

Immunoensayo de la Enzima para la Determinación Cuantitativa del Antígeno de Cáncer Ovárico CA-125 en Suero Humano

Solo para diagnóstico In Vitro

Para uso exclusivo en laboratorios clínicos o de gabinete

Conservar entre 2°C a 8°C

INTRODUCCIÓN

El equipo de Inmuno ensayo Antígeno Cáncer Ovárico CA-125 tiene como finalidad primaria el monitoreo como una prueba de evaluación. En resultados anormales (por ejemplo suero con niveles elevados de CA-125) puede indicar cáncer ovárico y sugiere la necesidad de un estudio más profundo. El CA-125 parece ser un buen marcador tumoral en pacientes con remisión clínica siguiendo un tratamiento. Los valores post-operarios de CA-125 que fallan y no regresan a valores normales, sugieren fuertemente la presencia de tumor residual. Los tumores recurrentes son frecuentemente acompañados por un incremento en niveles de CA-125 antes que una enfermedad progresiva sea clínicamente evidente.

Una de cada 70 mujeres americanas desarrolla cáncer ovárico en su vida. Se estima que hay aproximadamente 20,000 nuevos casos en casos en cáncer ovárico diagnosticada cada año y más de 12,000 mujeres mueren cada año por esa causa. El cáncer ovárico es el más maligno de los cánceres ginecológicos con una tasa de supervivencia de tan solo 30% a lo largo de 5 años. Lo anterior es debido a que no es diagnosticado hasta una fase muy avanzada. El CA125 es un antígeno superficie asociado con cáncer ovárico epitelial. En suero, el CA-125 está asociado con un peso molecular mayor a la glicoproteína. Las concentraciones de suero de este marcador tumoral pueden ser detectadas y medidas con un anticuerpo monoclonal. Estudios publicados han indicado que niveles elevados de CA-125 pueden ser encontrados en individuos con problemas serios endometriales, ciertos males no ginecólogos y algunas condiciones no malignas.

La concentración en suero de CA-125 es mayor a 35 unidades por ml en aproximadamente el 60% de mujeres con cáncer ovárico. Más del 80% de los pacientes que tienen cáncer ovárico diseminado tienen concentraciones de suero CA-125 mayores a 35 U/mL. En suero CA-125 es elevado en 1% por arriba de las mujeres normales, 3% de las mujeres sanas con indicios de problemas ováricos, 6% de pacientes con condiciones No neoplásticas (incluido pero no limitado para el primer trimestre de embarazo, menstruación, endometriosis, fibrosis uterinas, salpingitis aguda, enfermedades hepáticas e inflamación del peritoneo pericardio o pleura). Niveles en suero de CA-125 mayores a 35 U/mL combinado con un examen pélvico incrementan la especificidad. Determinaciones seriales de CA-125 incrementan la posibilidad de predicción del problema. Las concentraciones de CA-125 pueden ser asociadas con aumento progresivo del problema y pobre respuesta terapéutica. Por otra parte una disminución de los niveles puede ser interpretada como un aspecto favorable al tratamiento. En el 95% de los casos se confirma reincidencia de los pacientes con niveles por arriba de 35 unidades por ml. Sin embargo los resultados negativos no necesariamente excluyen el problema. Actualmente CA-125 es el marcador residual más sensible de cáncer ovárico epitelial. CA-125 puede ser también elevado en pacientes con cáncer cervical, uterino en el tubo falopiano o con endometriosis.

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

El kit de la prueba cuantitativa de CA-125 se basa en un ensayo inmunoenzimático de fase sólida. El sistema de ensayo utiliza un anticuerpo monoclonal de anti-CA-125 para la inmovilización de la fase sólida (pocillos) y otro anticuerpo monoclonal anti-CA-125 en la solución de conjugado anticuerpo-enzima (peroxidasa de rábano). El estándar y el espécimen de prueba (suero) se añaden a los pocillos de microtitulación recubiertos de anticuerpos de CA-125. Se añade el anticuerpo de CA-125 con peroxidasa (Conjugado). Si CA-125 está presente en la muestra se combinará con el anticuerpo en el pozo y el conjugado de la enzima, dando lugar a moléculas de CA-125 intercaladas entre la fase sólida y los anticuerpos ligados a enzima. Después de 3 horas de incubación a 37°C, los pocillos se lavan para remover los anticuerpos etiquetados no unidos. Una solución de TMB se agrega e incuba durante 20 minutos, dando por resultado el desarrollo de un color azul. El desarrollo de color se detiene con la adición de HCl 2N. El color cambia a amarillo y medido espectrofotométricamente a 450 nm. La concentración de CA-125 es directamente proporcional a la intensidad de color encontrado en la muestra.

REACTIVOS

Materiales abastecidos con el equipo de prueba

1. Tiras con micropozos cubiertos de anticuerpos monoclonales Anti-CA125. 12x8.
2. Reactivo de enzima conjugada. 1 Frasco.
3. Estándares de referencia 0, 15, 50, 100, 200 y 400 U/mL de antígeno CA-125. 1 Vial c/u.
4. Concentrado de búfer de Lavado (50x). 1 Frasco.
5. Reactivo TMB (un paso). 1 Frasco.
6. Solución de Paro (1N HCl). 1 Frasco.

Materiales requeridos pero no abastecidos

1. Pipetas de precisión 40µL - 200µL, 200µL - 1000µL.
2. Puntas para pipetas desechables.
3. Agua destilada o desionizada.
4. Mezclador Vórtex o equivalente.
5. Papel absorbente o toalla de papel.
6. Papel cuadriculado.
7. Un lector de MicroElisa.

RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DEL ESPÉCIMEN

1. El suero de la muestra debe prepararse de sangre total obtenida por técnicas médicas aceptables. Evite el uso de muestras lipémicas, hemolizadas o turbias. .
2. Las muestras deberán ser tapadas y almacenadas hasta por 48 horas entre 2-8°C antes de su uso. En caso de que dicho lapso se prolongue, deberán ser congeladas a -20°C. Mezcle las muestras reconstituidas antes de su uso

ALMACENAMIENTO DEL EQUIPO DE PRUEBA E INSTRUMENTACIÓN

1. Los equipos de prueba sin abrir deben ser almacenados de 2-8°C al ser recibidos y la microplaca debe ser guardada en una bolsa sellada con desecantes para minimizar la exposición a la humedad del aire. El kit de prueba puede ser usado a lo largo de la fecha de



"Rápida solución a tus necesidades clínicas"

Distribuido por:

DIAGNÓSTICA INTERNACIONAL S.A. de C.V.
Rudyard Kipling 4886 Col. Jardines de la Patria
CP 45110 Zapopan, Jalisco, México

Lada sin costo: 01 800 440 0404 c/ 10 líneas

Tel: 01 (33) 3770 1940 c/ 10 líneas

caducidad del kit. Consulte la etiqueta del envase la fecha de vencimiento.

- Los equipos de prueba abiertos permanecerán estables hasta su fecha de caducidad, siempre y cuando sean almacenados como se describió anteriormente.
- Un lector de placa de MicroElisa con una amplitud de banda de 10 nm o menor y un rango de densidad óptica de 0-2 DO (densidad óptica) o mayor a una longitud de onda de 450 nm es aceptable para su uso en la medición de absorbancia.

PREPARACIÓN DE REACTIVO

- Todos los reactivos deben estar a temperatura ambiente (18 a 25°C) y mezcle gentilmente antes de su uso. No produzca burbujas.
- Si los estándares se encuentran liofilizados, reconstituir cada estándar con 0.5 mL de agua destilada. Después de la reconstitución dejar reposar por 20 minutos. Estándares reconstituidos deben ser almacenados entre 2-8°C.
- Solución de lavado (1X). Diluir un volumen de solución de lavado concentrado (50X) en 49 volúmenes de agua destiladas. Por ejemplo, diluir 15 mL de solución de lavado concentrado (50X) en 735 mL de agua destilada para preparar 750 mL de solución de lavado (1x). Mezcle bien antes de su uso.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

- Asegure el número necesario de pozos cubiertos en el sujetador. Deposite 50 µL de estándares de CA-125, muestras y controles, dentro de los pozos apropiados. Mezcle cuidadosamente por 10 segundos.
- Deposite 100µL del Reactivo de enzima conjugada dentro de cada pozo. Mezcle cuidadosamente durante 30 segundos. Es muy importante tener una mezcla completa en este paso. Incube a 37° C durante 3 horas.
- Preparar sustrato TMB 15 minutos antes de su uso.
- Remueva la mezcla de la incubación vaciando el contenido de la placa en un contenedor para desechos. Enjuague y vacíe la microplaca 5 veces con el buffer de lavado (1X) (*Por favor, vea la sección "Preparación del Reactivo"*). Golpee la microplaca firmemente hacia el papel absorbente o toallas del papel para quitar todas las gotas de agua residuales.
- Agregue 100µL de Reactivo de TMB en cada uno de los pozos. Mezcle cuidadosamente durante 10 segundos. Incube a temperatura ambiente y en la oscuridad durante 20 minutos.
- Detenga la reacción agregando 100µL de Solución de paro a cada uno de los pozos. Mezcle cuidadosamente durante 10 segundos.
- Lea la densidad óptica a 450nm con un lector de micropozos dentro de un lapso de 15 minutos.

Nota Importante:

- El procedimiento de los lavados es crítico. Un lavado insuficiente puede brindar una pobre precisión y un falso incremento en las lecturas de absorbancia.
- Se recomienda no procesar mas de 32 pozos por ensayo ya que el procedimiento de pipeteo manual puede durar mucho y desestabilizar la concentración de los estándares, muestras y controles deben ser completados en cinco minutos. Si utiliza los 96 micro pozos se recomienda un pipeteo automatizado.
- La duplicación de los estándares no se requiere aunque se recomienda.

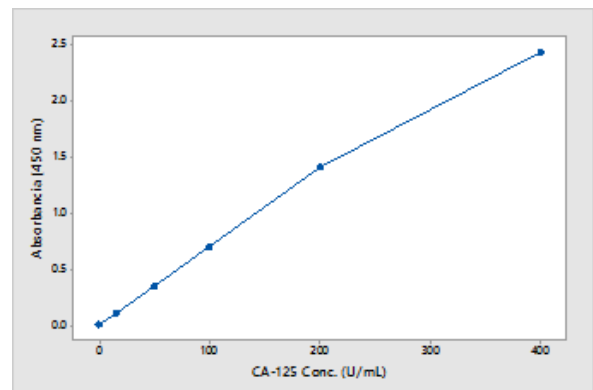
CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

Calcule el promedio de los valores de absorbancia (A_{450}) para cada juego de estándares de referencia, control y muestras. Construya una curva estándar trazando la absorbancia media obtenida para cada referencia estándar contra su concentración en U/mL en el papel para graficar linealmente, con la absorbancia en el eje vertical (Y) y la concentración en el eje horizontal (X). Usando la absorbancia media como valor para cada muestra, determine la concentración correspondiente de CA-125 en U/mL para cada curva estándar.

EJEMPLO DE CURVA ESTÁNDAR

Resultados de una corrida estándar típica con lecturas de densidad óptica a 450 nm mostradas en el eje Y contra las concentraciones de CA-125 mostradas en el eje X. **Nota: Esta curva estándar es con el propósito de ilustrar solamente, y no debe ser utilizada para hacer cálculos desconocidos. Cada laboratorio debe obtener sus propios datos y curva estándar en cada experimento.**

CA-125 (U/mL)	Absorbancia (450 nm)
0	0.010
15	0.105
50	0.347
100	0.703
200	1.411
400	2.437



VALORES Y SENSIBILIDAD ESPERADOS

Se espera que en mujeres saludables se obtengan valores de la prueba de CA-125 por debajo de 35 U/mL. La concentración perceptible mínima de CA-125 en esta prueba es estimada en 5 U/mL.

REFERENCIAS

- Kenemans P. Yedema CA Bon GG, von Mensdorff-Pouilly S. CA 125 in Gynecological pathology a review. *Eur Obstet Gynecol.* 1992; 49:115-124.
- Sakesla F. Pronogostic markers in epithelial ovarian cancer. *Intl J. Gynecol Pathol* 1993; 12:156-161.
- Farghaly SA Tumor markers in Gynecologic cancer. *Gynecol and Obstet Invest* 1992; 34:65-72