

INDICACIONES DE USO

Inmunoensayo enzimático cualitativo para la determinación del marcador tumoral CA 15-3 como ayuda en el diagnóstico y monitoreo de cáncer de mama. Agente de diagnóstico *in vitro*, para uso exclusivo de laboratorio clínico o de gabinete.

RESUMEN Y APLICACIÓN

El cáncer de mama es más común en mujeres con lesión maligna con tajeamiento *in vivo*. En países en vías de desarrollo aproximadamente 180,000 nuevos casos son diagnosticados por año. Aproximadamente esta medida recientemente diagnosticada en pacientes es negativa, sin embargo 30% de los casos progresan con enfermedad metastásica. Este número de marcador tumoral es auxiliar en la identificación clínica y diagnóstico para el cáncer de mama en pacientes con una enfermedad agresiva y con una progresión indolora. Estos marcadores incluyen estrógenos y receptores de progesterona. DNA Ploidy y un por ciento-s en la fase perfil. El aumento en el factor receptor epidermal, HER-2/neu oncogén p53 gen supresor tumoral. Cathepsin D marcador de proliferación y CA15-3. El CA15-3 es muy utilizado para monitoreo en pacientes pos operatorios por la recurrencia particular en diseminación tumoral por metástasis. 96% en recurrencia local y sistémica tienen elevado el antígeno CA15-3. Esto puede ser usado para predeterminar la recurrencia tempranamente con diagnóstico radiológico y clínico. El 25% de incremento en el suero de CA 15-3 se asocia con la progresión del carcinoma. El 50% de disminución en suero de CA 15-3 se asocia con la respuesta del tratamiento. El CA 15-3 es más sensible que el marcador CEA y detecta tempranamente la recurrencia del cáncer de mama. En combinación con el CA-125, el CA15-3 puede mostrar en su uso la detección temprana de relapso de cáncer ovárico. El CA 15-3 puede incrementarse en la presencia de tumores de colon y hepáticos.

DESCRIPCION

El ensayo CA 15-3 es de 2 sitios, fase sólida e inmuno enzimática. Las moléculas de CA15-3 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.

MATERIAL PROVISTO	96 PRUEBAS
1.Placa de 96 pozos	12x8x1
2.Estándares 6 viales con concentraciones	0.5 ml.
3.Reactivo de Enzima Conjugada 1 vial	12 ml.
4.Diluyente de la muestra	25 ml.
5.Reactivo Biotina	12 ml.
6.Solucion TMB 1 vial	12 ml.
7.Solución de frenado 1vial	12 ml.
8.Solución de Lavado Concentrado 20X 1 vial	25 ml.

ALMACENAMIENTO Y SUSTENTABILIDAD

Almacene el equipo a una temperatura de entre 2°C-8°C. Mantenga las tiras de pocillos selladas en la bolsa de aluminio. Todos los compuestos son estables hasta su fecha de expiración siempre y cuando las condiciones de almacenaje sean estrictamente llevadas a cabo como aquí se indica.

MATERIALES REQUERIDOS, PERO NO PROVISTOS

1. Pipetas de precisión.
2. Agua destilada.
3. Puntas de pipeta desechables.
4. Papel absorbente ó toalla de papel.
5. Lector Microelisas con lente a 450nm de longitud de onda con una banda de amplitud de 10nm ó menor y un rango de densidad óptica de 0-2 OD. ó mayor.

PREPARACION DE LA MUESTRA

1. La sangre debe ser extraída usando la técnica Standard de venopunción y el suero debe ser separado del hematocrito con técnica convencional, evitar en gran medida la hemólisis, lipemia o turbidez en la muestra.
2. No utilice tubos que contengan EDTA, Heparina u oxalato puede interferir con el procedimiento de la prueba.
3. La muestra puede ser almacenada por 48 hrs. entre 2°C y 8°C previos al ensayo. Para que una muestra dure aproximadamente 6 meses debe estar en congelación por lo menos a -20° C previos al ensayo. Para descongelar la muestra se debe invertir tiempo, y una mezcla previa de la muestra antes de correr el ensayo.

PREPARACIÓN DEL REACTIVO

1. Inmediatamente antes de la prueba, diluir las muestras usando una relación de 1: 9 con diluyente de muestra proporcionada. Ejemplo: añadir 50ul de muestra con 450ul de diluyente de la muestra y mezclar bien. descartar sobrante no utilizado. **No diluir los estándares.**
2. Preparación de buffer de lavado de (20x) 25 ml. con 475 ml. de agua destilada. Conservar a temperatura ambiente.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

Los estándares del CA15-3 están listos para su uso

1. Designe números de seguridad a los micro pozos y agregar 25µl de estándares, muestras pre diluida y controles pre diluidos. Mezclar gentilmente por 10 segundos.
2. Agregar 100µl de reactivo conjugado de Antibody-Biotin a los pocillos. Mezclar gentilmente por 20-30 segundos.
3. Incubar a 37° C por una hora.
4. Remover de la incubación la mezcla y vaciar el contenido de los micropozos en un contenedor de desechos. Lavar 3 veces los micro pozos con 300 µl de buffer de lavado (1x). Golpear el micro pozo sobre un papel absorbente hasta eliminar completamente los residuos de agua.
5. Agregar 100µl de Enzima conjugada a los pocillos. Mezclar gentilmente por 10 segundos.
6. Incubar a 37° C por una hora.
7. Remover el contenido lavar repitiendo el paso número 4.
8. Agregar 100µl de TMB al micro pozo y mezclar gentilmente por 10 segundos.
9. Incubar a temperatura ambiente en la oscuridad durante 20 min.
10. Detener la reacción añadiendo 50µl de solución stop al pozo. Mezclar por 10 seg. Hasta que cambie por completo el color azul a amarillo.
11. Leer a una densidad óptica de 450nm en un micro lector de Elisa. Dentro de los primeros 15 minutos.

Nota Importante:

El procedimiento de los lavados es crítico. Un lavado insuficiente puede brindar un resultado pobre y un falso incremento en las lecturas de absorbancia.

Se recomienda no procesar mas de 32 posos 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.

CALCULO DE RESULTADOS

El significado del cálculo de la absorbancia evaluado por cada prueba de CA15-3 en referencia a los estándares, muestras y controles.

Construir una curva en grafica de cada uno de las absorbancias obtenidas en la lectura de los estándares en contra de la concertación de las unidades por ml en papel para graficar. La absorbancia se grafica en el eje vertical "Y" mientras que la concentración en el eje horizontal "X". Usar cada absorbancia evaluada para cada muestra para determinar la concentración correspondiente de CA-15-3 en unidades por ml. de estándar en la curva. Esto se recomienda en muestras que se analizan por replica.

EJEMPLO DE CURVA ESTANDAR

En un resultado típico en estándares corridos con una densidad óptica de lectura a 450nm muestran que en el eje Y en contra de del eje X en la concentración de CA15-3.

CA15-3 Evaluado (U/ml)	Absorbancia
0	0.021
15	0.425
30	0.693
60	1.214
120	1.956
240	2.845

EXPECTATIVA EVALUADA Y SENSIBILIDAD

En una mujer sana la concentración de CA15-3 se considera normal hasta las 35 U/ml. El mínimo detectable de la concentración es de 5 U/ml.

REFERENCIA

1. Aziz DC, Rittenhouse HJ, Ranken R. Use and interpretation of tests in oncology. Santa Monica: Specialty Laboratories, 1991.
2. Aziz DC. Quantitation of estrogen and progesterone receptors by immunocytochemical and image analyses. A J Clin Pathol 1992;98:105-11.
3. Aziz DC, Peter JB. DNA ploidy and cell-cycle analysis. Tools for assessment of cancer prognosis. J Clin Pathol 1991;5:422-38.
4. 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.
5. Elledge RM, McGuire WL. Prognostic factors and therapeutic decisions in axillary node-negative breast cancer. Annu Rev Med 1993; 44:201-10.
6. 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.
7. Isola J, Visakorp 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. Ueronese S, Gambacorta M. Detection of Ki-67 rate in breast cancer. Am J Clin Pathol 1991; 95:30-4.
13. Lotnick M, Pavesi F, Scarabelli M. Tumor associated antigens CA15-3 and CA-125 in ovarian cancer. Int. J. Biolog Markers 1991; 6:115