

INDICACIONES DE USO

Inmunoensayo enzimático para la detección del antígeno de cáncer gastrointestinal.
Agente de diagnóstico in vitro, para uso exclusivo de laboratorio clínico o de gabinete.

RESUMEN Y APLICACIÓN

En el grupo de Antígenos glicoproteicos encontrados en la mucosa asociados con cáncer gastrointestinal encontramos marcadores tales como el Antígeno Sianosil Lewis (SLA), CA19-9, y el CA-19-5 reconocidos antígenos circulantes en torrente sanguíneo en la presencia de cáncer gastrointestinal.

El CA19-9 representa el más importante y reconocido marcador tumoral basado en carbohidratos. En la distribución de CA19-9 en tejidos consiste en la determinación cuantitativa de una alta concentración de CA19-9 en pacientes con cáncer o con una inflamación anormal de tejido. Reportes recientes indican que el nivel en suero de CA19-9 se asocia con frecuencia con diferentes tipos de tumoraciones malignas incrementándose la concentración en suero de CA19-9 tales como el pancreático, coló rectal, gástrico y carcinoma hepático. Junto con el CEA elevado el CA19-9 sugiere neoplasia vesicular en el marco de una enfermedad inflamatoria vesicular. Este antígeno se asocia con la presencia de tumor, pero puede además elevarse algunas veces con condiciones no malignas. Estudios recientes demostraron que el CA19-9 en suero puede ser un útil auxiliar en la evaluación y monitoreo de sujetos que obtuvieron el diagnóstico maligno. Si se presenta una persistente elevación en suero de CA19-9 evaluado después de un tratamiento puede ser un indicativo de una metástasis oculta o de una enfermedad residual. En una persistente reincidencia elevación en suero de CA19-9 se puede asociar con una enfermedad maligna progresiva y una respuesta terapéutica pobre en la declinación de la concentración en suero de CA19-9 puede ser un indicativo de una buena respuesta al tratamiento.

El Kit de ensayo de CA19-9 se utiliza para monitoreo como una prueba de evaluación. En resultados anormales (por ejemplo: suero cubierto con niveles de CA-199) se puede indicar como cáncer gastrointestinal y sugiere el estudio más profundo. Esta prueba párese ser un buen marcador tumoral en pacientes con remisión clínica siguiendo un tratamiento. Los valores post operatorios en suero de CA-19-9 que fallan al regresar a los valores normales sugieren fuertemente la presencia de un tumor residual. Los tumores residuales son frecuentemente acompañados por un incremento en niveles de CA19-9 antes que una enfermedad progresiva sea evidente.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

El ensayo Inmunoenzimático de CA19-9 ELISA en la fase sólida se encuentra en dos sitios; un anticuerpo monoclonal es cubierto en la superficie en los micro pocillos y otro anticuerpo monoclonal debilitado con peroxidasa de rábano picante. Las moléculas de CA19-9 presentes en la solución estándar o suero se presentan como una especie de sándwich entre dos anticuerpos. Siguiendo la formación de la cobertura del complejo Anticuerpo-antígeno-anticuerpo-enzima marcados son removidos en el lavado La actividad de la peroxidasa de rábano picante se vincula en los pozos del ensayo por una reacción calorimétrica. La intensidad de la formación de color es proporcional a la concentración de CA19-9 presente en la muestra.

ALMACENAMIENTO

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 PROVISTOS	96 PRUEBAS
1. Placa con 96 pozos	12x8x1
2. Estándares 6 viales con concentraciones	0.5 ml.
3. Reactivos de enzima conjugada 1 vial	12 ml.
4. Reactivo biotina	12 ml.
5. Solución TMB	12 ml.
6. Solución de frenado 1 vial	12 ml.
7. Solución de lavado concentrado 20X 1vial	25 ml.

MATERIALES REQUERIDOS, PERO NO PROVISTOS

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

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

- 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.
- Recolección de la muestra de plasma realizada en tubos que contengan EDTA, Heparina u oxalato puede interferir con el procedimiento de la prueba y debe ser evitados.
- La muestra solo debe ser atrapada y puede ser almacenada por 48 hr. entre 2° 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

Llevar todos los reactivos a temperatura ambiente (18-26°C) y mezcle suavemente.

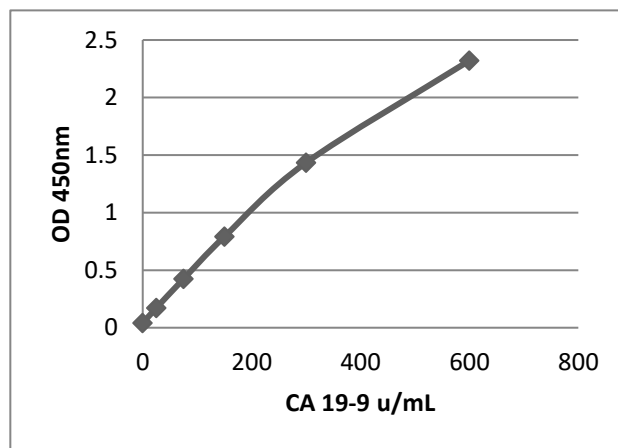
- Prepare el buffer de lavado 1X agregando el contenido del bote (25 ml, 20X) a 475 ml de agua destilada o desionizada. Almacene a temperatura ambiente (18-26°C). mezcle bien antes de usar.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

Llevar todos los reactivos a temperatura ambiente. (18-26°C) y mezcle suavemente

- Asegure el numero deseado de pozos en la placa y márquelos respectivamente.
- Dispense 25 µL de estándares, controles y muestras en los pozos.
- Dispense 100 µL de conjugado biotina anti-CA 19-9 (solución color azul) en cada pozo.
- Mezcle por 30 segundos. Es importante mezclarlos completamente.

5. Incube por 60 minutos a temperatura ambiente (18-26°C).
6. Remueva el líquido de todos los pocillos. Lave cada pocillo 3 veces con 350 µL de buffer de lavado 1X. Entre cada lavado vacíe los pocillos. Golpee los pocillos contra una toalla de papel absorbente hasta eliminar las gotas de buffer residuales.
7. Dispense 100 µL de enzima conjugada (solución roja) en cada pocillo.
8. Incubar por 60 minutos a temperatura ambiente (18-26°C).
9. Repetir la etapa de lavado descrita en el paso 6.
10. Dispensar 100 µL de solución TMB en cada pocillo.
11. Incubar por 15 minutos a temperatura ambiente (18-26°C) sin mezclar.
12. Detenga la reacción agregando 50 µL de solución de paro en cada pocillo y mezcle bien.
13. Lea la absorbancia de cada pocillo a 450 nm (usar longitud de onda de referencia de 630 nm) con un lector de microplacas en un periodo no mayor a 15 minutos.



Nota Importante:

El procedimiento de los lavados es crítico. Un lavado insuficiente puede resultar en un resultado pobre y un falso incremento las lecturas de absorbancia. Se recomienda no procesar más 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. El utilizar los 96 micro pozos se recomienda un pipeteo automatizado. La duplicación de los estándares no se requiere, aunque se recomienda.

CÁLCULO DE RESULTADOS

1. Calcule el promedio de las absorbancias para cada estándar de referencia, control y muestra.
2. Construya una curva estándar trazando las medias de las absorbancias obtenidas de cada estándar de referencia contra su concentración en U/ml, con las absorbancias en el eje vertical (Y) y las concentraciones en el eje horizontal (X).
3. Usando la absorbancia de cada muestra o control, determine la concentración correspondiente de CA 19-9 en U/ml a partir de la curva estándar.

EJEMPLO DE CURVA ESTANDAR

Los resultados de una curva estándar típica corrida con lecturas de densidad óptica de 450 nm mostradas en el eje Y contra las concentraciones de CA 19-9 mostradas en el eje X se muestran a continuación. Esta curva estándar tiene como propósito ilustrar al usuario y no debe utilizarse para calcular los resultados de las muestras. Cada usuario debe construir su propia curva estándar para cada lote o kit nuevo.

Ejemplo de curva estándar

CA19-9 Evaluado (U/ml)	Absorbancia
0	0.040
25	0.172
75	0.424
150	0.791
300	1.434
600	2.321

EXPECTATIVA EVALUDA Y SENSIBILIDAD

En una mujer sana la concentración de CA-19-9 se considera normal hasta las 35 U/ml. El mínimo detectable de la concentración es de 10 U/ml.

REFERENCIAS

1. Glenn, J., Steinberg, W.M., Kurtzman, S.H., et al. Evaluation of the utility of a radioimmunoassay for serum CA 19-9 level in patients before and after treatment of carcinoma of the pancreas. *J. Clin. Oncol.* 1988; 6:462-8.
2. Hayakawa, T., Kondo, T., Shibata, T. et al. Sensitive serum markers for detecting pancreatic cancer. *Cancer* 1988; 61:1827-31.
3. Koprowski, H., Herly, M., Steplewski, Z., et al. Specific antigen in serum of patients with colon carcinoma. *Science* 1981; 212:53-5.
4. Malesci, A., Tommasini, M.A., Bonato, C. et al. Determination of CA19-9 antigen in serum and pancreatic juice for differential diagnosis of pancreatic adenocarcinoma from chronic pancreatitis. *Gastroenterology* 1987; 92:60-7.
5. Safi, F, Roscher, R., Bittner, R., et al. High sensitivity and specificity of CA 19-9 for pancreatic carcinoma in comparison to chronic pancreatitis. Serological and immunohistochemical findings. *Pancreas* 1987; 2:398-403.
6. Steinberg, W. The clinical utility of CA 19-9 tumor associated antigen. *American J. of Gastroenterology* 1990; 85:350-355.
7. Steinberg, W.M., Gelfand, R., Anderson, K.K., et al. Comparison of the sensitivity and specificity of the CA 19-9 and carcinoembryonic antigen assays in detecting cancer of the pancreas. *Gastroenterology* 1986; 90:343-9.
8. Takasaki, H., Uchida, E., Tempero, M.A., et al. Correlative study on expression of CA 19-9 and DU-Pan-2 in tumor tissue and in serum of pancreatic cancer patients. *Cancer Res.* 1988; 48:1435-8.
9. Tatsuta, M., Yamamura, H., Iishi H., et al. Values of CA19-9 in the serum, pure pancreatic juice and aspirated pancreatic material in the diagnosis of malignant pancreatic tumor. *Cancer* 1985; 56:2669-73.