

CYFRA 21.1 [I-125] IRMA KIT

Código RK-211CT (RK-211CT50).
Estuche para 100 (50) determinaciones.

Análisis inmunoradiométrico para la determinación cuantitativa *in vitro* de fragmentos de Citoqueratina 19 en suero humano, en el rango de 0-60 ng/mL.

Introducción

La Citoqueratina 19 es una proteína de 40 kDa de peso molecular, miembro de una familia de más de 20 polipéptidos diferentes (citoqueratinas) que conforman la estructura del filamento intermedio de las células epiteliales. Las citoqueratinas son poco solubles pero luego de la degradación proteolítica se forman fragmentos solubles que pasan a los fluidos corporales.

El CYFRA 21.1 IRMA es un inmunoensayo para la determinación de fragmentos de Citoqueratina 19 en suero humano que está basada en el uso de dos anticuerpos monoclonales (BM 19.21* y KS 19.1*), los cuales reconocen dos epítopes diferentes de la molécula.

El CYFRA 21.1 es un marcador de utilidad para el cáncer de pulmón de células no pequeñas, particularmente para el carcinoma de células escamosas. Se pueden observar además niveles elevados en otras neoplasias, como el cáncer de vejiga músculo-invasivo. Valores ligeramente elevados pueden presentarse también en hepatopatías benignas y en la insuficiencia renal.

El ensayo de CYFRA21.1 no es útil para el pesquijaje del cáncer de pulmón. Su determinación puede ser relevante para definir el pronóstico, el subsiguiente control de la terapia y el monitoreo del curso de la enfermedad.

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: un anticuerpo "señal" marcado con radioyodo (BM19.21*) y otro, conjugado a biotina, funciona como anticuerpo "captura" (KS19.1*).

El inmunocomplejo formado por el antígeno con los dos anticuerpos se inmoviliza en la superficie de los tubos de ensayo recubiertos con streptavidina durante un período de incubación de 18-22 horas en frío. 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 CYFRA21.1 se prepara una curva de calibración a partir de la cual se determina por interpolación la concentración de CYFRA21.1 presente en las muestras.

*anticuerpos de Fujirebio Diagnostics Inc.

**Contenido del juego**

1. TRAZADOR, 1 frasco (11 mL), listo para usar, contiene < 980 kBq de anti-CYFRA21.1 marcado con ¹²⁵I y anti-CYFRA21.1 biotinilado en solución tampón con 0,1 % NaN₃ y colorante rojo.

2. DILUENTE (DIL), 1 frasco (10 mL) listo para usar, contiene suero equino y 0,1% de NaN₃.

3. CALIBRADORES (S0-S5), 6 frascos (6 x 1 mL), contienen CYFRA21.1 en suero equino liofilizado con 0,1% Kathon-CG. La concentración se especifica en el certificado de calidad incluido. *La calibración de este ensayo se realizó utilizando como referencia el sistema Fujirebio Diagnostics Inc. CYFRA21.1 RIA.*

4. SUEROS CONTROL, 2 frascos (2 x 1 mL), contienen CYFRA21.1 en suero humano liofilizado con 0,1% Kathon-CG. El rango de concentración está especificado en el certificado de calidad incluido.

5. SOLUCIÓN DE LAVADO, 1 frasco (20 mL). Solución concentrada a diluir con 700 mL de agua destilada. Contiene 0,2 % NaN₃.

6. TUBOS RECUBIERTOS: 2x50 (RK-211CT) ó 1x50 (RK-211CT50) 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), lámina de polietileno, papel absorbente, contador gamma.

Materiales y equipos recomendados:

Pipeta de repetición (100 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.

No se deben agitar las muestras en vórtex!

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 60 ng/mL deben ser diluidas con el diluyente y reanalizadas. Se recomienda una dilución de 1:10 (450 µL DIL + 50 µL muestra).

Preparación y conservación de los reactivos

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.

Los calibradores y controles se reconstituyen con 1 mL de agua destilada. Para ello se debe mezclar suavemente evitando la formación de

espuma. Permitir que la solución alcance la temperatura ambiente (20 a 30 °C) antes de su uso. Para usos posteriores alicuotar y conservar por debajo de -20 °C hasta la fecha de vencimiento.

Conservar los demás reactivos entre 2 y 8 °C después de abiertos. A esta temperatura cada componente es estable hasta la fecha de vencimiento del juego.

Procedimiento para el ensayo

(Ver Tabla 1.)

1. Marcar los tubos recubiertos por duplicado para la actividad total (T), calibradores (S0-S5), controles (CI-CII) y muestras (M).
2. Añadir por duplicado 100 µL de calibrador, suero control y muestras en los tubos apropiados, cuidando de no arañar el fondo del tubo.
3. Añadir 100 µL de trazador en cada tubo.
4. Cubrir los tubos con una lámina de polietileno. Incubar durante 20 ± 2 horas a una temperatura entre 2 y 8 °C.
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 CYFRA 21.1 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
Trazador	100	100	100	100
Incubar 18-22 horas a 2 – 8 °C				
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:

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

Construir una curva estándar ploteando las medias de cpm o, alternativamente, los valores B/T% contra la concentración de CYFRA21.1 de cada calibrador.

Determinar la concentración de CYFRA21.1 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%	CYFRA 21.1 ng/mL
T	304068		
S0	812	0,3	0
S1	4026	1,3	1,1
S2	10446	3,4	4,7
S3	25735	8,5	13
S4	52315	17,2	27
S5	99240	32,6	54
CI	11438	3,8	5,3
CII	31914	10,5	16,3

Características del ensayo

Especificidad

Los anticuerpos monoclonales utilizados en este ensayo garantizan la medición específica de CYFRA21.1.

Sensibilidad

En base a 120 determinaciones (60 de calibrador cero y 60 de muestras con baja concentración) y con un 95% de probabilidad, los límites de medición son:

Límite del Blanco (LoB): 0,035 ng/mL

Límite de Detección (LoD): 0,24 ng/mL

Para resultados por debajo del LoB, se debe reportar como "analito no detectado" y para resultados entre el LoB y el LoD se debe reportar "analito detectado, concentración menor que 0,24 ng/mL".

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 12 series independientes. Los valores obtenidos se muestran a continuación.

Intra-ensayo		Inter-ensayo	
Media (ng/mL)	CV%	Media (ng/mL)	CV%
1,11	4,16	1,31	9,25
4,37	7,48	5,52	8,77
21,27	7,05	26,3	6,98

Prueba de dilución (linealidad)

Se diluyeron al 1:10 cinco muestras de alta concentración (40 - 60 ng/mL), utilizando el diluyente incluido y fueron sometidas a ensayo. Se obtuvieron los siguientes resultados, expresados como el porcentaje de la concentración medida sobre la esperada: 91,9%, 87,5%, 85,6%, 93,5% y 99,6%, respectivamente.

Prueba de recuperación

La recuperación se determinó como la diferencia porcentual entre el incremento observado y el incremento esperado, luego de añadir una cantidad conocida de CYFRA21.1 a 5 muestras de suero diferentes. La recuperación media obtenida fue de 109,8%, con un rango del 97% al 121%.

Efecto Hook

No se observa efecto Hook con el uso del presente producto en concentraciones de CYFRA21.1 hasta 400 ng/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 200 muestras de suero de donantes de sangre (100 hombres y 100 mujeres), presumiblemente sanos. El 100% de las muestras tuvo una concentración menor que 2 ng/mL.

Notas acerca del procedimiento

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

Limitaciones del procedimiento

- La determinación de CYFRA21.1 no debe utilizarse como un test de pesquizado.
- En algunos individuos sanos y pacientes con enfermedades no malignas se pueden encontrar valores de CYFRA21.1 iguales o superiores a 2 ng/mL.
- Los valores de CYFRA21.1 inferiores a 2 ng/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 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 61 mg de azida sódica. Algunos componentes contienen Kathon-CG, el cual es altamente tóxico. Este producto contiene 8 mg de Kathon-CG.

	Fecha de vencimiento	LOT	Número de lote
	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 <i>in vitro</i>	WASHB	Tampón de lavado
	Fabricante		Material radiactivo
REF	Número de referencia	DIL	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

Nota legal

CYFRA21.1™ es una marca registrada de Fujirebio Diagnostics Inc. (FDI). El presente ensayo de CYFRA21.1 IRMA está basado en el uso de los anticuerpos monoclonales BM19.21 y KS19.1, los cuales solo pueden ser adquiridos a través de FDI y sus distribuidores autorizados.

Literatura

Ver sitio web: www.izotop.hu