

Inmunoensayo de la Enzima para la Determinación del Antígeno de Cáncer de Mama CA-15-3

Solo para diagnóstico In Vitro
Para uso exclusivo en Laboratorios Clínicos o de Gabinetes
Conservar entre 2°C a 8°C

NOMBRES COMUNES Y DE PROPIEDAD

Inmunoensayo de la Enzima de CA-15-3

USO DESTINADO

Para la determinación cuantitativa del antígeno de cáncer de mama CA-15-3 en suero humano.

INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama es la lesión maligna más común que amenaza la vida en las mujeres de muchos de los países con mayor desarrollo actualmente, con aproximadamente 180,000 nuevos casos diagnosticados cada año. Aproximadamente la mitad de estos pacientes recientemente diagnosticados son nodo-negativo, sin embargo 30% de estos casos progresan a enfermedad metastásica. Hay varios marcadores tumorales que pueden ayudar a los médicos a identificar y diagnosticar si los pacientes de cáncer de mama tendrán la enfermedad agresiva y si tendrá un curso indolente. Estos marcadores incluyen receptores de estrógeno y de la progesterona, DNA ploidía y un perfil de porcentaje de células en fase-S, el receptor del factor de crecimiento epitelial, el oncogén Her-2/neu, el p53 tumor supresor del gen, el cathepsin D, proliferación de marcadores y CA-15-3. El CA-15-3 es el marcador más usado para monitorear a los pacientes post-operativamente por recurrencia, particularmente en enfermedades metastásicas. Aproximadamente un 96% de pacientes con la repetición local y sistémica tiene elevado el CA-15-3, que puede usarse para predecir la repetición temprana, antes que el criterio radiológico y clínico. Un 25% de aumento en el suero de CA-15-3 es asociado con la progresión de carcinoma. Un 50% de disminución en el suero CA-15-3 es asociado con la respuesta del tratamiento. CA-15-3 es más sensible que CEA en el descubrimiento temprano de la repetición de cáncer de mama. En combinación con CA-12-5, CA-15-3 se ha mostrado muy útil en el descubrimiento temprano de la recaída de cáncer ovárico. También se aumentan los niveles de CA-15-3 en el cáncer de colon, pulmón y tumores hepáticos.

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

El ensayo Cancer Antigen Control CA-15-3 es de 2 sitios, fase sólida e inmuno enzimática. Las moléculas de CA-15-3 son del tipo "Sándwich" entre dos anticuerpos monoclonales. Uno teñido en la parte inferior de los pocillos en la placa que se ensambla al micro lector y la otra puentando al rábano picante peroxidasa (enzima conjugada) después de la incubación y el lavado. Esta enzima reacciona desarrollando una coloración que es proporcional al aumento de moléculas de CA-15-3 presentes en el ensayo.

REACTIVOS

Materiales abastecidos con el equipo de prueba:

1. Placa de microtira revestida de Anticuerpo Monoclonal Murino Anti CA-19-9 con 96 pozos
2. Diluyente para muestras. 1 Frasco
3. Enzima conjugada
4. Estándares de referencia CA-15-3 (forma líquida, lista para su uso o liofilizados).
5. Concentrado de Buffer de Lavado. 1 Frasco
6. Reactivo TMB (un paso). 1 Frasco
7. Solución de paro (1N HCl). 1 Frasco

Materiales requeridos pero no abastecidos

1. Pipetas de precisión 100 µL, 200 µL, 1.0 mL y 5.0 mL
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 DE MUESTRAS

1. La sangre debe ser extraída usando técnicas estándar de venopunción y el suero debe ser separado de los glóbulos rojos tan pronto como sea posible. Evitar muestras que presenten en gran medida hemólisis, lipemia o turbidez.
2. No utilice muestras de plasma que contengan como anticoagulante EDTA, Heparina u oxalato ya que puede interferir con el procedimiento de la prueba.
3. Los especímenes pueden ser almacenados por 48 hrs. entre 2-8 °C previos al ensayo. Los especímenes retenidos durante un tiempo más largo se pueden congelar a -20°C durante 6 meses antes del ensayo. Las muestras descongeladas se deben invertir varias veces para mezclar antes de la prueba.

ALMACENAMIENTO DE EQUIPO DE PRUEBA E INSTRUMENTACIÓN

1. Los equipos de la prueba sin abrir deben guardarse de 2 a 8 °C desde que son recibidos y la placa debe guardarse en una bolsa sellada con los secantes para minimizar la exposición a la humedad del aire. El kit de prueba puede ser utilizado durante toda la fecha de vencimiento del kit. Consulte la etiqueta para la fecha de caducidad.
2. Los equipos de prueba abiertos permanecerán estables hasta la fecha de expiración mostrada, siempre y cuando se almacenen como se describió anteriormente.
3. Un lector de micro pozos con una ancho de banda de 10 nm o menor y un rango de densidad óptica de 0-2 D.O. o mayor a 450 nm de longitud de onda, es aceptable para el uso en la medición de la absorbancia.

PREPARACIÓN DE REACTIVO

1. Todos los reactivos deben estar a temperatura ambiente (18-25 °C) antes de su uso. Todos los reactivos deben ser mezclados gentilmente por inversión o remolino. Evite la formación de burbujas.
2. En caso de que Los estándares se encuentren liofilizados, reconstituir con 0.5 mL de agua destilada. Después de reconstituidos deje



"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

en reposo por 20 minutos. Los estándares reconstituidos deben almacenarse entre 2-8°C.

3. Diluir un volumen de búfer de lavado concentrado (50x) en 49 volúmenes de agua destilada. Por ejemplo, diluir 15 mL de búfer de lavado concentrado (50x) en agua destilada para preparar un volumen final de 750 mL de búfer de lavado (1x). Mezcle bien antes de su uso.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

Los estándares CA-15-3 ya han sido prediluidos y están listos para su uso. Por favor no diluya de nuevo.

1. El suero del paciente y el control del suero deben diluirse 51 veces, antes del uso. Prepare una serie de tubos pequeños (Como los tubos de micro centrifugación de 1.5 mL) y mezcle 20µL de suero con 1.0 mL del diluyente de la muestra.
2. Asegure el número necesario de pozos cubiertos en el soporte. Agregue 100µL de estándares de CA-15-3, muestras y controles diluidos, dentro de los pozos apropiados. Mezcle cuidadosamente durante 10 segundos.
3. Incube a 37° C durante 1 hora.
4. Remueva la mezcla de la incubación vaciándola en un recipiente para desechos. Enjuague y vacíe la placa con los micropozos 5 veces con buffer de lavado (1x). Golpee suavemente la placa de los micropozos hacia el papel absorbente o toallas del papel para quitar todas las gotas de agua residuales.
5. Agregue 100µL del reactivo de enzima conjugada en cada uno de los pozos. Mezcle cuidadosamente durante 10 segundos.
6. Incube a 37° C durante 1 hora.
7. Remueva el contenido de la placa y lávese como está descrito anteriormente en el paso 4.
8. Agregue 100µL de Reactivo de TMB en cada uno de los pozos. Mezcle cuidadosamente durante 10 segundos.
9. Incube a temperatura ambiente en la oscuridad durante 20 minutos.
10. Detenga la reacción agregando 100µL de solución de paro a cada uno de los pozos. Mezcle cuidadosamente durante 10 segundos. *Es importante asegurarse que los cambios del color azul se den a amarillo completamente.*
11. Lea la densidad óptica a 450nm con un lector de micro pozos en un plazo 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

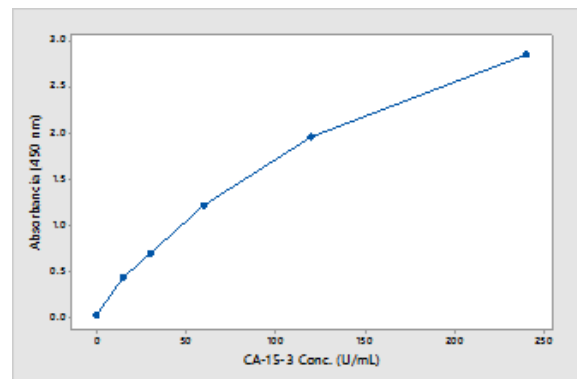
Calcule el promedio de los valores de absorbancia (A450) para cada juego de estándares de referencia, control y muestras. Construya una curva estándar trazando la absorbancia media obtenida para cada referencia estándar contra su concentración en U/mL en el papel para graficar linealmente, con la absorbancia 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 Cancer Antigen Control CA-15-3 en U/mL para cada curva estándar. Recuerde que los

estándares se han diluido 51 veces, no es necesario que las muestras o controles se multipliquen por el factor de dilución.

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-15-3 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-15-3 (U/mL)	Absorbancia (450 nm)
0	0.021
15	0.425
30	0.693
60	1.214
120	1.956
240	2.845



VALORES ESPERADOS Y SENSIBILIDAD

En mujeres sanas se espera que Los valores del ensayo de CA-15-3 estén por debajo de 35 U/mL. La concentración mínima detectable de CA -15-3 en el ensayo se estimó en 5 U/mL.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

1. Obtención de resultados confiables se reproducen cuando el procedimiento de la prueba se lleva a cabo con una comprensión completa de las instrucciones de la ficha técnica provista en el equipo y con la adhesión a las buenas prácticas del laboratorio.
2. El procedimiento del lavado es crítico. Un lavado insuficiente producirá pobreza en precisión y lecturas falsas y elevadas de absorbancia.
3. Las muestras de suero que contengan lipemia, hemólisis o turbidez no deberán ser usadas en esta prueba.
4. Los resultados obtenidos con el uso de este equipo, deben ser usados solamente como un adjunto a otros procedimientos de diagnóstico e información disponible al médico.

REFERENCIAS

1. Aziz DC. Quantitation of estrogen and progesterone receptors by immunocytochemical and image analyses. *A J Clin Pathol* 1992;98:105-11
2. Aziz DC, Peter JB. DNA ploidy and cell-cycle analysis. Tools for assessment of cancer prognosis. *J Clin Pathol* 1991;5:422-38.
3. Clark GM, Dressler LG, Owens MA, Dounds G, Oldaker T, McGuire WL. Prediction of relapse or survival in patients with node-negative breast cancer by

DNA flow cytometry. *N Engl J Med* 1989;320:627-33.

4. Elledge RM, McGuire WL. Prognostic factors and therapeutic decisions in axillary node-negative breast cancer. *Annu Rev Med* 1993;44:201-10.
5. Foekens JA, Rio C, Seguin P, et al. Prediction of relapse and survival in breast cancer patients by pS2 protein. *Cancer Res* 1990; 50:3832-7.
6. Isola J, Visakorpi T, Holli K, Kallioniemi D. Association of p53 expression with other prognostic factors and long term survival in node-negative breast cancer. *J Cell Biochem* 1992;(Suppl 16D):101.
7. Kute TE, Shao ZM, Snugg NK, Long RT, Russell GB, Case LD. Cathepsin D as a prognostic indicator for node-negative breast cancer patients using both immunoassays and enzymatic assays. *Cancer Res* 1992;52:198-203.
8. McGuire WL, Tandon AK, Allred D, Chamnes GC, Clark GM. How to use prognostic factors in axillary node negative breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 1990;82:1006-7.
9. Nicholson S, Richard J, Sainsbury C, et al. Epidermal growth factor receptor (EGFr): results of a 6 year follow up study in operable breast cancer with emphasis on the node-negative subgroup. *Br J Cancer* 1991;63:146-50.
10. Somerville JE, Clarke LA, Biggart JD. C-erb B-2 overexpression and histological type of in-situ and invasive breast carcinoma. *J Clin Pathol* 1992;45:16-20.
11. Ueronese S, Gambacorta M. Detection of Ki-67 rate in breast cancer. *Am J Clin Pathol* 1991;95:30-4.
12. Lotnick M, Pavesi F, Scarabelli M. Tumor associated antigens CA15-3 and CA125 in ovarian cancer. *Int. J. Biolog Markers* 1991; 6:115

Diagnóstica
Internacional



"Rápida solución a tus necesidades clínicas"

FABRICADO POR:
INTERNATIONAL IMMUNO-DIAGNOSTICS
1155 CHESS DRIVE No. 121
FOSTER CITY, CA 94404 USA