

CA19-9 [I-125] IRMA KIT

Código RK-199CT (RK-199CT50).
Estuche para 100 (50) determinaciones.

Análisis inmunoradiométrico para la determinación cuantitativa *in vitro* del antígeno asociado al cáncer CA19-9 en suero humano, en el rango de 0-240 U/mL.

Introducción

El CA19-9 es una glicoproteína tipo mucina de alto peso molecular que porta repetidamente un epítopo carbohidrato específicamente reconocido por el anticuerpo monoclonal de ratón 1116NS19-9.

El CA19-9 es un marcador tumoral para el cáncer de páncreas. Su determinación en sangre es útil en la monitorización del tratamiento y el seguimiento post-terapéutico de pacientes con un cáncer confirmado y un nivel inicial elevado. Aquellos pacientes que genéticamente pertenecen al grupo sanguíneo Lewis a- b- (5% - 10% de la población) no expresan este antígeno. Se pueden encontrar además niveles elevados de CA19-9 en distintas neoplasias del tracto gastrointestinal (vesícula biliar, estómago, colon, esófago, hígado) y en cáncer de ovario tipo mucinoso.

Ciertas patologías benignas de los conductos biliares y del páncreas ocasionalmente pueden dar lugar a niveles elevados de CA19-9. Asimismo, un nivel bajo de CA19-9 no excluye la posible presencia de un tumor maligno. Por ese motivo, la determinación de CA19-9 no se considera como una prueba de diagnóstico y no es útil para el pesquizado.

Principio del ensayo

Este ensayo utiliza el principio del análisis inmunoradiométrico (IRMA) en fase sólida. Para ello emplea un anticuerpo monoclonal (1116NS19-9*) que reconocen un epítopo repetitivo de la molécula. Dicho anticuerpo se utiliza como anticuerpo "señal" (marcado con radioyodo) y a la vez como anticuerpo "captura" (conjugado a biotina) en un ensayo de dos etapas de incubación.

El inmunocomplejo formado por el antígeno con el anticuerpo "captura" se inmoviliza en la superficie de los tubos de ensayo recubiertos con streptavidina durante un primer paso de incubación de 1 hora bajo agitación constante. Luego se decantan y lavan los tubos para adicionar el anticuerpo "señal", el cual se enlaza al antígeno inmovilizado durante una segunda incubación de 1 hora bajo agitación constante. Después se decantan y lavan los tubos y se mide la radiactividad enlazada en un contador gamma. La radiactividad presente en los tubos es directamente proporcional a la concentración del antígeno. Utilizando calibradores de concentración conocida de CA19-9 se prepara una curva de calibración a partir de la cual se determina por interpolación la concentración de CA19-9 presente en las muestras.

*anticuerpos de Fujirebio Diagnostics Inc. (FDI)

**Contenido del juego**

1. TRAZADOR, 1 frasco (21 mL), listo para usar, contiene < 980 kBq de anti-CA19-9 marcado con ¹²⁵I en solución tampón con 0,1 % Kathon-CG y colorante rojo.

2. ANTISUERO, 1 frasco (11 mL), listo para usar, contiene anti-CA19-9 conjugado a biotina, en solución tampón con 0,1 % Kathon-CG y colorante azul.

3. CALIBRADOR CERO (S0), 2 frascos (2 x 2,5 mL) listos para usar, contienen suero de ratón con 0,1% Kathon-CG y 0,1% de NaN₃.

4. CALIBRADORES (S1-S5), 5 frascos (5 x 1 mL) listos para usar, contienen suero humano con 0,1% de Kathon-CG y 0,1% de NaN₃. Los calibradores contienen: 15-30-60-120-240 U/mL de CA19-9 y están calibrados según el CA19-9 RIA de FDI.

5. SUERO CONTROL, 2 frascos (2 x 1 mL) listos para usar, contienen CA19-9 en suero humano con 0,1% de Kathon-CG y 0,1% NaN₃. El rango de concentración está especificado en el certificado de calidad incluido.

6. SOLUCIÓN DE LAVADO, 1 frasco (20 mL) de solución concentrada. Diluir con 1200 mL de agua destilada. Contiene 0,1 % Kathon-CG.

7. TUBOS RECUBIERTOS: 2x50 (RK-199CT) ó 1x50 (RK-199CT50) tubos de 12x75 mm, empaquetados en cajas plásticas, listos para usar.

Materiales y equipos necesarios

Gradilla para tubos de ensayo, pipeta de precisión con puntas desechables (100 µL), agitador horizontal u orbital, lámina de polietileno, papel absorbente, contador gamma.

Materiales y equipos recomendados:

Pipeta de repetición (100 y 200 µL). Jeringa automática (dispensador) o pipeta de repetición (2 mL) 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 20 semanas. Las muestras congeladas deben descongelarse y mezclarse completamente antes de su uso. Evitar la congelación y descongelación repetida de las muestras. Las muestras hemolizadas, turbias o lipémicas pueden dar resultados falsos, evite su uso. *Las muestras con valores superiores a 240 U/mL deben ser diluidas con el calibrador cero (S0) y reanalizadas. Se recomienda una dilución de 1:10 (450 µL S0 + 50 µL muestra).*

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 1200 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.)

- Rotular los tubos recubiertos por duplicado para los calibradores (S0-S5), controles (CI-CII) y muestras (M). Marcar dos tubos no recubiertos para los totales (T).
- Añadir por duplicado 100 µL de calibrador, suero control y muestras en los tubos apropiados.
- Añadir 100 µL de antisuero en cada tubo (excepto T).
- 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. Agitar 1 hora a temperatura ambiente.
- Añadir 2.0 mL de solución de lavado a cada tubo. Aspirar o decantar el líquido de todos los tubos mediante la inversión de la gradilla. Colocar la gradilla sobre un papel absorbente por 2 minutos manteniendo la posición invertida.
- Repetir el paso 5.
- Añadir 200 µL de trazador en cada tubo.
- Incubar 1 hora en el agitador a temperatura ambiente (igual que en el punto 4).
- Añadir 2.0 mL de solución de lavado a cada tubo. Aspirar o decantar el líquido de todos los tubos mediante la inversión de la gradilla. Colocar la gradilla sobre un papel absorbente por 2 minutos manteniendo la posición invertida.
- Repetir dos veces el procedimiento de lavado según el punto 9.
- Medir la radiactividad de cada tubo por 60 segundos en un contador gamma y calcular la concentración de CA19-9 en las muestras como se describe a continuación.

Tabla 1. Protocolo del ensayo (volúmenes en microlitros)

	T	S0-S5	CI-CII	M
Calibrador		100		
Control			100	
Muestra				100
Antisuero		100	100	100
Agitar 1 hora a temperatura ambiente				
Sol. de lavado		2000	2000	2000
Decantar y secar en papel absorbente				
Repetir el proceso de lavado 1 vez más				
Trazador	200	200	200	200
Agitar 1 hora a temperatura ambiente				
Sol. de lavado		2000	2000	2000
Decantar y secar en papel absorbente				
Repetir el proceso de lavado 2 veces más				
Medir la radiactividad (60 s/tubo)				
Procesar los datos				

Protocolo opcional

Es posible utilizar un tiempo de incubación de 1 hora. La tabla a continuación muestra ejemplos de los resultados (cpm) que se obtienen al utilizar un trazador fresco y uno cerca de la fecha de caducidad.

trazador	en vencimiento		fresco	
	60' + 60'	30' + 30'	60' + 60'	30' + 30'
agitación	60' + 60'	30' + 30'	60' + 60'	30' + 30'
T	205625	203818	383994	392467
S0	202	148	181	136
S1	929	758	1975	1570
S2	2424	1949	5374	4418
S3	5007	4139	11343	9542
S4	10711	8409	23700	19947
S5	19766	15966	46117	37960

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:

$$B/T (\%) = \frac{S1-5/Mx/(\text{cpm}) - S0(\text{cpm})}{T(\text{cpm})} \times 100$$

Construir una curva estándar planteando las medias de cpm o, alternativamente, los valores B/T% contra la concentración de CA19-9 de cada calibrador.

Determinar la concentración de CA19-9 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	Media cpm	B/T%	CA19-9 U/mL
T	251 744		
S0	475	0,2	
S1	1 781	0,7	
S2	3 685	1,5	
S3	7 721	3,1	
S4	15 077	6,0	
S5	29 361	11,7	
CI	4 921	2,0	39,3
CII	10 062	4,0	78,3

Características del ensayo

Especificidad

Los anticuerpos monoclonales utilizados en este ensayo garantizan la medición específica del CA19-9.

Sensibilidad

La sensibilidad analítica es de 0,3 U/mL, calculada como la concentración correspondiente al valor de enlace medio más dos desviaciones estándar, para 20 réplicas del calibrador de concentración cero y determinada utilizando trazador fresco.

Los Límites del Blanco (LoB) y de Detección (LoD) fueron determinados según la guía del CLSI, documento EP17.

LoB = 0,94 U/mL.

LoD = 1,85 U/mL, determinado con proporción de falsos positivos y falsos negativos menor que 5%, basado en 120 determinaciones, con 4 muestras blanco y 5 muestras de baja concentración.

Precisión

La precisión intra-ensayo se determinó a partir de 20 réplicas de 3 muestras, medidas en una serie. Para determinar la precisión inter-ensayo se midieron por duplicado 3 muestras, en 65 series independientes. Los resultados se muestran a continuación.

Intra-ensayo		Inter-ensayo	
Media (U/mL)	CV%	Media (U/mL)	CV%
2,15	8,5	2,15	15,6
36,5	6,1	35,7	6,2
216,4	2,0	194,3	5,4

Prueba de dilución (linealidad)

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

$$Y = 0.9723X - 1.57 \quad R^2 = 0.9963 \quad n = 15$$

Prueba de recuperación

La recuperación se determinó como la diferencia porcentual entre el incremento observado y el incremento esperado, luego de añadir cantidades conocidas (a 3 niveles) de CA19-9 a 6 muestras de suero diferentes. La recuperación media obtenida fue de 94,4%, con un rango del 86,7% al 101,1%.

Efecto Hook

No se observa efecto Hook con el uso del presente producto en concentraciones de CA19-9 hasta 1 500 000 U/mL.

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 muestras de suero de donantes de sangre, presumiblemente sanos, con los siguientes resultados:

Número de muestras	494
Muestras con 0 U/mL	39
Media (U/mL)	4.87
Mediana (U/mL)	3.22
Muestras < 37 U/mL	493

Notas acerca del procedimiento

- El no respeto de las instrucciones del presente inserto puede afectar los resultados significativamente.
- No se deben mezclar los componentes de lotes diferentes o con productos de otro fabricante.
- 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.

Limitaciones del procedimiento

- La determinación del CA19-9 no debe utilizarse como un test de pesquijaje.
- En algunos individuos sanos y pacientes con enfermedades no malignas se pueden encontrar valores de CA19-9 iguales o superiores a 37 U/mL.
- Los valores de CA19-9 inferiores a 37 U/mL no indican la ausencia de cáncer residual.
- Los resultados deben interpretarse a la luz del cuadro clínico total del paciente, incluyendo su historia clínica y los datos de otras pruebas diagnósticas adicionales.
- Las muestras de pacientes que han recibido inmunoglobulinas de ratón con objetivo diagnóstico o terapéutico pueden contener anticuerpos humanos anti-ratón (HAMA), cuya interferencia puede ocasionar resultados erróneos.

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 preservativo. 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 12 mg de azida sódica. Algunos componentes contienen Kathon-CG, el cual es altamente tóxico. Este producto contiene 65 mg de Kathon-CG.



Fecha de vencimiento

LOT

Número de lote



8°C

Almacenar entre 2 y 8 °C

CONTROL

Suero Control



Precaución

CAL

Calibrador



Peligro biológico

CT

Tubos recubiertos



Consulte las instrucciones

TRAC

Trazador



Dispositivo para diagnóstico in vitro

WASHB

Tampón de lavado



Fabricante



Material radiactivo



Número de referencia

AS

Antisuero



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

E-mail técnico: immuno@izotop.hu

E-mail comercial: commerce@izotop.hu

IZOTOP

INSTITUTE OF ISOTOPES CO. LTD.

H-1121 Budapest, Konkoly Thege M. út 29-33.

☒ H-1535 Budapest, P.O.B. 851 Hungary

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

Nota legal

CA19-9™ es una marca registrada de Fujirebio Diagnostics Inc. (FDI). El presente ensayo de CA19-9 IRMA está basado en el uso del anticuerpo monoclonal 1116NS19-9, el cual solo puede ser adquirido a través de FDI y sus distribuidores autorizados.

Literatura

Ver sitio web: www.izotop.hu