

# CEA

## Análisis ELISA para la determinación cuantitativa del Antígeno Carcinoembrionario en suero humano

### Presentación

<b>REF</b>	52020	96 determinaciones	Estuche Completo
<b>IVD</b>			

### Uso previsto

El antígeno carcinoembrionario (CEA) es una glicoproteína con un peso molecular de 180 kDa, sintetizada durante el desarrollo fetal normal por el aparato gastrointestinal y el páncreas y está secretado en la circulación. En adultos, el síntesis de CEA no está completamente reducida. Puede detectarse en no fumadores por métodos inmunológicos<sup>1</sup>.

CEA es el marcador más usado para diagnosticar el cáncer gastrointestinal. CEA se asocia primariamente con el cáncer colorectal, sin embargo, se encuentran valores elevados de CEA también en enfermedades malignas del pecho, del pulmón, del estómago, de los ovarios y otros órganos. También enfermedades benignas del pulmón, del aparato gastrointestinal, del hígado (cirrosis) y cánceres benignos causan valores elevados de CEA<sup>2,3</sup>. Fumadores muestran también una concentración de CEA elevada.

La determinación cuantitativa se usa para controlar pacientes con un cáncer maligno diagnosticado en lo cual concentraciones elevadas de CEA se han encontrado<sup>4</sup>.

### Principio - Sandwich EIA -

El análisis CEA ELISA está basado en la clásica técnica ELISA sandwich haciendo uso del sistema de alta afinidad Biotina-Estreptavidina. Se recubren micropocillos ELISA con Estreptavidina. En la primera etapa de incubación, se mezclan muestras, calibradores o controles y el conjugado enzimático-anticuerpo (anticuerpos monoclonales anti-CEA marcados con peroxidasa o biotinados) para formar el complejo sandwich que se fija a la superficie de los micropocillos por la interacción de la biotina con la estreptavidina inmovilizada. Al final de la incubación, el exceso de conjugado y antígenos no fijados son eliminados por lavado. Se agrega sustrato (etapa 2), se forma un color azul que se transforma a amarillo después de parar la reacción. La intensidad del color es directamente proporcional a la concentración de CEA en la muestra.

La absorbancia de los calibradores y muestras se determina haciendo uso de un lector de micropocillos ELISA (HUMAREADER). La concentración en la muestra se evalúa por medio de una curva de calibración la cual se obtiene haciendo uso de calibradores de suero con concentraciones de CEA conocidas.

### Reactivos y contenidos

<b>MIC</b>	12	<b>Tiras de Micropocillos</b> (en portatiras) Tiras <b>divisibles</b> de 8 pocillos, recubiertos con estreptavidina
<b>CAL</b>	A - F 6x2,0ml	<b>Calibradores</b> (tapa blanca) listos para usar, en suero humano Concentraciones de CEA: 0 (A), 5 (B), 10 (C), 25 (D), 50 (E), y 250 (F) ng/ml
<b>CON</b>	13 ml	<b>Conjugado enzimático-anticuerpo</b> (tapa blanca) listo para usar, <b>coloreado amarillo</b> pH 7,45 ± 0,1 anti-CEA (anticuerpos monoclonales de ratón) biotinados, anti-CEA (cabra) marcados con peroxidasa
<b>WS</b>	20 ml	<b>Solución de Lavado</b> (tapa negra) Concentrado para aprox. 1000 ml pH 8,8 ± 0,4 Buffer MOPS salino 5 mmol/l
<b>SA</b>	7,0 ml	<b>Reactivo Sustrato A</b> (tapa amarilla) pH 3,5 ± 0,1 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) 1 g/l Buffer acetato de sodio 0,05 mol/l
<b>SB</b>	7,0 ml	<b>Reactivo Sustrato B</b> (tapa azul) pH 4,5 ± 0,1 Peróxido de urea hidrógeno 0,8 g/l Buffer acetato de sodio 0,05 mol/l
<b>STOP</b>	7,5 ml	<b>Solución de Detención</b> (tapa roja) Acido sulfúrico 0,5 mol/l
	1	<b>Tira adhesiva</b>

**Agentes preservantes:** Concentración total < 0,04%

### Notas de seguridad

No ingerir los reactivos. Evitar el contacto con los ojos, piel y membranas mucosas. Todas las muestras de pacientes y **CAL** del estuche deberán ser manipulados como posibles agentes infecciosos. **CAL** han sido encontrado negativos para HBsAg y anticuerpos contra VHC y VIH 1 + 2 en los donantes. Usar ropa protectora y guantes desechables según las buenas prácticas de laboratorio (GLP).

Todos los materiales contaminados con muestras o **CAL** deben inactivarse por métodos aprobados (autoclavado o tratamiento químico) según las regulaciones aplicables.

**STOP** irrita los ojos, la piel y membranas mucosas. En caso de contacto, lavar intensamente con abundante agua y consultar un médico.

### Estabilidad

Los reactivos son estables hasta las fechas de expiración señaladas en las etiquetas individuales cuando se almacenan a 2...8°C.

Después de abiertos, los reactivos deben almacenarse a 2...8°C y utilizarse dentro de 60 días (ver "Nota").

### MIC

- están selladas en un envase de aluminio con un desecante.
- Antes de abrir, las tiras deben estar a **temperatura ambiente**.
- Las tiras no utilizadas deberán ser devueltas al envase con cierre y almacenadas con el desecante. Las tiras almacenadas de esta manera a 2...8°C pueden ser usadas hasta la fecha de expiración (ver "Nota").
- No tocar el anillo superior o el fondo de los micropocillos con los dedos.

### Preparación de reactivos

Todos los reactivos deben estar a **temperatura ambiente** (15...25°C) antes del uso. Los reactivos que no están en uso deberían siempre estar almacenados a 2...8°C.

### Solución de trabajo de Lavado **WASH**

- **Una ligera turbidez que puede aparecer en el concentrado **WS** se disuelve completamente durante la dilución.**
- Diluir **WS** a 1000 ml con agua desionizada fresca en un envase apropiado. Enjuagar el envase varias veces.
- Estabilidad: **60 días a 15...25°C.**

### Solución de trabajo Sustrato **SUB**

- **Para un uso prologado:** preparar cantidad necesaria mezclando porciones iguales **SA** y **SB**. Usar solamente un envase plástico limpio previamente enjuagado con agua desionizada.
- **Utilizar dentro de 30 días:** Verter el contenido de un frasco de **SA** en un frasco de **SB** y mezclar. Almacenar de 2...8°C.
- ¡Manipular **SUB** cuidadosamente y **evitar la contaminación!** ¡No utilizar si es de color azul!
- Almacenar la solución protegida de la luz intensa.
- Estabilidad: **30 días a 2...8°C.**

### Muestra

Suero

No usar muestras hiperlipémicas o hemolizadas.

Las muestras pueden almacenarse por 5 días a 2...8°C, o por hasta 30 días a -20°C. **Congelar y descongelar solamente una vez.** Al descongelar una muestra debe ser homogeneizada. Eliminar el material particulado por centrifugación o filtración.

### Procedimiento

**Seguir el procedimiento exactamente como se describe.**

#### Notas de uso

**U1:** No mezclar o usar componentes de diferentes números de lote. No mezclar tapas de envases (riesgo de contaminación). No usar reactivos después de sus fechas de expiración.

**U2:** No usar reactivos que pueden ser contaminados o que tienen aspecto diferente o olen diferentemente que normal.

**U3:** Notar el reparto **CAL**, las muestras y los controles cuidadosamente en la hoja provista en el estuche.

**U4:** **MIC** – sacar el número requerido y colocarlos firmemente en el portatiras.

**U5:** **Analizar** cada **CAL**, control o muestra **en duplicado. Pipetearlos en el fondo** de los micropocillos.

**P6:** **Siempre deben agregarse los reactivos en el mismo orden y tiempo para minimizar diferencias en los tiempos de reacción entre los micropocillos.** Es importante para obtener resultados reproducibles. El pipeteo de las muestras no debería exceder de 10 minutos. De lo contrario pipetear la curva **CAL** en las posiciones indicadas en la mitad del intervalo de la serie. Si se emplea más de una placa, repetir la curva de calibración.

**U7:** Evitar/remover burbujas de aire antes de las incubaciones y lecturas de absorbancia.

U8: [SUB] inicia y [STOP] termina una reacción cinética. Evitar la luz intensa durante el desarrollo del color.

U9: [MIC] - Después de cada pipeteo agitar suavemente durante 20-30 sec. sin verter las soluciones para asegurar una buena mezcla. Si disponible, mezclar en un mezclador de pocillos (p.ej. HUMAREADER).

### Procedimiento de lavado

El procedimiento de lavado es crítico. Un lavado insuficiente producirá una mala precisión o absorbancias falsamente elevadas.

L1: Remover las tiras adhesivas, aspirar el contenido, agregar [WASH], aspirar después de aproximadamente 30 sec. de enjuague y repetir el lavado.

L2: En el caso de lavadores automáticos, se deben cebar con [WASH] y lavar los pocillos 3 veces. Asegurarse que el lavador llene los pocillos completamente y los espere eficientemente después de 30 sec. (líquido remanente: < 15 µl).

L3: Después del lavado, remover el líquido remanente invirtiendo los micropocillos sobre papel absorbente.

### Esquema de pipeteo

Los reactivos y las muestras deberían estar a temperatura ambiente antes del uso.		
Etapa 1	Pocillo [µl]	
	A1...D2 Calibradores	E2... Muestras
[CAL] A-F; en duplicado	25	--
Muestras, Controles; en duplicado	--	25
[CON]	100	100
Mezclar y cubrir [MIC] con tira adhesiva		
Incubar por 60 min. a 20...25°C		
Lavar 3 veces como se describe (ver L1 – L3)		
[WASH]	300	300
Etapa 2		
[SUB]	100	100
Incubar por 15 min. a 20...25°C (ver U8)		
[STOP]	50	50
Mezclar cuidadosamente		
Medir la absorbancia a 450 nm lo más pronto posible o dentro de 10 min. después de terminar la reacción usando una longitud de onda de referencia de 630-690 nm (si está disponible).		

### Validación del análisis

Los resultados son válidos si se cumplen los siguientes criterios:

- 1) Absorbancia máxima ([CAL] F) O.D.  $\geq 1,5$
- 2) El control debe analizarse a 3 concentraciones:

Concentración de CEA a 80% de O.D.  $\text{max} = 200 \pm 50 \text{ ng/ml}$

Concentración de CEA a 50% de O.D.  $\text{max} = 100 \pm 45 \text{ ng/ml}$

Concentración de CEA a 20% de O.D.  $\text{max} = 25 \pm 15 \text{ ng/ml}$

### Cálculo

La curva dosis respuesta se usa para interpolar la concentración de CEA en muestras desconocidas.

1. [CAL] - Graficar la absorbancia de los duplicados contra la correspondiente concentración de CEA en ng/ml sobre papel milimetrado lineal (no promediar los duplicados de los calibradores antes de graficar).
2. Trazar la mejor curva a través de los puntos del gráfico.
3. Para determinar la concentración de CEA de una muestra desconocida (S), localizar el promedio de absorbancia de los duplicados sobre el eje vertical del gráfico, encontrar el punto de intersección sobre la curva y leer la concentración (en ng/ml) desde el eje horizontal del gráfico. Ver la ilustración.

### Interpretación de resultados

Desde años, CEA es el marcador de tumores lo más conocido y reconocido. Se detecta en gran número de tumores, pero no es específica para un cierto tumor o órgano.

Pacientes con un cáncer colorectal pueden no mostrar valores elevados de CEA. La progresión o la declinación de una enfermedad no resulta siempre en valores elevados de CEA. Además, los fumadores y pacientes ancianos muestran una concentración de base más alta que los no fumadores y personas jóvenes.

CEA es un marcador muy bueno para metastasis. Pueden expectarse valores muy elevados en metastasis de los huesos, del hígado, del pulmón y en metastasis múltiple.

Concentraciones elevadas persistentes después de un tratamiento indican normalmente áreas malignas remanentes o metastasis. Una disminución constante de los valores de CEA indica un progreso favorable en el tratamiento.

La determinación de los valores de CEA sólo no es suficiente para diagnosticar el cáncer. Debe evaluarse en conjunto con otros datos clínicos y parámetros diagnósticos.

### Valores esperados

	Nivel de CEA (1)
No fumadores (99%)	< 5 ng/ml
Fumadores	< 10 ng/ml

Cada laboratorio debería establecer sus propios valores esperados utilizando la instrumentación, los métodos de colección de sangre y los técnicos de análisis que se emplean normalmente en dicho laboratorio.

### Datos de rendimiento

El análisis CEA ELISA HUMAN tiene una sensibilidad analítica de aproximadamente 0,01 ng lo que equivale a una concentración de CEA en la muestra de 0,45 ng/ml.

Las muestras con una concentración de CEA de más de 250 ng/ml deben diluirse (1+9) con suero normal (CEA < 5 ng/ml) y reanalizarse. Multiplicar el resultado por 10.

El análisis se estandarizó según el estándar OMS 1° IRP para CEA humana (73/601): 1 ng/ml = 0,011 UI/ml.

Los datos típicos de ejecución de la prueba pueden ser encontrados en el informe de verificación, accesible vía

[www.human.de/data/gb/vr/el-cea.pdf](http://www.human.de/data/gb/vr/el-cea.pdf) o

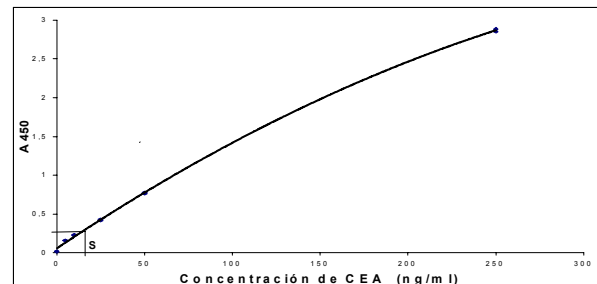
[www.human-de.com/data/gb/vr/el-cea.pdf](http://www.human-de.com/data/gb/vr/el-cea.pdf)

### Nota

Los componentes del estuche son estables hasta la expiración aún después de abiertos. Sin embargo, la posibilidad de una contaminación está directamente relacionada con el número de tomas del reactivo. Por lo tanto, el límite de 60 días en viales abiertos se fijó por razones de seguridad.

La manipulación debería siempre estar de acuerdo con las buenas prácticas de laboratorio (GLP\*). ¡Los criterios de validación del análisis deben cumplirse siempre!

(\*Esto incluye: Colocar la tapa debida en el vial y cerrarlo firmemente / Sacar de los viales de stock solamente los reactivos necesarios para la corrida si entraran en contacto con otras soluciones contaminantes como lo son las muestras, etc. / Las soluciones de stock siempre deben regresarse a 2...8°C si no se usan.)



### Referencias

- 1 Wild, D., The Immunoassay Handbook, Stockton Press, 444 (1994)
- 2 Zamcheck, N., Adv. Intern. Med. **19**, 413 (1974)
- 3 Rayncao, G., Chu, T., JAMA **220**, 381 (1972)
- 4 Begent, R., Ann. Clin. Biochem. **21**, 231-238 (1984)

EL-CEA  
INF 5202001 E  
06-2004-9



**Human**