the first day of the last menstrual period

Tolerant limit – a limit in which with 95 % probability all physiological values of a marker lie.

It is highly recommended for each laboratory to determine its own reference ranges of AFP concentrations.

7. QUALITY CONTROL

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

8. REAGENT PREPARATION

Allow all the reagents to reach room temperature, and then thoroughly stir.

MP Microplate

Keep the **microplate** at room temperature (+18...+25 °C) for at least 30 minutes before opening the bag. Place required number of strips onto strip holder. Place unused strips into the resealable zipper bag and reseal duly.

CAL CONTROL Calibrators and Control

Liquid calibrators and control are ready to use.

Prepare lyophilized calibrators and control as follows. Gently tap on the vial caps to knock off all the dry matter. Open the vials and carefully place the caps upside down on the clean dry surface. Add 0.5 mL of distilled or deionized water to each vial with lyophilized calibrators and control, close vials with the corresponding caps and leave for 10 min at room temperature without stirring. Then stir gently avoiding foaming, until the dry matter is completely dissolved. Leave for another 10 minutes at room temperature stirring gently periodically. Make sure than no dry matter is left on the caps and walls of the vials.

WASH P Wash solution

Prepare required volume of **wash solution** by dilution of the concentrate 20-fold with distilled or deionized water. For example:

5 mL **WASH P 20X** + 95 mL water

Mix thoroughly, avoid foaming.

SUB Substrate

Protect **substrate** from direct light.

9. SAMPLE PREPARATION

Allow samples to reach room temperature. Stir samples gently in order to ensure homogeneity.

If expected AFP concentration in the serum sample is more than in calibrator 5, the sample should be additionally diluted **20-fold** (Sample 1) or **400-fold** (Sample 2) **DIL** in concordance with instructions for use for analyser “Alisei” or manually before analysis.

The example of manual sample dilution as follows:

Sample 1 (**20-fold dilution**):

380 μ L sample diluent **DIL** + 20 μ L serum sample

Sample 2 (**400-fold dilution**):

380 μ L sample diluent **DIL** + 20 μ L Sample 1

Vortex or mix thoroughly.

10. PERFORMANCE CHARACTERISTICS OF THE ASSAY

10.1. Calibration-Traceability:

The **AFP kit** was calibrated against the WHO 1st International Standard preparation 72/225.

10.2. Specificity:

No cross-reaction was detected between anti-AFP monoclonal antibodies used in the assay and serum albumin, chorionic gonadotropin, human placental lactogen and human immunoglobulin.

10.3. Analytical Sensitivity:

Analytical sensitivity of **AFP kit** i.e. concentration, that can be distinguished from zero calibrator, is 0.9 IU/mL. It was defined as mean OD of 10 replicates of calibrator 0 plus two standard deviations.

10.4. Measurement Units:

In **AFP kit** concentrations of calibrators are specified in IU/mL. To convert into ng/mL, multiply the concentration in IU/mL by 1.21.

10.5. Measurement Range:

The AFP kits (manual and Alisei kit) were validated for measurement of AFP within the concentration diapason (without dilution) of 0.9-300 IU/mL.

10.6. Hook Effect:

For AFP assay no high dose hook effect was detected for AFP concentration up to 12500 IU/mL.

10.7 Intra- and Inter-Assay Variation:

To determine **intra-assay CV** 8 serum samples were assayed in 9 replicates each. The results are shown below.

Manual kit

Sample	Mean AFP concentration, IU/mL	Intra-assay CV	
		SD	CV, %
1	4.8	0.47	9.8
2	24.3	1.85	7.6
3	46.8	2.46	5.2
4	49.2	2.19	4.4
5	61.3	4.12	6.7
6	72.5	3.14	4.3
7	86.3	6.75	7.8
8	167.6	4.99	2.9

Alisei kit

Sample	Mean AFP concentration, IU/mL	Intra-assay CV	
		SD	CV, %
1	5.1	0.21	4.1
2	10.7	0.83	7.8
3	24.5	1.67	6.8
4	57.1	3.26	5.7
5	72.2	2.59	3.6
6	93.4	3.21	3.4
7	125.0	6.40	5.1
8	189.9	9.94	5.2

To determine **inter-assay CV** 8 serum samples were assayed 3 times by different operators with 1-week interval. Each specimen was assayed in 9 replicates. The results are shown below.

Manual kit

Sample	Mean AFP concentration, IU/mL			Inter-assay CV	
	1 assay	2 assay	3 assay	SD	CV, %
1	5.0	4.3	5.2	0.46	9.6
2	26.2	22.0	24.4	2.09	8.6
3	48.0	43.8	48.6	2.61	5.6
4	49.3	46.9	51.3	2.22	4.5
5	63.5	56.5	63.7	4.1	6.7
6	72.7	69.3	75.0	2.89	4.0
7	89.4	79.3	90.4	6.14	7.1
8	166.2	167.0	172.2	3.28	1.9

Alisei kit

Sample	Mean AFP concentration, IU/mL			Inter-assay precision	
	1 assay	2 assay	3 assay	SD	CV, %
1	5.2	4.7	5.4	0.36	7.1
2	11.5	12.0	10.3	0.87	7.7
3	25.7	23.8	26.9	1.56	6.1
4	61.1	54.0	55.7	3.70	6.5
5	78.0	69.9	72.1	4.19	5.7
6	100.0	93.1	89.9	5.16	5.5
7	119.9	125.9	130.3	5.22	4.2
8	201.6	194.3	188.5	6.56	3.4

10.8. Dilution Parallelism of Serum Samples:

Serial dilutions of three human serum samples with predetermined AFP concentration were assayed with **AFP kit** with the following result:

Manual kit

Sample	Dilution with sample diluent	Measured concentration, IU/mL	Expected concentration, IU/mL	Measured/expected concentration ratio, %
1	Undiluted	273.2		
	1:2	133.4	136.6	98
	1:4	70.2	68.3	103
	1:8	36.7	34.15	107
	1:16	17.0	17.075	100
	1:32	8.90	8.54	104
2	Undiluted	179.4		
	1:2	83.9	89.7	93.5
	1:4	44.5	44.9	99.2
	1:8	21.7	22.4	96.7
	1:16	9.80	11.2	87.3
	1:32	5.41	5.6	96.7
3	Undiluted	288.0		
	1:2	135.1	144.0	93.8
	1:4	70.7	72.0	98.2
	1:8	38.6	36.0	107
	1:16	20.2	18.0	112

Alisei kit

Sample	Dilution	Measured concentration, IU/mL	Expected concentration, IU/mL	Observed/expected concentration ratio, %
1	Undiluted	270.5		
	1:2	140.9	136.6	103
	1:4	72.7	68.3	106
	1:8	32.1	34.15	94
	1:16	18.6	17.075	109
	1:32	7.8	8.54	91
2	Undiluted	177.1		
	1:2	81.6	89.7	91

Sample	Dilution	Measured concentration, IU/mL	Expected concentration, IU/mL	Observed/expected concentration ratio, %
	1:4	44.9	44.9	100
	1:8	22.9	22.4	102
	1:16	11.8	11.2	105
	1:32	6.1	5.6	109
3	Undiluted	284.6		
	1:2	148.2	144	103
	1:4	76.9	72	107
	1:8	35.4	36	98
	1:16	19.6	18	109





11. LIMITATION OF THE METHOD


Any clinical diagnosis should not be based on the results of in vitro diagnostic methods alone. For diagnosis establishment, a physician is supposed to consider all available clinical and laboratory findings.

12. SAFETY PRECAUTIONS

- **This kit is for in vitro diagnostic use only.** Operator should follow the manual closely in order to ensure reliable data. The manual is valid for the present kit only, within the listed composition. Any substitution of kit components is not allowed by CE regulations.

- Do not use kit or its components after the expiration date indicated on the label. Take into account stability period for reconstituted reagents.
- Do not mix or use together reagents from different lots of the kit except substrate, stop solution and wash solution.
- Do not use substrate, stop solution and wash solution supplied by other vendors.
- Use only “P”-labeled Astra Biotech wash solution.
- Note that stop solution is 1 N HCl solution. Avoid contacts with skin and mucosa. In case of contact rinse affected area thoroughly with plenty of water and seek medical advice.
- Take into account the following common procedural notes:
 - always pipette reagents into wells immediately after washing procedure;
 - avoid contamination of the solutions;
 - in case of partial use of the kit, dispense only required volume of the reagent into the tray;
 - do not pour unused reagents back into the original vials;
 - avoid exposure to direct sunlight during incubations;
 - always pipette reagents in the same order to minimize reaction time differences between wells; the total dispensing time for the calibrators, control and samples must not exceed 15 min;
 - the incubation temperature for all the immunological reactions must be kept at +37 °C;
 - do not touch the bottom of the wells;
 - calibrators should be measured in each separate assay. It is also recommended to measure each time AFP concentration in the control.

- remove the adhesive foil carefully to avoid contamination and don't use the adhesive foil repeatedly.
- TMB solution should be colourless. Light colouring of solution is admissible. Avoid direct exposure of substrate to sunlight.
-  Source materials of human origin used for kit components preparation were tested and found negative for HBsAg, anti-HIV and anti-HCV antibodies. However, none of known laboratory test guarantees absence of these viral agents. Therefore, all kit components and patient's samples should be handled as potentially hazardous.
-  After usage strips, calibrators, control, specimens and all consumables which contacted with specimens during handling, storage or assay (tubes, vials, gloves, pipette tips etc.) should be collected separately and sterilized by autoclaving. Instead of autoclaving pipette tips may be sterilized by disinfectant treatment. After sterilization all components and expendable materials may be utilized as non-dangerous garbage. Other components of the kit should be discarded into conventional garbage.
-  During manual washing procedure do not discard the contents of the wells directly to drainage. Use a container with disinfectant solution.
-  As the kit contains potentially hazardous material, the following precautions should be taken:
 - do not smoke, eat or drink while performing the assay;
 - always use protective gloves;

- never pipette material by mouth;
- in case of spilling, wipe up the spills promptly and wash affected area thoroughly using decontaminant.
- GLP including all general and individual regulations should be applied for the kit usage.
-  As the kit contains irritant (**CONJ**, **DIL**, **CAL**, **CONTROL**), the following precautions should be observed:
 - P261 - Avoid breathing spray;
 - P272 - Contaminated work clothing should not be allowed out of the workplace;
 - P280 - Wear protective gloves/protective clothing/eye protection;
 - P302+P352 - IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water;
 - P333+P313 - If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/attention;
 - P363 - Wash contaminated clothing before reuse;
 - P501 - Dispose of contents/container in accordance with national regulation.

Precautionary statements according to Regulation EC No 1272/2008.

13. MANUAL TEST (REF 22-02)

13.1. Material Provided

MP	Microplate: 12 breakable 8-well strips (total 96 wells) coated with anti-AFP monoclonal antibodies	1 pcs
CONJ	Conjugate: solution containing anti-AFP monoclonal antibodies conjugated with HRP	14 mL, ready to use
0-5 CAL	AFP calibrators: protein-based solution or lyophilized preparations containing known AFP concentrations – 0; 10; 50; 100; 200; 300 IU/mL (approximate values - do not use for evaluation of real assay data). The concentrations of calibrators may be different for Assay Protocol 1 and 2. For lot specific AFP concentrations see values for respective Assay Protocol provided in the Quality Control Sheet.	6 vials, 0.5 mL each; ready to use or lyophilized
CONTROL	AFP control: protein-based solution or lyophilized preparation containing known AFP concentration. The range of AFP concentration may be different for Assay Protocol 1 and 2. For lot specific ranges of AFP concentrations see values for respective Assay Protocol provided in the Quality Control Sheet.	0.5 mL, ready to use or lyophilized
SUB	Substrate (TMB solution): 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine solution in citrate buffer containing hydrogen peroxide	14 mL, ready to use
WASH P 20X	Wash solution P, 20X concentrated: surfactant in buffered saline, sufficient for preparation of 560 mL of solution	2x14 mL, concentrated

STOP	Stop solution: 1 N HCl solution	14 mL, ready to use
DIL	Sample diluent	10 mL, ready to use
	Adhesive foil	2x1 foil (optional)

13.2. Equipment and Materials Required but not provided

- 1-channel calibrated variable precision pipettes, with disposable tips;
- 8-channel calibrated variable precision pipette, with disposable tips;
- microplate incubator (+37 °C) or microplate incubator-shaker (37°C, shaking speed 500–800 rpm);
- manual or automatic equipment for rinsing wells;
- calibrated microplate reader (450 nm);
- vortex tube mixer;
- deionized or distilled water;
- graduated beaker and cylinder of appropriate volume;
- latex or plastic gloves;
- trays for pipetting reagents with 8-channel pipette;
- disinfectant;
- absorbent material (for manual wash).

13.3. Test Procedure

The **AFP kit** is designed for 96 tests. This is sufficient for the **quantitative assay** of 40 unknowns, 6 calibrators, 1 control and 1 blank (OD of TMB solution) in duplicates, provided that all the strips are used simultaneously.

13.3.1. Assay Procedure

Note: Please check in the *Quality Control Sheet* supplied with the kit for which Assay Protocol your kit has been validated. If your kit has been validated for Assay Protocol 1, please follow the Assay Protocol 1 described below. If your kit has been additionally validated for Assay Protocol 2, please consider the Supplement 1 to the Instructions for use provided with the kit.

Assay Protocol 1

(see also Assay scheme to Assay Protocol 1, section 13.5)

Note: Consider concentrations of calibrators and control range for Assay Protocol 1 provided in the *Quality Control Sheet*.

- A. Pipette **100 µL conjugate** **CONJ** into each well, **except wells A1-A2 (blank)**.
- B. Pipette **20 µL** of **calibrators** **CAL**, **control** **CONTROL** and prepared **patient's samples** in **duplicates** into the respective wells.

Leave wells A1-A2 empty for blank!

Note: *total time of dispensing must not exceed 15 minutes, otherwise the test result may be unreliable, because the time of incubation will substantially vary for different samples.*

Note: *If an adhesive foil is used, put it now onto the plate to seal the cavities.*

- C. Incubate for **60 minutes at +37 °C** while shaking (**500–800 rpm**).

Note: *If an adhesive foil is used, remove it now from the plate.*

- D. Wash 5 times, as described below.

- E.** Pipette **100 µL substrate** **SUB** into each well (including blank).
- F.** Incubate strips **at room temperature** (+18...+25 °C) **in the dark for 15-30 minutes**, depending on the colour intensity, or **10 minutes while shaking (500-800 rpm) at +37 °C**.
- G.** Pipette **100 µL stop solution** **STOP** to all the wells (including blank) in the same sequence and at the same speed as used for dispensing TMB substrate. **Shake for 1–2 min at room temperature**.
- H.** Read **OD at 450 nm within 20 min**.

13.3.2 Wash Procedure

It is advisable to use an automatic microplate washer set at 5 wash cycles and a volume of 300 µL of wash solution per well per cycle.

If an automatic washer is not available, the wash procedure can be carried out manually as follows:

- remove the contents of the wells into a container with disinfectant;
- dispense 300 µL of wash solution (section 8) into each well, shake the plate carefully for 5–10 sec and remove the contents of the wells; repeat 5 times;
- strike the wells sharply on absorbent material to remove any liquid residue.

13.4. Data Processing

If the reader cannot be adjusted to zero using the substrate blank in wells A1-A2, subtract mean OD value of wells A1-A2 from all OD values before further calculations.

Example:

OD (Cal 5) measured = 2.28 and OD (blank) = 0.06;

OD (Cal 5) calculated = $2.28 - 0.06 = \underline{2.22}$

13.4.1. Data Reliability (for OD measured at 450 nm)

The data should meet the following criteria:

- average blank OD (in wells A1-A2) ≤ 0.100 ;
- average OD of Cal 5 ≥ 1.0 (after blank subtraction).
- control's concentration must fall within the acceptability range that is shown on the Quality Control Sheet.

If the data obtained do not meet the criteria, the results are considered unreliable and the test should be repeated.

13.4.2 Quantitative Determination

Specialized software for quantitative determination is recommended. Mean OD of calibrators are plotted versus their respective AFP concentrations using **4PL or 5PL fit** (Fig. 2 typical standard curve).

Calculate concentration of AFP in samples using standard curve.

Any extrapolation of the standard curve to AFP above the nominal value of the calibrator 5 (approximately 300 IU/mL) is forbidden. In this case the sample should be diluted 50- or 2000-fold with sample diluent and re-tested. Multiply the measured concentration of pre-diluted samples by corresponding dilution factor.

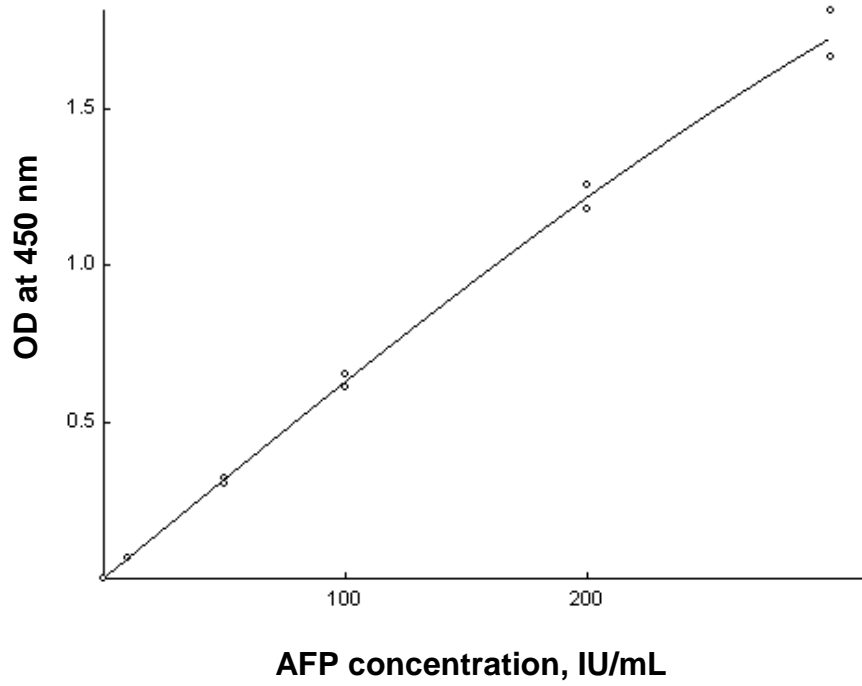



Fig. 2 Example of typical standard curve
Do not use for evaluation of real assay data!

13.5 Assay scheme to Assay Protocol 1

Reagents	Wells	«Blank»	CAL CONTROL	Samples
CONJ	–	–	100 µL	100 µL
CAL CONTROL	–	–	20 µL	–
Samples	–	–	–	20 µL
Incubation No. 1	60 min, +37 °C, 500–800 rpm			
WASH P (diluted)	5 x 300 µL			
SUB	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
Incubation No. 2	15–30 min, +18...+25 °C, in the dark			
	10 min, +37 °C, 500–800 rpm			
STOP	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
Stirring	1–2 min, +18...+25 °C			
OD measuring	450 nm			
Calculations	Corresponding software			

14. AUTOMATIC TEST (REF 22-02 A)

14.1. Material Provided

MP	Microplate: 12 breakable 8-well strips (total 96 wells) coated with anti-AFP monoclonal antibodies	1 pcs
CONJ	Conjugate: solution containing anti-AFP monoclonal antibodies conjugated with HRP	14 mL, ready to use
0-5 CAL	AFP calibrators: protein-based solution or lyophilized preparations containing known AFP concentrations- 0; 10; 50; 100; 200; 300 IU/mL (approximate values - do not use for evaluation of real assay data). For lot specific AFP concentrations see values provided in the Quality Control Sheet. 	8 vials, 0.5 mL each: CAL 1, 4 – 2 × 0.5 mL; CAL 0, 2, 3, 5 – 1 × 0.5 mL; ready to use or lyophilized
CONTR OL	AFP control: protein-based solution or lyophilized preparation containing known AFP concentration. For exact range of AFP concentration see Quality Control Sheet	2 × 0.5 mL; ready to use or lyophilized
WASH P 20X	Wash solution P, 20X concentrated: surfactant in buffered saline, sufficient for preparation of 1000 mL of solution	50 mL, concentrated
SUB	Substrate (TMB solution): 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine solution in citrate buffer containing hydrogen peroxide	14 mL, ready to use
STOP	Stop solution: 1 N HCl solution	19 mL, ready to use
TRIAL 5000X	Trial solution, 5000X concentrated: solution of detergent	It is delivered by separate order.
DIL	Sample diluent: protein-based solution	2 × 10 mL, ready to use

Note: Extra vials of **CAL** 1, 4 and **CONTROL** are provided for recalibration on reference calibration curve. For detailed information see instructions for use for analyser “Alisei”.

14.2. Equipment and Materials Required but not provided

- Automatic analyser for ELISA kits on microplate (analyser “Alisei”);
- multipurpose polypropylene tubes 12x75 volume 5.5 mL;
- **TRIAL 5000X** Trial solution, 5000X concentrated;
- deionized or distilled water;
- latex or plastic gloves.

14.3. Test Procedure

The **AFP kit** is designed for 96 tests. This is sufficient for 88 unknowns, 6 calibrators, 1 control and 1 blank (OD of TMB solution) in monoplicates, provided that all the strips are used simultaneously.

14.3.1. Reagent Preparation

Allow all the reagents to reach room temperature (+18...+25 °C), and then thoroughly stir.

Note: Preparation of other reagents see in section 8.

TRIAL Working solution of Trial for washing internal hydraulic lines and needles of automatic analyser.

Prepare required volume of **Trial solution** by dilution of the concentrate 5000-fold with distilled or deionized water before analysis:

2 mL **TRIAL 5000X** + 9998 mL water

Mix thoroughly, avoid foaming.

14.3.2. Assay Procedure for Automatic Test

While using for the procedure analyser “Alisei”, refer to its relative manual.

The analysis on analyser “Alisei” is completely automatic: pipetting of reagents, washing, incubation, OD measurement, analysis of results. The program of calculation AFP concentration is hardwired in analyser memory.

14.4. Data Processing

14.4.1. Data Reliability (OD measured at 450 nm)

See criteria in section 13.4.1.

14.5. Safety precautions

- If kit for analyser “Alisei” is used in several separate experiments it is necessary to take reagents from analyser “Alisei” immediately after pipetting them in the wells of all plates because liquid evaporates from vials. Put the reagents in refrigerator;
- Recalibration using calibration curve, obtained with a kit of any other lot, is not permitted.

August, 21, 2019



Astra Biotech GmbH
Rudower Chaussee 29,
12489 Berlin, Germany
Telefon: +49 (0)30 74696509
E-Mail: info@astrabiotech.de
www.astrabiotech.de