

## INTENCIÓN DE USO

El antígeno de Cáncer 15-3 es un inmunoensayo de Quimioluminiscencia (CLIA), el cual se ha diseñado para la determinación cuantitativa de CA1 5-3 en suero humano.

## PRINCIPIO DEL ENSAYO

La prueba de EIA CA15-3 es un inmunoensayo de fase sólida de dos sitios. De esta manera, un anticuerpo monoclonal está revestido en la superficie de los micropocillos y otro anticuerpo monoclonal marcado con peroxidasa de rábano picante que se utiliza para trazado de líneas. Las moléculas del CA15-3 presentes en el suero o solución estándar son "intercaladas" entre los dos anticuerpos. Tras la formación revestida de anticuerpo-antígeno y anticuerpo-enzima compleja, se deben quitar las etiquetas del anticuerpo-enzima por medio del lavado. La actividad ligada con la peroxidasa de rábano picante en los micropozos es posteriormente ensayada agregando los reactivos del sustrato y siendo sometidos a las reacciones de Quimioluminiscencia. La intensidad de la luz emitida desde el respectivo micropozo es proporcional a la cantidad de enzima presente, y está directamente relacionada con la cantidad de antígeno de CA15-3 en la muestra. Por referencia a una serie de normas del CA15-3, las muestras deben ser analizadas de la misma manera, y deben ser cuantificadas las concentraciones del CA15-3 en las muestras desconocidas.

## MATERIALES SUMINISTRADOS

1. Placa con 96 micropocillos recubiertos con anticuerpo anti-CA 15-3
2. Diluyente de la muestra, 100 ml
3. Reactivo conjugado enzimático, 12.0 ml
4. Estándares de referencia de CA 15-3, conteniendo 0, 15, 30, 60, 120 y 240 U/ml CA 15-3, líquido pre-diluido, listo para su uso.
5. Buffer de lavado concentrado 50X, 15.0 ml
6. Reactivo A en Quimioluminiscencia, 6.0 ml
7. Reactivo B en Quimioluminiscencia, 6.0 ml

## MATERIALES REQUERIDOS PERO NO SUMINISTRADOS

1. Agua destilada.
2. Pipetas de precisión, 0.05 ml, 0.1 ml, 0.2 ml
3. Puntas de pipetas desechables.
4. Tubo de vidrio o frascos para mezclar el reactivo A y B.
5. Luminómetro para micropocillos.
6. Mezclador Vórtex o equivalente.
7. Papel absorbente.
8. Papel para gráfica.

## PREPARACIÓN DEL REACTIVO

1. Para preparar la solución de sustrato, se debe realizar una mezcla 1:1 del Reactivo A con el Reactivo B antes de su uso. Mezclar con suavidad para asegurar una mezcla completa. Desechar el exceso sobrante después de su uso.
2. Diluir 1 volumen de Buffer de lavado (50X) con 49 volúmenes de agua destilada. Por ejemplo, diluir 15 ml de lavado tampón (50X) en 735 ml de agua destilada para preparar 750 ml de Buffer de lavado (1X). Mezclar bien antes de su uso.

## PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

**Nota importante:** Los estándares de CA15-3 ya han sido pre-diluidos, y están listos para usarse. **No diluir otra vez.**

1. El suero del paciente y el suero de control deben de ser diluidos, 51 veces, antes de su uso. Después, se debe preparar una serie de tubos pequeños (tales como tubos de microcentrífuga de 1.5 ml) y mezclar 20 µl del suero con 1.0 ml del diluyente de la muestra.
2. Asegurar el número deseado de micropocillos recubiertos en el soporte. Después se debe dispensar 100 µl de los estándares de CA 15-3, de las muestras diluidas y de los controles diluidos, en los micropocillos adecuados. Mezclar suavemente durante 10 seg.
3. Incubar a 37°C durante 1 hora.
4. Quite la mezcla de la incubación, para posteriormente vaciar el

5. contenido de la placa en un recipiente de desechos.
5. Enjuague y sacuda 5 veces los pocillos con buffer de lavado (1X).
6. Acomode los micropocillos sobre el papel absorbente para quitar las gotas de agua residual.
7. Añadir 100 µl del reactivo conjugado enzimático a cada pocillo. Y después mezclar suavemente durante 10 segundos.
8. Incubar a 37°C durante 1 hora.
9. Sacar el contenido y lavar perfectamente la placa como se describe anteriormente en el paso 4, 5 y 6.
10. Pipetear 100 µl de la solución de sustrato de Quimioluminiscencia dentro de cada micropocillo. Después se debe mezclar suavemente durante 5 segundos.
11. Se debe leer 5 min más tarde, se deberán leer los micropozos mediante un lector de micropocillos de Quimioluminiscencia. (Entre 5 y 20 minutos después de la dosificación de los sustratos).

## NOTAS IMPORTANTES

1. El procedimiento de lavado es fundamental. El insuficiente lavado producirá mala precisión y lecturas falsamente elevadas de RLU.
2. Si hay burbujas en los micropocillos, se crearán lecturas falsas. Utilice agua destilada para eliminar las burbujas antes de añadir el sustrato.

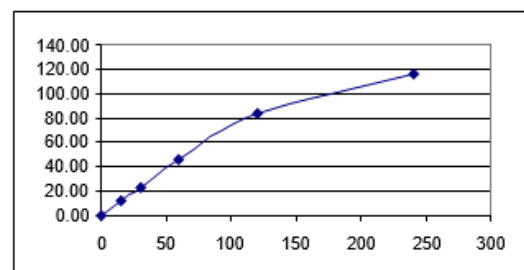
## CÁLCULO DE RESULTADOS

1. Calcular el promedio de las unidades relativas de luz de cada una de las lecturas realizadas (RLU) para cada conjunto de estándares de referencia, controles y muestras.
2. Se recomienda utilizar un software especial, el cual sea adecuado para calcular los resultados. El mejor ajuste para la curva utilizada en los ensayos es la regresión cuadrática o la 4° regresión de parámetro. Si el software no está disponible, se deberá construir una curva estándar mediante la representación de la media (RLU) obtenida para cada referencia estándar contra la concentración de CA 15-3 en mIU/ml sobre papel milimetrado lineal. Se debe colocar los valores de RLU en el eje vertical (y) y la concentración en el eje horizontal (x).
3. Usando el valor promedio de absorbancia para cada una de las muestra, se deberá determinar la correspondiente concentración de CA 15-3 en mIU/ml de la curva estándar.

## EJEMPLO DE CURVA ESTÁNDAR

A continuación se muestran los resultados de un funcionamiento estándar típico. Esta curva estándar, tiene un único objetivo, el cual es solamente ilustrar y no debe utilizarse para calcular ciertas incógnitas. Se requiere las corridas del ensayo junto con una curva estándar cada vez. El cálculo de los valores de las muestras se deben basar en la curva particular, que a su vez se debe ejecutar al mismo tiempo.

CA 15-3 (mIU/ml)	RLU
0	0.64
15	12.21
50	22.90
60	45.90
120	83.96
240	115.39



---

---

### **VALORES ESPERADOS Y SENSIBILIDAD**

Se espera que las mujeres sanas tengan valores inferiores a 35 U/ml de CA 15-3. La concentración mínima detectable de CA15-3 en este ensayo se estima a 5 U/ml.

### **REFERENCIAS**

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.
5. Elledge RM, McGuire WL. Prognostic factors and therapeutic decisions in axillary node-negative breast cancer. *Annu Rev Med* 1993; 44:201-10.
6. 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.
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, and 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.