

Revisado 15 Ag. 2006

1 INTRODUCCION

El kit de inmunoensayo enzimático de CEA de DRG proporciona material para la determinación cuantitativa del antígeno carcinoembrionario en suero.

Esta prueba es para el uso in vitro solamente.

El antígeno carcinoembrionario (CEA) es una glicoproteína de 200 kd. Las células que expresan CEA, ambas incorporan esta glicoproteína en las membranas de sus células y liberan estas en la sangre. Consecuentemente el CEA es detectado en células y fluidos humanos.

Los valores normales son de < 5 ng/ml, los tumores asociados con el incremento de los valores del CEA son:

Colon, estomago, seno, pulmón, esófago. El rol más importante del CEA es en el cáncer del Colon, desde que los niveles del CEA son correlacionados con la etapa del tumor.

2 PRINCIPIO DEL ANALISIS

El kit de ELISA del CEA de DRG® es un análisis enzima-ligado del inmuno sorbente de la fase sólida (ELISA) basado en el principio de intercalado. Los pozos de la microplaca esta recubiertos con el anticuerpo monoclonal dirigido hacia un sitio antígeno único en la molécula de CEA.

Una alícuota de la muestra del paciente conteniendo el endógeno CEA es incubado en los pozos recubiertos con la enzima conjugada, la cual es un anticuerpo monoclonal anti-CEA conjugado con la peroxidasa (horseradish peroxidase). Después de la incubación el conjugado no ligado es eliminado en el proceso de lavado. La cantidad de peroxidasa ligada es proporcional a la concentración del CEA en la muestra.

Habiendo adicionado la solución substrato, la intensidad de color desarrollada es proporcional a la concentración del CEA en la muestra.

3 PRECAUCIONES

- Este kit es para el uso de diagnostico in vitro solamente.
- Para la información sobre las sustancias peligrosas incluidas en el kit refiera por favor a las hojas de datos materiales de seguridad.
- Todos los reactivos de este kit de la prueba que contienen el suero o el plasma humano se han probado y confirmaron la negativa para VIH I/II, HBsAg y HCV por procedimientos aprobados FDA. Todos los reactivos, sin embargo, se deben tratar como potencialmente peligrosos cuando se los uses y su desechos.
- Evite el contacto con la solución de la parada que contiene el H₂SO₄ de 0.5 M. Puede causar la irritación y quemaduras de piel.
- Nunca pipetee con la boca y evite el contacto de reactivo y de especímenes con la piel y las membranas mucosas.
- No fume, no coma, no beba ni aplique los cosméticos en las áreas donde se manejan los especímenes o los reactivos del kit.
- Use los guantes desechables de látex al manejar especímenes y los reactivos. La contaminación microbiana de reactivo o de especímenes puede da resultados falsos.
- El manejo debe estar de acuerdo con los procedimientos definidos y una regulación nacional apropiada de la seguridad de productos peligrosos o contaminantes.
- No utilice los reactivos después de la fecha de vencimiento como se muestra en las etiquetas del kit.

Revisado 15 Ag. 2006

- Todos los volúmenes indicados tienen que ser realizados según el protocolo. Los resultados de la prueba óptimos se obtienen solamente al usar las pipetas calibradas.
- No mezcle ni utilice los componentes de kits con diversos números de lotes. Se aconseja no intercambiar o usar los pozos de diferentes placas. Los kits pudieron haber sido enviados o almacenados bajo diversas condiciones y características lo que puede hacer que las placas pueden resultar levemente diferentes.
- Los productos químicos y los reactivos preparados o usados tienen que ser tratados como desechos peligrosos que son regulados por un instituto nacional de la seguridad de desechos peligrosos.
- Las hojas de datos de seguridad para este producto están disponibles a petición directamente de DRG International, Inc.
- Las hojas de datos de seguridad cumplieron las demandas de: EC de la EU-regla 91/155.

4 COMPONENTES DEL KIT

4.1 Contenido

1. **Microplaca**, 12x8 (separables) tiras, 96 pozos
Pozos recubiertos con anticuerpo monoclonal anti-CEA
2. **Estándar 0**, 3 ml contiene BND/MIT como preservante.
3. **Estándar 1-5**, 5 frascos, 1 ml
Concentraciones: 5; 10; 25; 50; 100 ng/ml
contiene BND/MIT como preservante.
4. **Control**, 1 frasco (liofilizado), 1.0 ml,
Ver “Preparación de Reactivos”
Los valores del control y rangos por favor ver la etiqueta o el certificado de control de calidad.
contiene BND/MIT como preservante.
5. **Enzima Conjugada**, 1 frasco, 14 ml, listo para usar,
Anticuerpo monoclonal anti-CEA conjugado con la Peroxidasa (horseradich peroxidase)
6. **Solución Substrato**, 1 frasco, 14 ml, listo para usar,
TMB
7. **Solución de Parada**, 1 frasco, 14 ml, listo para usar,
contiene 0.5M H₂SO₄,
Evitar el contacto con la solución de parada. Causa irritación y quemadura en la piel.
8. **Solución de Lavado**, 1 frasco, 30 ml (40X concentrado),
Ver “Preparación de Reactivos”

Nota: Una muestra adicional del *Standard 0* para dilución de muestra está disponible cuando es requerida.

4.1.1 Equipo y Material requerido pero no suministrado

- Un lector de micro-placa calibrado (450±10 nm), (e.g. the DRG International Microtiter Plate Reader).
- Micro-pipetas de precisión calibrada.
- Papel absorbente.
- Agua destilada.



Revisado 15 Ag. 2006

4.2 Almacenamiento y Estabilidad del kit

Cuando es almacenado entre 2-8°C y sin abrir los reactivos mantendrán su reactividad hasta su fecha de expiración. No usar los reactivos después de esta fecha.

Una vez abierto los reactivos se deberán mantener entre 2-8° C. Las microplacas deberán ser almacenadas entre 2-8° C. Una vez que la envoltura de aluminio ha sido abierta, se tendrá cuidado de mantenerla herméticamente cerrada.. Los kits abiertos mantendrán la actividad por dos meses si se almacena como se describe anteriormente.

4.3 Preparación de Reactivos

Permita que todos los reactivos y las tiras de los micro pozos tengan la temperatura ambiente antes de realizar el análisis.

Control

Reconstituir el contenido liofilizado con 1.0 ml agua destilada y dejar en reposo por 10 minutos mínimo. Mezclar los controles algunas veces antes de su uso.

Nota: El control reconstituido se debe repartir en alícuotas y almacenar en - 20°C.

Solución de Lavado

Diluya 30 mL del concentrado de Solución de Lavado con 1170 mL agua desmineralizada para obtener un volumen final de 1200 mL.

La Solución de Lavado es estable por dos semanas a temperatura ambiente.

4.4 Desecho del Kit

El desecho de este kit deberá ser hecho de acuerdo con las regulaciones nacionales. Una información especial de este producto está en las hojas de datos materiales de seguridad MSDS (véase el capítulo 13).

4.5 Daño del Kit de Prueba

En caso de cualquier daño severo del kit o de los componentes de la prueba, DRG® tienen que ser informado por escrito, no más tarde de una semana después de recibir el kit. Los componentes seriamente dañados no se deben utilizar para realizar el análisis. Tienen que ser almacenados hasta que se ha encontrado una solución final. Después de esto, deben ser descartados según las regulaciones oficiales.



Revisado 15 Ag. 2006

5 MUESTRAS

Muestras de suero pueden ser utilizadas para esta prueba.
No usar muestras hemolíticas, ictéricas o lipemicas.

5.1 Toma de Muestra

Suero:

Toma de muestra vía intravenosa (e.g Sarstedt Monovette # 02.1388.001), permita la coagulación y separe el suero por centrifugación a temperatura ambiente. No centrifugar hasta que una coagulación completa se haya obtenido. Pacientes recibiendo una terapia de anticoagulantes puede incrementar el tiempo de coagulación.

5.2 Almacenamiento de la Muestra

Las muestras deberán ser tapadas y almacenadas hasta 48 horas a 2-8°C antes de realizar el análisis.

Las muestras que se guardaran por un periodo de tiempo más largo (hasta seis meses) deberán ser congeladas solo por una vez a -20°C antes de realizar el análisis. La muestra una vez descongelada deberá ser mezclada por inversión unas cuantas veces previo a su análisis.

5.3 Dilución de Muestras

Si en la prueba inicial, la muestra de suero se encuentra que contiene más valor que el estándar alto, la muestra puede ser diluida con el *Standard 0* y re-analizada como se describe en el procedimiento de la prueba.

Para la calculación de las concentraciones el factor de dilución tiene que ser considerado.

Ejemplo:

- a) dilución 1:10: 10 µl Suero + 90 µl Standard 0 (mezclarlo cuidadosamente)
- b) dilución 1:100: 10 µl (dilución a) 1:10 + 90 µl Standard 0 (mezclarlo cuidadosamente)

6 PROCEDIMIENTO

6.1 Observaciones Generales

- Todos los reactivos y muestras deberán tener la temperatura ambiente antes de su uso. Todos los reactivos deben de ser mezclados sin tener burbujas.
- Una vez comenzado la prueba todos los pasos deben de ser terminados sin interrupción.
- Usar puntas de pipetas nuevas descartables para cada estándar, controles o muestras para evitar posible contaminación.
- La absorbencia es una función del tiempo y de la temperatura de la incubación. Antes de comenzar el análisis, se recomienda que todos los reactivo estén listos, las tapas se quitan, todos los pozos necesarios asegurados en sostenedor, etc. Esto asegurará el tiempo transcurrido es igual para cada paso cuando se pipetee sin interrupción.
- Como regla general la reacción enzimática es linealmente proporcional a tiempo y temperatura.



Revisado 15 Ag. 2006

6.2 Procedimiento de la Prueba

Todos los estándares, muestras y controles deberán ser corridos por duplicado concurrentemente de modo que todas las condiciones de la prueba sean iguales.

Cada corrida deberá tener una curva estándar.

1. Asegure el número deseado de pozos de la microplaca en el sostenedor.
2. Adicione **50 µl** de cada estándar, controles y muestras con punta de pipetas desechable en los respectivos pozos.
3. Adicione **100 µl** Enzima Conjugada (Enzyme Conjugate) en cada pozo.
4. Mezclarlo bien por 10 segundos. Es importante que se complete la mezcla en este paso.
5. Incubar por **60 minutos** a temperatura ambiente (sin cubrir la microplaca).
6. Invertir enérgicamente las placas y desalojar el contenido de las placas.
Enjuagar los pozos 3 veces con la Solución de Lavado (400 µl por pozo). Invertir enérgicamente las placas sobre papel absorbente y remover en lo posible los residuos.

Nota Importante:

La sensibilidad y precisión de esta prueba está influenciada considerablemente en la manera correcta como se realiza el procedimiento de lavado!

7. Adicione **100 µl** de la Solución Substrato (Substrate Solution) en cada pozo.
8. Incubar por **30 minutos** a temperatura ambiente.
9. Parar la reacción enzimática adicionando **100 µL** de la Sol. de Parada (*Stop Solution*) en cada pocillo.
10. Leer a OD at **450±10 nm** con el lector de micro placas **en 10 minutos** después de haber agregado la solución de Parada (Stop Solution).

6.3 Cálculación de Resultados

1. Calcule los valores medios de la absorbancia para cada sistema de estándares, de controles y de muestras del paciente.
2. Construya una curva estándar trazando la absorbancia media obtenida de cada uno estándar contra su concentración con valor de la absorbancia en el eje vertical (Y) y la concentración en (x) el eje horizontal.
3. Con el valor promedio de la absorbancia para cada muestra determine la concentración correspondiente de la curva estándar.
4. Método automatizado: Los resultados en el inserto han sido calculados usando, 4 PL (4 logísticas del parámetro) o el Logit-Registro pueden dar generalmente un buen ajuste. Otra función para datos de reducción puede dar resultados algo diferentes.
5. La concentración de las muestras se puede leer directamente en esta curva estándar. Las muestras con las concentraciones más altas que del estándar alto tienen que ser diluidas. Para el cálculo de las concentraciones este factor de la dilución tiene que ser considerado.

Revisado 15 Ag. 2006

Debajo se muestra una curva típica del estándar con el ELISA CEA

| Estándar | Optical Units (450 nm) |
|------------------------|------------------------|
| Estándar 0 (0 ng/ml) | 0.06 |
| Estándar 1 (5 ng/ml) | 0.20 |
| Estándar 2 (10 ng/ml) | 0.34 |
| Estándar 3 (25 ng/ml) | 0.62 |
| Estándar 4 (50 ng/ml) | 1.12 |
| Estándar 5 (100 ng/ml) | 2.04 |

Revisado 15 Ag. 2006

7 EXPECTED VALORES NORMALES

Se recomienda considerablemente que cada laboratorio deba determinar sus propios valores normales y anormales. La lectura del cut-off (limite de referencia) es 5 ng/ml para no-fumadores y 10 ng/ml para fumadores.

8 CARACTERISTICAS DE LA PRUEBA

8.1 Rango Dinámico del Ensayo

El rango de esta prueba está entre 0 – 100 ng/ml.

8.2 Especificidad de los Anticuerpos (Reactividad Cruzada)

Las reactividades cruzadas no son conocidas

8.3 Sensibilidad Analítica

La sensibilidad analítica fue calculada del promedio más dos desviaciones de estándar de veinte (20) replicas análisis del estándar 0 y fue encontrada para ser < 0.596 ng/ml.

8.4 Precision

Intra-Prueba de 3.2% - 4.8% fueron observados.

Inter-Prueba de 4.0% – 6.5% fueron observados.

8.5 Exactitud

8.5.1 Control de Calidad

Se recomienda utilizar muestras control de acuerdo al estado y regulaciones federales. El uso de las muestras control se aconseja para asegurar la validez cotidiana de los resultados. Utilice los controles en los niveles normales y patológicos. Los controles y los resultados correspondientes del QC-Laboratorio se indican en el certificado de QC agregado al kit. Los valores y los rangos indicados en la hoja de QC refieren al actual lote del kit y se deben siempre utilizar para la comparación directa de los resultados.

También se recomienda para hacer uso de programas nacionales o internacionales del gravamen de la calidad para asegurar la exactitud de los resultados.

Emplee los métodos estadísticos apropiados para analizar valores y tendencias del control. Si los resultados del análisis no entran en los rangos aceptables establecidos de los materiales del control los resultados del paciente se deben considerar inválidos.

En este caso, compruebe por favor las áreas técnicas siguientes: Dispositivos que miden con una pipeta y que miden el tiempo; fotómetro, fechas de vencimiento de reactivo, condiciones del almacenaje y de la incubación, aspiración y métodos de lavado. Después de comprobar los puntos antedichos sin encontrar ningún error entre en contacto con su distribuidor o DRG® directamente.



Revisado 15 Ag. 2006

9 LIMITACIONES DE USO

9.1 Interferencia de Substancias

Un inapropiado manejo de las muestras o su modificación de esta prueba puede influenciar en el resultado.

Las muestras de sueros hemolíticas, ictéricas y lipemicas deberán ser evitadas

La prueba contiene reactivos para minimizar la interferencia de HAMA y anticuerpos heterofilicos. Sin embargo, las titulaciones extremadamente altas de HAMA y anticuerpos heterofilicos pueden interferir con los resultados de la prueba.

9.2 Interferencia de Drogas

Los fumadores han sido reportados en mostrar un incremento en los valores de CEA (Ver valores normales)

9.3 Alta-Dosis-Efecto Gancho

No efecto gancho fue observado en esta prueba hasta 10.000 ng/ml.

10 ASPECTOS LEGALES

10.1 Confiabilidad de los Resultados

La prueba se debe realizar exactamente según las instrucciones de uso del fabricante. Por otra parte el usuario debe apegar terminantemente a las reglas de GLP (buena práctica del laboratorio) u otros estándares y/o leyes nacionales aplicables.

Esto es especialmente relevante para el uso de los reactivos de control. Es importante incluir siempre, dentro del método de prueba, un suficiente número de los controles para validar la exactitud y la precisión de la prueba. Los resultados de la prueba son válidos solamente si todos los controles están dentro de los rangos especificados y si el resto de los parámetros de la prueba están también dentro de las especificaciones dadas en el análisis. En caso de cualquier duda o pregunta por favor entre en contacto con DRG®.

10.2 Diagnostico

El diagnostico nunca se debe basar en resultados del laboratorio solamente aunque que todos los resultados de la prueba están en el acuerdo con los artículos según lo indicado bajo punto 10.1. Cualquier resultado del laboratorio es solamente una parte del cuadro clínico total de un paciente. Solamente en caso de que los resultados del laboratorio están aceptados y de acuerdo con el cuadro clínico total del paciente de deriva el diagnostico. El resultado de la prueba nunca se debe tomar como un factor único determinante para dar un diagnostico.

10.3 Responsabilidad

Cualquier modificación del kit y/o del intercambio o la mezcla de cualesquiera de los componentes de la prueba de diferentes lotes de un kit con otro podría afectar negativamente los resultados y la validez previstos de la prueba total. Tal modificación e intercambios invalidan cualquier demanda para el reemplazo. Las demandas sometidas debido a la interpretación del cliente de los resultados del laboratorio conforme al punto 10.2. están también invalidas. En caso de alguna demanda, la responsabilidad del fabricante no es exceder el valor del kit de la prueba. Algún daño causado al kit de la prueba durante el transporte no está sujeto como responsabilidad del fabricante.



Revisado 15 Ag. 2006

11 REFERENCES

1. Engvall, E. Methods in Enzymology, Volume 70, Van Vunakis, H. and Langone, J.J. (eds.), Academic Press, New York, 419-492 (1980).
2. Uotila, M. Ruoslahti, E. and Engvall, E., J. Immunol. Methods, 42, 11-15 (1981).
3. Gold, P., Freedman S.O: Demonstration of tumor specific antigen in human colonic carcinoma by immunologic tolerance and absorption techniques. J Exp. Med. 1965; 127:439-462.
4. Thompson, D.P.M. Krupcy J, Freedman S.O., et al. The radioimmunoassay of circulating carcinoembryonic antigen of the human digestive system. Proc Natl Acad Sci USA 1969, 64:161-167.
5. Schwartz M.K. Tumor markers in diagnosis and screening. In: Ting S.W., Chen J.S., Schwartz M.K.: , eds. Human tumor markers, Amsterda: Elsevier Science, 1987; 3-16.
6. Zamchek N, and Martin E.W. Sequential Carcinoembryonic Antigen Levels in Pancreatic Cancer: Some Clinical Correlations. Cancer 1981; 47:1620-1627.
7. Mughal A.W., Hortobagyi G.N.:, Fritsche H.A., Buzdar A.U. Yap H-Y. and Blumenschein G.R. Serial Plasma Carcinoembryonic Antigen Measurements During Treatment of Metastatic Breast Cancer. JAMA 1983; 259; 1881-1886.