

hCEA [I-125] IRMA KIT

RK-38CT. Estuche para 100 determinaciones

Análisis inmunoradiométrico para la determinación cuantitativa *in vitro* del antígeno carcinoembrionario (CEA) en suero humano, en el rango de 0-180 ng/mL.

Introducción

El antígeno carcinoembrionario (CEA) es una glicoproteína de adhesión celular de 180-200 kDa, que existe en altas concentraciones en el tracto gastrointestinal durante el desarrollo embrionario. Los niveles de CEA disminuyen notablemente en los adultos, pero pueden elevarse en la presencia de enfermedades inflamatorias como la hepatitis, pancreatitis, gastritis, bronquitis, cirrosis, diverticulitis, enfermedad de Crohn y en la insuficiencia renal, así como en los fumadores.

El CEA puede considerarse un marcador tumoral de amplio espectro. Se observan concentraciones elevadas de CEA en las neoplasias digestivas (colon, recto, páncreas, estómago), mamarias, pulmonares (NSCLC) y ginecológicas (endometrio, cérvix).

En el carcinoma colorectal los niveles de CEA aumentan en proporción al estadio de la enfermedad. En éste y otros tumores donde se eleva el CEA, las principales aplicaciones clínicas son el pronóstico, el diagnóstico precoz de recidivas y la monitorización terapéutica.

Principio del ensayo

Este ensayo utiliza el principio del análisis inmunoradiométrico (IRMA) en fase sólida. Para ello emplea dos anticuerpos monoclonales que reconocen dos epítopes diferentes de la molécula. Uno de ellos está marcado con radioyodo (anticuerpo "señal") y el otro, no marcado, funciona como anticuerpo "captura".

El inmunocomplejo formado por el antígeno con los dos anticuerpos ("sandwich") se inmoviliza en la superficie de los tubos de ensayo durante un período de incubación de 1 hora bajo agitación constante. Después se decantan los tubos y se mide la radiactividad enlazada en un contador gamma. La radiactividad presente en los tubos es directamente proporcional a la concentración de la hormona presente en el sistema. Utilizando calibradores de concentración conocida de hCEA se prepara una curva de calibración a partir de la cual se determina por interpolación la concentración de hCEA presente en las muestras.

Contenido del juego

1. TRAZADOR, 1 frasco con 21 mL, listo para usar, contiene < 740 kBq de anticuerpos monoclonales anti-hCEA marcado con ¹²⁵I y anti-hCEA biotinilado en solución tampón con 0,1 % NaN₃ y colorante rojo.
2. CALIBRADORES (S0-S6), 7 frascos listos para usar con 1 mL de suero equino (S0) y suero humano (S1-S6) con 0,1% NaN₃. Los calibradores contienen: 0, 1,5*; 3; 10; 30; 90; 180 ng/mL y han sido calibrados contra el estándar de referencia WHO 1st IS 73/601.

*la concentración exacta se especifica en la etiqueta del frasco y el certificado de calidad incluido.

3. SUERO CONTROL, 2 frascos listos para usar, contienen 1 mL de suero humano con 0,1% NaN₃. La concentración del suero control está especificada en el certificado de calidad incluido.

4. DILUENTE, 1 frasco de 5 mL, listo para usar, contiene suero equino y 0,1 % NaN₃

5. SOLUCIÓN DE LAVADO, 1 frasco, contiene 20 mL de solución concentrada. Contiene 0,2 % NaN₃.

6. TUBOS RECUBIERTOS: 2x50 tubos de 12x75 mm, empaquetados en cajas plásticas, listos para usar.

Materiales y equipos necesarios

Gradilla para tubos de ensayo, pipetas de precisión con puntas desechables (50, 200 y 2000 µL), agitador horizontal u orbital, lámina de polietileno, papel absorbente, contador gamma.

Materiales y equipos recomendados:

Pipetas de repetición (200 y 2000 µL). Jeringa automática (dispensador) para el lavado.

Recolección y almacenamiento de las muestras

Las muestras de suero deben colectarse de acuerdo a los procedimientos habituales que se practican en los laboratorios clínicos. Las muestras pueden conservarse entre 2 y 8 °C si el análisis habrá de efectuarse dentro de las 24 horas siguientes, de lo contrario deben conservarse congeladas a una temperatura igual o menor que -20 °C hasta 5 meses. Las muestras congeladas deben descongelarse y mezclarse completamente antes de su uso. Evitar la congelación y descongelación repetida de las muestras.

Preparación y conservación de los reactivos

Conservar los reactivos entre 2 y 8 °C después de abiertos. A esta temperatura cada reactivo es estable hasta la fecha de vencimiento del juego. La fecha de caducidad exacta se especifica en la etiqueta del estuche y en el certificado de calidad.

La solución concentrada de lavado debe diluirse con 700 mL de agua destilada. Así diluida esta solución se conserva entre 2 y 8 °C hasta la fecha de vencimiento del juego.

¡PRECAUCIÓN!

Permitir que todos los reactivos y muestras alcancen la temperatura ambiente. Homogenizar completamente todos los reactivos y muestras antes de su uso, evitando la formación de espuma.

Procedimiento para el ensayo

(Ver Tabla 1.)

1. Marcar los tubos recubiertos por duplicado para la actividad total (T), calibradores (S0-S6), controles (CI-CII) y muestras (M).
2. Añadir por duplicado 50 µL de calibrador, suero control y muestras en los tubos apropiados, cuidando de no arañar el fondo del tubo.
3. Añadir 200 µL de trazador en cada tubo.

4. Fijar la gradilla con los tubos de ensayo firmemente en el agitador horizontal. Cubrir los tubos con una lámina de polietileno. Encender el agitador y ajustar la velocidad de manera tal que el líquido en los tubos esté rotando o agitándose constantemente. Incubar 1 hora en el agitador a temperatura ambiente.
5. Añadir 2 mL de solución de lavado a cada tubo. Aspirar o decantar el líquido de todos los tubos (excepto T) mediante la inversión de la gradilla. Colocar la gradilla sobre un papel absorbente por 2 minutos manteniendo la posición invertida.
6. Repetir dos veces el procedimiento de lavado según el punto 5.
7. Medir la radiactividad de cada tubo por 60 segundos en un contador gamma y calcular la concentración de CEA en las muestras como se describe a continuación.

Tabla 1. Protocolo del ensayo (volúmenes en microlitros)

	T	S0-S6	CI-CII	M
Calibrador		50		
Control			50	
Muestra				50
Trazador	200	200	200	200
Agitar 1 hora a temperatura ambiente				
Solución de lavado		2000	2000	2000
Decantar y secar en papel absorbente				
Solución de lavado		2000	2000	2000
Decantar y secar en papel absorbente				
Solución de lavado		2000	2000	2000
Decantar y secar en papel absorbente				
Medir la radiactividad (60 s/tubo)				
Procesar los datos				

Cálculo de los resultados

En la Tabla 2 y la figura 1 se muestran a manera de ejemplo los cálculos y una curva estándar típica de un ensayo. Para los cálculos:

Hallar la media de los conteos por minuto (cpm) para cada par de tubos. Restar de cada media el promedio de cpm obtenido para el calibrador de concentración cero (S0 = enlace no específico, NSB). Los valores así corregidos se dividen por la actividad total (T) como se muestra a continuación:

$$B/T (\%) = \frac{S1-6/Mx / (cpm) - S0(cpm)}{T (cpm)} \times 100$$

Construir una curva estándar ploteando las medias de cpm o, alternativamente, los valores B/T% contra la concentración de hCEA de cada calibrador en un papel log-log.

Determinar la concentración de hCEA en las muestras basándose en las respectivas medias de cpm o en los valores B/T%, por interpolación de la curva estándar. No extrapolar valores fuera del rango de la curva.

Para el procesamiento automatizado de los datos, recomendamos el uso del programa de ajuste tipo spline, desarrollado especialmente para el análisis inmunoradiométrico. Existen programas que interpolan los valores que se encuentran entre el calibrador de concentración cero y el primer calibrador. Entre las concentraciones así calculadas, solo aquellas mayores que el límite de detección del ensayo pueden considerarse como reales (ver sensibilidad).

Tabla 2. Resultados característicos del ensayo

Tubos	hCEA ng/mL	Conteos cpm	Media cpm	B/T%
T		307879 310574	309211	
S0	0	81 88	85	0,027
S1	1.6	1900 1898	1899	0,59
S2	3	3461 3387	3424	1,08
S3	10	10679 10443	10712	3,44
S4	30	33306 33520	33413	10,78
S5	90	87390 89529	88460	28,58
S6	180	143200 143211	143205	46,28

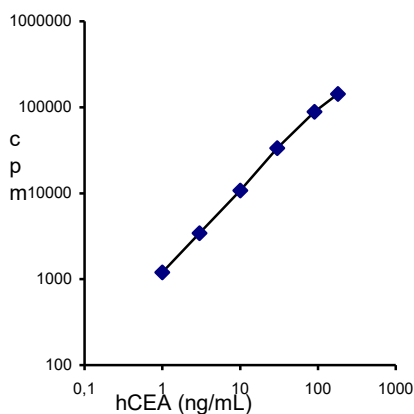


Figura 1

Curva estándar típica (*¡No utilizar para calcular concentraciones de las muestras!*)

Características del ensayo

Especificidad

Los anticuerpos monoclonales utilizados en este ensayo son específicos al CEA. No se observa reactividad cruzada con NCA (nonspecific cross-reacting antigen, CEACAM6) en concentraciones fisiológicas normales.

Sensibilidad

La *sensibilidad analítica* es de 0,01 ng/mL cuando utilizamos un trazador fresco y 0,05 ng/mL utilizando un trazador de 4 semanas. Esta fue calculada como la concentración correspondiente al valor de enlace medio más dos desviaciones estándar, para 15 réplicas del calibrador de concentración cero.

La *sensibilidad funcional* es la concentración de CEA que se diferencia significativamente de cero, determinada estadísticamente según el perfil de precisión interensayo (22%). La sensibilidad funcional es de 0,4 ng/mL.

Los límites de medición fueron determinados además según la guía EP17 del CLSI, en base a 120 determinaciones (60 de muestras cero y 60 de muestras con baja concentración) y con un 95% de probabilidad.

Límite del Blanco (LoB): 0,035 ng/mL

Límite de Detección (LoD): 0,09 ng/mL

Precisión

La precisión intra-ensayo se determinó a partir de 10 réplicas de 5 muestras, medidas en una serie. Para determinar la precisión inter-ensayo se midieron por triplicado 5 muestras,

en 15 series independientes. Los valores obtenidos se muestran a continuación.

Intra-ensayo		Inter-ensayo	
Media (ng/mL)	CV %	Media (ng/mL)	CV %
3,12	4,0	0,40	9,5
5,01	3,1	3,01	6,0
34,16	1,2	11,13	5,3
52,20	2,6	22,30	4,4
80,06	1,4	47,66	3,9

Prueba de dilución (linealidad)

Se diluyeron serialmente 5 muestras de suero a 4 niveles con diluyente y se sometieron a ensayo. Se obtuvo la siguiente relación lineal entre los valores medidos (Y) y los valores esperados (X):

$$Y = 1,0778X + 0,2436 \quad R^2 = 0,9997 \quad n = 20$$

La proporción entre valores medidos y esperados estuvo en un rango de 97 – 108%.

Prueba de recuperación

La recuperación se determinó como la diferencia porcentual entre el incremento observado y el incremento esperado, luego de añadir concentraciones conocidas (a 3 niveles) de CEA a 5 muestras de suero diferentes. La recuperación obtenida fue de $99,4 \pm 5,2\%$ (media \pm SD).

Valores de referencia

Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios intervalos de referencia. Los valores que se proporcionan a continuación deben considerarse solo como informativos.

Se evaluaron 200 adultos sanos (100 hombres y 100 mujeres). El 95% de los resultados se encuentra por debajo de 3,0 ng/mL. Para fumadores se recomienda un valor de referencia < 5 ng/mL.

Limitaciones del procedimiento

- Los reactivos provistos en este juego están optimizados para la medición de hCEA en suero.
- Las muestras hemolizadas, turbias o lipémicas pueden dar resultados falsos, evite su uso.
- No se observa efecto Hook con el uso del presente producto en concentraciones de CEA hasta 15000 ng/mL. Para cualquier muestra con una concentración en el intervalo entre 180-15000 ng/mL se obtendrán valores superiores a 180 ng/mL. Estas muestras deben ser diluidas con el diluyente y reanalizadas.
- Los resultados de este análisis deben ser utilizados conjuntamente a la información clínica pertinente.

Notas acerca del procedimiento

1) **Fuente de error!** Los tubos recubiertos no están marcados individualmente. Se debe evitar la mezcla con tubos de ensayo comunes. Para minimizar este riesgo, no se deben sacar de la caja más tubos de los necesarios, de igual manera los tubos no utilizados en una serie deben ser guardados de nuevo en su caja. Se recomienda rotular los tubos con marcador permanente.

2) **Fuente de error!** Para asegurar la agitación eficiente de los tubos se debe utilizar una gradilla

que los ajuste firmemente. Una agitación inadecuada puede provocar un rendimiento deficiente del ensayo y falsos resultados.

3) **Dosificación de la solución de lavado.** Para la adición de la solución de lavado se recomienda una jeringa automática o dispensador, equipado con un recipiente de 1 litro y un tubo flexible para la dosificación. En su ausencia puede utilizarse una pipeta automática apropiada.

¡Atención! ¡No mezclar los componentes de lotes diferentes o con productos de otro fabricante!

Precauciones

Material radiactivo

Este producto contiene material radiactivo. Es responsabilidad de cada laboratorio cumplir con las regulaciones locales referentes a la manipulación, conservación y desecho de materiales radiactivos.

Material potencialmente infeccioso

El suero humano utilizado en este producto ha sido analizado con métodos aprobados y no ha presentado positividad para anticuerpos frente a los virus de Inmunodeficiencia Humana (Anti-HIV-1/2) y Hepatitis-C (HCV), anticuerpos anti-Treponema y el antígeno de superficie de la Hepatitis-B (HBsAg). Ninguno de los métodos analíticos disponibles actualmente puede garantizar por completo la eliminación de posibles riesgos biológicos. Se deben manipular todos los reactivos y muestras de sangre como *material potencialmente infeccioso*.

Peligro químico

Algunos componentes de este juego contienen azida sódica como preservante. Al verter los desechos no radiactivos al sistema de desagüe se debe diluir con grandes cantidades de agua, para evitar la acumulación de azidas metálicas explosivas en las tuberías de plomo y cobre. Este producto contiene en total 75 mg de azida sódica.

	Fecha de vencimiento		Número de lote
	Almacenar entre 2 y 8 °C		Suero Control
	Precaución		Calibrador
	Peligro biológico		Tubos recubiertos
	Consulte las instrucciones		Trazador
	Dispositivo para diagnóstico <i>in vitro</i>		Tampón de lavado
	Fabricante		Material radiactivo
REF	Número de referencia		Diluyente



Sitio WEB: <http://www.izotop.hu>

E-mail técnico: immuno@izotop.hu

E-mail comercial: commerce@izotop.hu

IZOTOP

INSTITUTE OF ISOTOPES Ltd.

1535 Budapest. Pf.: 851.

Tel.: +36 1 392-2577, Fax: +36 1 395-9247

Edición: Abril/2022