
INTERÉS CLÍNICO

La Alfa-fetoproteína (AFP) es un importante antígeno oncofetal, que en el suero del individuo normal se encuentra en concentraciones mínimas y aumenta fisiológicamente durante el embarazo. Su determinación en suero humano resulta de gran interés en:

1.- El estudio de alteraciones del embarazo.

La determinación de AFP en suero materno, se ha orientado hacia el pesquiasaje prenatal de Defectos del Tubo Neural (DTN) (1,2). Diversos estudios han señalado que un programa de pesquiasaje de DTN basado en la determinación de AFP sérica materna, permite detectar aproximadamente el 80 % de las espinas bífidas abiertas y el 90 % de las anencefalias (3), posee además una sensibilidad del 90 % en el diagnóstico de Defectos Abiertos de la pared ventral anterior (gastroquisis y onfaloceles) (4). La concentración de AFP en suero materno se encuentra elevada también en situaciones tan disímiles como el embarazo gemelar, amenaza de aborto, muerte fetal y otras (2,5), por lo cual un pesquiasaje masivo de AFP en gestantes, facilita el diagnóstico de estos casos (6). Los valores anormalmente bajos de AFP y elevados de HCG en el suero materno se asocian a cromosopatías fetales como el Síndrome de Down (7-10), comprobándose la utilidad clínica del pesquiasaje combinado de AFP, HCG y edad materna para calcular el riesgo de portar un feto con esta cromosopatía (11-13).

2.- Como marcador tumoral.

La AFP es un marcador asociado a los carcinomas hepatocelulares (14) y a tumores de células germinativas de ovarios y testículos (15). También puede encontrarse elevada en otros tumores malignos tales como carcinomas gástricos y pancreáticos (16), colangiocarcinomas y carcinomas esofágicos (17).

3.- En el estudio de hepatopatías no neoplásicas.

Se han encontrado valores altos de AFP sérica en enfermedades hepáticas no neoplásicas, tales como hepatitis y cirrosis, aunque en concentraciones menores que las halladas usualmente en los hepatomas. La mayor parte de estos aumentos en la concentración de AFP se observan en pacientes cuya hepatopatía está relacionada con el virus de la Hepatitis B (18).

El UMELISA AFP es un ensayo diseñado para el pesquiasaje de malformaciones congénitas asociadas al sistema nervioso central, en muestras de suero humano de embarazadas comprendidas entre las 15 y 19 semanas de gestación y en líquido amniótico para embarazadas con edades gestacionales entre 16 y 22 semanas. Debe ser utilizado con el Sistema Ultramicroanalítico (SUMA), adecuado para efectuar la prueba en óptimas condiciones y garantizando el empleo del equipamiento necesario.

FUNDAMENTO DEL ENSAYO

El UMELISA AFP es un ensayo inmunoenzimático heterogéneo tipo sandwich, en el cual se utiliza como fase sólida tiras de ultramicroELISA revestidas previamente con anticuerpos Anti AFP, lo cual garantiza la especificidad del ensayo.

Las muestras se incuban en los pocillos de la tira, fijándose la AFP presente en las mismas a los anticuerpos que revisten la tira. La realización de un lavado posterior elimina los componentes no fijados, permaneciendo en el pocillo el complejo anticuerpo/AFP. Se añade entonces un conjugado

Anti AFP/Fosfatasa Alcalina (F.A.), el cual se une a la AFP fijada en la reacción anterior. Un nuevo lavado de las tiras elimina el conjugado en exceso. Al añadir un sustrato fluorogénico (4-Metilumbeliferil fosfato) en los pocillos de la tira, éste resultará hidrolizado por la enzima del conjugado y la intensidad de la fluorescencia emitida será proporcional a la concentración de AFP presente en la muestra.

CONTENIDO DEL ESTUCHE Y PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES DE TRABAJO

Códigos UM 2005 (288 pruebas) y UM 2105 (480 pruebas)

Contenido:

Placa recubierta de 12 tiras x 8 pocillos	3	5
R1: Solución Tampón	2 x 25 mL	2 x 25 mL
R2: Suero de Camero	1 x 18 mL	1 x 18 mL
R3: Suero Estándar (a-f)*	6 x Liofilizado	6 x Liofilizado
R4: Suero Control	1 x Liofilizado	1 x Liofilizado
R5: Conjugado	1 x 7,5 mL	1 x 7,5 mL
R6: Sustrato	1 x 2 mL	1 x 2 mL
R7: Tampón Sustrato	1 x 18 mL	1 x 18 mL

* Calibrados frente al patrón de referencia internacional (IRP) 72 225 de la O.M.S.

El lote de las placas recubiertas se muestra en el borde de su envase primario, el cual está compuesto por cinco dígitos, los cuatro primeros representan la fecha de vencimiento de las placas y el quinto representa un indicador numérico interno del proceso de producción.

Todos los reactivos contienen azida sódica (0,2 g/L) como preservante. Los Sueros Estándares y el Suero Control, fueron negativos a las pruebas de detección de anti-

VIH 1+2, HBsAg, anti-VHC y Sífilis.

Preparación de las Soluciones de Trabajo:

R1: Para una tira de reacción, diluya 1 mL de la solución R1 hasta un volumen de 25 mL con agua destilada. Mezcle suavemente para evitar la formación excesiva de espuma. Prepare sólo lo necesario para el ensayo.

R2: Diluya 1:4 con solución de trabajo R1. Cantidad necesaria por tira: 2 mL (0,5 mL de R2 + 1,5 mL de R1). Prepare sólo lo necesario para el ensayo.

R3: Reconstituya cada frasco con 0,5 mL de la solución de trabajo R2. Permita su completa disolución y mezcle.

R4: Reconstituya con 0,5 mL de la solución de trabajo R2. Permita su completa disolución y mezcle.

R5: Listo para el uso. Cantidad necesaria por tira: 0,2 mL.

R6: Diluya 1:10 con R7. Cantidad necesaria por tira: 0,5 mL (0,05 mL de R6 + 0,45 mL de R7). Prepare inmediatamente antes de usar y sólo lo necesario para el ensayo.

CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD

Todos los reactivos deben mantenerse entre 2 y 8 °C, en esas condiciones serán estables en el envase original hasta la fecha de vencimiento.

Después de utilizar parte del contenido de los reactivos, el resto es estable durante 2 meses si se mantienen las mismas condiciones de almacenamiento y se evita la contaminación durante la ejecución de la prueba.

Las tiras de reacción no utilizadas se mantienen estables durante 2 meses entre 2 y 8 °C, en la bolsa suministrada protegida con el desecante y herméticamente cerrada.

MATERIALES NECESARIOS NO SUMINISTRADOS

- Agua destilada.
- Pipeta multicanal con puntas desechables para 10 µL.
- Pipetas de precisión entre 10 y 1000 µL.
- Probetas graduadas entre 10 y 250 mL.
- Incubadora a 37 ± 1 °C.
- Papel absorbente.

PRECAUCIONES

- Manipule las muestras, los Sueros Estándares y el Suero Control, como potencialmente infecciosos. Utilice guantes desechables. Los materiales utilizados deben colocarse en soluciones desinfectantes (Hipoclorito de sodio al 5 %) o esterilizarse en autoclave.

- Considere a los equipos y accesorios que se han puesto en contacto directo con las muestras y reactivos como contaminados. Realice los procedimientos de limpieza indicados en los manuales de usuario correspondientes.

- Antes de comenzar a trabajar, verifique que todos los reactivos estén a temperatura ambiente y los Sueros Estándares y el Suero Control, una vez preparados según las especificaciones, se encuentren completamente disueltos.

- Utilice puntas limpias o nuevas para la reconstitución y trabajo con las soluciones y muestras.

- Garantice el adecuado control de la humedad en todos los pasos de la prueba. Las muestras y reactivos una vez aplicados, deben mantenerse en las cámaras húmedas para evitar su evaporación ya que esto puede alterar los resultados.

- No incorpore a los frascos originales remanentes de reactivos.

- Las muestras de suero o de líquido amniótico a utilizar deben ser preferentemente frescas, sin precipitados y debe evitarse la congelación y descongelación reiterada de las mismas.

- Las tiras de reacción deben estar a la temperatura del laboratorio antes de retirarlas la cubierta protectora, para evitar que se condense humedad en su superficie.

- Verifique que las tiras de reacción estén niveladas en el soporte.

- Evite la exposición a la luz de los frascos que contienen el Sustrato.

- Verifique periódicamente la exactitud y precisión de las pipetas.

- Cumpla las normas de manipulación de los equipos utilizados y verifique previamente su adecuado funcionamiento, tenga especial cuidado en las operaciones de pipeteo y lavado.
- Evite posibles contaminaciones con materiales fluorescentes.
- El juego de reactivos no debe emplearse después de la fecha de vencimiento.
- Los reactivos del UMELisa AFP de lotes diferentes no se deben intercambiar.

PROCEDIMIENTO TÉCNICO

1.- Preparación de los Sueros Estándares, el Suero Control y las muestras.

Sueros Estándares y Suero Control:

Los Sueros Estándares y el Suero Control, una vez reconstituidos quedan listos para su uso. La concentración de los Sueros Estándares se corresponde con la especificada en la etiqueta de los frascos.

Muestras:

Diluya las muestras de suero 1:2 con la solución de trabajo R2. En caso de trabajar con muestras de líquido amniótico diluirlas 1:400 con la solución de trabajo R2.

2.- Adición de los Sueros Estándares, el Suero Control y las muestras a las tiras de reacción.

Añada 10 µL de los Sueros Estándares, el Suero Control y las muestras de suero o líquido amniótico, siguiendo el siguiente esquema de distribución:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	R3a	R3e	3	11	19	27	35	43	51	59	67	75
B	R3a	R3e	4	12	20	28	36	44	52	60	68	76
C	R3b	R3f	5	13	21	29	37	45	53	61	69	77
D	R3b	R3f	6	14	22	30	38	46	54	62	70	78
E	R3c	R4	7	15	23	31	39	47	55	63	71	79
F	R3c	R4	8	16	24	32	40	48	56	64	72	80
G	R3d	1	9	17	25	33	41	49	57	65	73	81
H	R3d	2	10	18	26	34	42	50	58	66	74	82

Los Sueros Estándares (R3a-R3f) y el Suero Control (R4) deben añadirse de forma manual con una pipeta de precisión.

Se recomienda evaluar las muestras por duplicado. Si utiliza el programa UMELESA AFP para la interpretación automática de los resultados, debe colocar en las posiciones 1 y 2 la primera muestra, en las posiciones 3 y 4 la segunda y así sucesivamente.

3.- Incubación de los Sueros Estándares, el Suero Control y las muestras.

Incuba las tiras de reacción 1 hora a 37 °C en cámara húmeda previamente equilibrada a esa temperatura.

4.- Lavado.

Utilice un lavador de la tecnología SUMA. Lave las tiras de reacción 4 veces. Verifique el llenado total del pocillo con la solución R1 de trabajo. La solución debe permanecer como mínimo 30 segundos en los pocillos en cada lavado. Después de la última aspiración seque las tiras sobre papel absorbente.

5.- Adición del conjugado.

Con una punta nueva, extraiga del frasco de conjugado la cantidad necesaria según el número de tiras del ensayo y deposítelo en un recipiente limpio. Añada 10 µL del conjugado listo para usar en cada pocillo de reacción.

6.- Incubación del conjugado.

Incuba las tiras de reacción 1 hora a 37 °C en cámara húmeda previamente equilibrada a esa temperatura.

7.- Lavado.

Lave las tiras de reacción según se describe en el acápite 4.

8.- Adición del sustrato.

Coloque 10 µL de sustrato convenientemente diluido en cada pocillo de la tira de reacción.

9.- Incubación del sustrato.

Incuba en cámara húmeda a temperatura ambiente (20 a 25 °C). Normalmente se requiere una incubación de 30 minutos para alcanzar una señal fluorescente de 100 a 160 unidades para el Suero Estándar R3f. Sin embargo, debido a las variaciones de temperatura, puede resultar conveniente que cada laboratorio ajuste el tiempo de incubación para lograr estos niveles de fluorescencia.

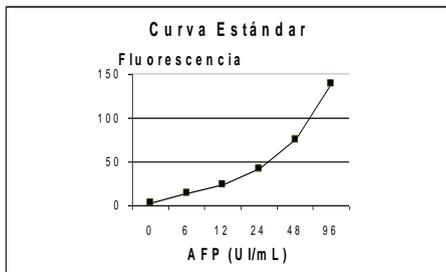
10.- Lectura.

Realice la lectura de la intensidad de la fluorescencia emitida en cada determinación utilizando un lector de la serie SUMA.

PROCEDIMIENTO DE CÁLCULO

- Los valores de fluorescencia de las muestras de concentración desconocida se interpolan en un gráfico de fluorescencia contra el logaritmo de la concentración de AFP correspondiente a la Curva Estándar, obteniéndose los resultados en UI/mL. Entre el Suero Estándar R3a y el R3b se utiliza una escala lineal-lineal. Este procedimiento es realizado automáticamente por el lector SUMA.
- La validación, interpretación e impresión de los resultados, son realizados automáticamente por el programa UMELISA AFP. De no disponerse de este programa, los resultados deben expresarse en múltiplos de la mediana (MoM), para lo cual debe dividirse la concentración de AFP de la muestra, expresada en UI/mL, entre la mediana de la edad gestacional correspondiente.

CONTROL DE LA CALIDAD



I. La Curva Estándar debe cumplir las siguientes condiciones:

La media de los dos valores de fluorescencia para cada Suero Estándar (R3a-R3f) deben proporcionar un incremento en fluorescencia proporcional a su concentración, siguiendo un patrón similar al ejemplificado, los valores discordantes son eliminados automáticamente por el programa.

II. El valor de concentración calculado para el Suero Control debe encontrarse en el intervalo establecido para el ensayo.

III. Si las muestras son analizadas por duplicado deben cumplir la siguiente condición:

La diferencia de los valores de fluorescencia de los duplicados de una muestra debe ser menor al 10 % con respecto a su valor medio.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Teniendo en cuenta los diferentes factores genéticos y ambientales que actúan sobre poblaciones de diferentes localizaciones geográficas, la práctica internacional recomienda que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia.

En el Programa Cubano de Determinación de AFP en gestantes, se consideran elevadas aquellas muestras de suero en las cuales se obtienen valores superiores a dos veces el valor de la mediana para la edad gestacional correspondiente (2 MoM) y en líquido amniótico (L.A.) para valores superiores a 2,5 MoM.

Los valores de las medianas establecidos en gestantes cubanas son los siguientes:

<u>Suero</u>		<u>Líquido amniótico</u>	
Edad Gestacional	Medianas (UI/mL)	Edad Gestacional	Medianas (UI/mL)
15	25,00	16	16 121
16	28,80	17	13 113
17	33,40	18	8 516
18	39,90	19	7 565
19	41,50	20	6 960
		21	5 210
		22	3 960

En estudios realizados en Cuba utilizando la determinación de AFP en el pesquijaje de neoplasias en una población mayor de 50 años supuestamente sana, se han considerado normales todas las muestras con concentraciones menores a 15 UI/mL, sospechosas con concentraciones entre 15 y 30 UI/mL y positivas si las concentraciones son superiores a 30 UI/mL.

CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DEL ENSAYO.

1. PRECISIÓN.

Se evaluaron tres muestras de concentraciones conocidas de AFP (n = 20) en el ensayo (intraensayo) y el mismo fue repetido durante varios días (interensayo).

Precisión del UMELESA AFP

(UI/mL)	Intraensayo (n=20)		Interensayo (n=20)	
	DE	CV (%)	DE	CV (%)
23,3	1,6	6,6	1,6	7,1
66,5	3,3	5,1	3,4	5,2
106,6	0,4	0,3	5,0	4,8

2. EXACTITUD.

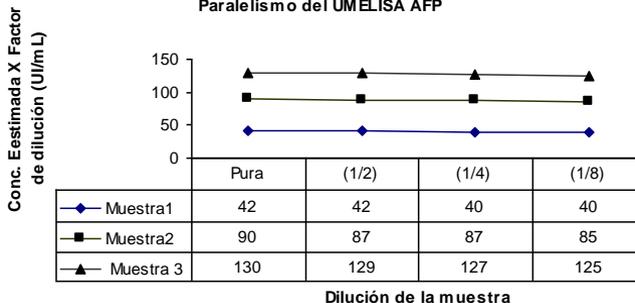
La adición de AFP a tres muestras de suero con diferentes niveles de AFP promedió un $102,4 \pm 8$ % de recuperación.

Recuperación del UMEHISA AFP

Muestras	Valor Esperado (UI/mL)	Valor Observado (UI/mL)	Recuperación (%)
1	19,7	18,7	95
2	90,3	92,47	102,3
3	161,9	177	110

Se realizaron diluciones seriadas a muestras de pacientes con altos niveles de AFP, mostrándose paralelas a la Curva Estándar. Las concentraciones calculadas después de la corrección con el factor de dilución fue del ± 9 % de la concentración original en la muestra pura.

Paralelismo del UMEHISA AFP



3. DETECTABILIDAD.

La detectabilidad del UMEHISA AFP es de 1,0 UI/mL. Se definió como la concentración calculada para la fluorescencia equivalente al Suero Estándar R3a + 2 D.E.

BIBLIOGRAFÍA

- 1.-Brock, D.J.H., Sutcliffe, R.G. Alpha fetoprotein in the antenatal diagnosis of anencephaly and spina bifida. *Lancet* 2:197-199, 1972.
- 2.-Milunsky, A, Alpert, E. The value of AFP in the prenatal diagnosis of neural tube defects. *J. Pediatric*. 84:889-893, 1974.
- 3.-Report of U.K. Collaborative Study on Alpha-fetoprotein in relation to Neural Tube Defects: Maternal serum Alpha fetoprotein measurement in antenatal diagnosis screening for anencephaly and spina bifida in early pregnancy. *Lancet* 1:1323-1332, 1977.
- 4.-Wald, N.J., Haddow, J.E.: MSAFP screening, in Alpha-fetoprotein Screening The current issues. Scarborough ME. The foundation for Blood Research 5, 1981.
- 5.-Crandall, B.F., et al. Risk for fetal abnormalities after very and moderately elevated AFPs. *Prenatal Diag.* 17:837-841, 1997.
- 6.-Solís, R.L., Fernández Yero, J.L., Robaina, R., Heredero, L.: 10 Years-Cuban Alpha-fetoprotein Program. *Neonatal Screening in the Nineties/Wilcken* 369, 1991.
- 7.-Cukle, H.S., Screening for neural tube defects, CIBA Foundation Symposium 181, Chinchester John Wiley, 253-269, 1984.
- 8.-Cuckle, H.H.S., Wald, N.J., Thompson, S.G.: Estimating a woman risk of having a pregnancy associated with Down's Syndrome using her age and serum alpha-fetoprotein level. *Brit J Obstet Gynaecol* 94:387-402, 1987.
- 9.-Kautzmann, M, Solís, R.L., Luberta, A., Fernández Yero, J.L., Navarro, J., Rodríguez, L., et al. Study of the efficiency of screening for trysomy 21 based on maternal serum levels of AFP and HCG combined with maternal age. *J. Clin. Ligand Assay*. 181-185, 1995.
- 10.-Bogart, M.H., Pandian, M.R., Jones, O.W.: Abnormal maternal serum chorionic gonadotrophin levels in pregnancies with fetal chromosome abnormalities. *Prenat Diagn* 7:623-630, 1987.
- 11.-Merkatz, I.R., Nitowsky, H.M., Macri, J.N.: An association between low maternal serum alpha-fetoprotein and fetal chromosome abnormalities. *Am J Obstet Gynecol* 14:886, 1984.
- 12.-Palomaki,G.E., Williams, J., Haddow, J.E.: Combining maternal serum alpha-fetoprotein measurements and age to screen for Down's Syndrome in pregnant women under the age of 35. New England Regional Genetics Group Prenatal Collaborative Study of Down's Syndrome screening. *Am J Obstet Gynaecol* 160:575, 1989.
- 13.-Crossley, J.A, Aitken, D.A., Connor, J.M.: Prenatal screening for chromosome abnormalities using maternal serumchorionic gonadotrophin, alpha-fetoprotein, and age. *Prenatal diagnosis* 11:83-101, 1991.
- 14.-Tatarinov, Y.S.: Presence of embryonal alpha-globuline in the serum of patients with primary hepato-cellular carcinoma. *Vopr Med Khim* 10:90-91, 1964.
- 15.-Abelev, G.I. et al.: Embryonal serum alpha-globulin in cancer patients. *Diagnostic Value. Int J Cancer* 2:551-558, 1967.
- 16.-O'Connor, G. et al.: A collaborative study for the evaluation of a serologic test for primary liver cancer. *Cancer* 25:1091-1098, 1970.
- 17.-Spragins, J., Hall, W.H., White, H.J.: Fetoprotein from esophageal squamous cell carcinoma. *Ann Inter Med* 77:322- 323, 1972
- 18.-Kelsten, M.L. et al.: Monitoring hepatocellular carcinoma by using a Monoclonal

Immunoenzymometric Assay for Alpha-fetoprotein. Clin Chem 34:76-81, 1988.

Julio 31, 2003

UMELISA AFP

Códigos UM 2005 y UM 2105.

Centro de Inmunoensayo. Calle 134 y Ave. 25, Apdo Postal 6653, La Habana, CUBA. Teléfono: 208-2929, Fax: (537) 208-6514.