



CanAg SCC EIA

Prod. No. 800-10

Instructions d'utilisation

Kit de Test immunoenzymatique

2009-11

Pour 96 déterminations

INFORMATION IMPORTANTE POUR LES UTILISATEURS

L'Antigène SCC est présent sur la peau, la sueur et la salive, et est facilement distribué en aérosols (par exemple, comme le résultat d'un éternuement). Dans le but d'éviter des valeurs élevées erronées dues à la contamination, des gants doivent être utilisés après l'ouverture de la boîte de Kit et pendant la procédure du Test, lors de la manipulation des flacons de Réactifs, la microplaque, les pointes de pipettes etc. En plus, toute valeur élevée doit être confirmée en répétant les tests.

UTILISATION

Le Kit CanAg SCC EIA est destiné à la détermination quantitative de l'Antigène du Carcinome à Cellules Squameuses (SCC) dans le sérum comme une aide à la gestion des Patients ayant un Carcinome à Cellules Squameuses.

RESUME ET EXPLICATION DU TEST

L'Antigène du Carcinome à Cellules Squameuses (SCC Ag) est un groupe de glycoprotéines avec un poids moléculaire ~45 kDa, dépendant de la famille des Inhibiteurs de la sérine/cystéine -protéase (1). La protéine a été isolée, à l'origine, par Kato et ses collaborateurs, du tissu humain du Carcinome à Cellules Squameuses, montrant qu'il consiste dans au moins 10 sous fractions avec un point isoélectrique différent (2). Des études plus récentes ont montré que l'Antigène SCC est composé de deux produits génétiques distincts mais hautement homogènes, SCCA1 et SCCA2 avec des spécificités d'inhibiteurs différentes(3).

L'Antigène SCC est un marqueur sérologique des Carcinomes à Cellules Squameuses du col de l'utérus, de la vulve, du poumon, de la tête et du cou et de l'œsophage (4-6). Dans le cas du Carcinome à Cellules Squameuses du col de l'utérus, un pré-traitement, avec un sérum Antigène SCC, doit être utilisé, comme facteur de pronostic, dès le début (7) et l'utilisation d'un pré-traitement à l'Antigène SCC a été suggéré pour sélectionner des patients à haut risque pour une thérapie adjuvante (4). Ensuite, pour les Patients avec des niveaux élevés en Antigène SCC avant le début du traitement, le profil des Antigènes SCC doit

être mis en corrélation avec la réponse à la Radio et à la Chimio thérapie et les mesures de l'Antigène SCC doivent aussi être utilisées pour suivre l'effet de la thérapie et pour une détection précoce d'une maladie récurrente (4).

PRINCIPE DU TEST

Le CanAg SCC EIA est en phase solide. Cet immuno-test, non-compétitif, est basé sur la technique sandwich directe.

Les Calibreurs et les échantillons de Patients sont incubés ensemble avec un Anticorps monoclonal biotinylé Anti-SCC et la Peroxydase du Raifort (HRP) étiquetés Anticorps monoclonal Anti-SCC, dans des barrettes micro-titres enduites de Streptavidine.

Après lavage, le Réactif tamponné Substrat/Chromogène (Peroxyde d'hydrogène et 3, 3',5,5' tétra métylbenzidine) est ajouté à chaque puits et la réaction enzymatique peut commencer. Pendant la réaction enzymatique, une couleur bleue se développe, si l'Antigène est présent. L'intensité de la couleur est proportionnelle à la quantité de SCC présente dans les échantillons.

L'intensité de la couleur est déterminée par un Spectrophotomètre pour plaque micro-titre à 620 nm (ou optionnellement à 405 nm après addition de Solution d'Arrêt). Les courbes de calibrage sont construites pour chaque Test en mettant sous forme graphique les valeurs d'absorbance contre la concentration de chaque Calibreur. Les concentrations en SCC des échantillons de Patients sont alors lues à partir de la courbe de calibrage.

REACTIFS

- Chaque Kit CanAg SCC EIA contient des Réactifs pour 96 Tests.
- La date d'expiration du Kit est imprimée sur l'étiquette à l'extérieur de la boîte de Kit.
- Ne pas utiliser le Kit au-delà de la date d'expiration.
- Ne pas mélanger des Réactifs de différents lots de Kit.
- Conserver les Kits à +2°/+8°C. Ne pas congeler.
- Les Réactifs ouverts sont stables, suivant le tableau ci-dessous, à condition qu'ils n'aient pas été contaminés, qu'ils aient été conservés dans leur conteneur d'origine fermé, qu'ils aient été manipulés comme prescrit et qu'ils aient été remis à +2°/+8°C immédiatement après usage.

| Composant | Quantité | Conservation et stabilité après la première ouverture |
|-----------|----------|-------------------------------------------------------|
|-----------|----------|-------------------------------------------------------|

| | | |
|---------------------------|----------|-------------------------------------|
| MICROPLA | | |
| Streptavidine | 1 Plaque | +2°/+8°C jusqu'à la date |
| Plaque Micro-titre | | d'expiration indiquée sur la plaque |

12 barrettes détachables de 8 puits enduits de Streptavidine. Après ouverture, remettre les barrettes non utilisées dans le sachet d'aluminium contenant un déshydratant et ressouder soigneusement pour les garder au sec.

| | | |
|-----------------------|------------------------|-------------------------------------------------------|
| Calibreurs SCC | 5 flacons, lyophilisés | 4 semaines à +2°/+8°C 3 mois à -20°C ou en dessous |
|-----------------------|------------------------|-------------------------------------------------------|

| | | |
|-----|-----|---|
| CAL | SCC | A |
|-----|-----|---|

1 x 0.75 ml

| | | |
|-----|-----|---|
| CAL | SCC | B |
|-----|-----|---|

1 x 0.75 ml

| | | |
|-----|-----|---|
| CAL | SCC | C |
|-----|-----|---|

1 x 0.75 ml

| | | |
|-----|-----|---|
| CAL | SCC | D |
|-----|-----|---|

1 x 0.75 ml

| | | |
|-----|-----|---|
| CAL | SCC | E |
|-----|-----|---|

1 x 0.75 ml

Les Calibreurs lyophilisés contiennent du SCC humain dans une solution tamponnée de Sel Tris-HCl contenant de la sérum albumine bovine, un excipient, un colorant inerte jaune et 0.01% de méthyl-isothiazolone (MIT) comme conservateur. La solution doit être reconstituée, avec de l'eau Distillée ou Désionisée, avant d'être utilisée.

Note: La concentration exacte en SCC est spécifique au lot et est indiquée sur l'étiquette de chaque flacon.

| | |
|---------------|-----------------|
| BIOTIN | Anti-SCC |
|---------------|-----------------|

| | | |
|-------------------------|-----------|-----------------------------------------------------------------|
| Biotine Anti-SCC | 1 x 15 ml | +2°/+8°C jusqu'à la date d'expiration indiquée sur le flacon |
|-------------------------|-----------|-----------------------------------------------------------------|

La Solution de Biotine Anti-SCC, Anticorps monoclonal de souris, à la concentration approximative de 1 µg/ml, contient un tampon de Sel Phosphate (pH 7.2), de la sérum albumine bovine, de l'immunoglobuline bovine, des agents bloquants, un détergent, un colorant inerte bleue et 0.01% de méthyl-isothiazolone (MIT) comme conservateur. La solution doit être mélangée avec le Traceur HRP Anti-SCC avant utilisation.

| Composant | Quantité | Conservation et stabilité après la première ouverture |
|-----------|----------|----------------------------------------------------------|
|-----------|----------|----------------------------------------------------------|

| | |
|------|----------|
| CONJ | Anti-SCC |
|------|----------|

| | | |
|------------------------------|-------------|-----------------------------------------------------------------|
| Traceur, HRP Anti-SCC | 1 x 0.75 ml | +2°/+8°C jusqu'à la date d'expiration indiquée sur le flacon |
|------------------------------|-------------|-----------------------------------------------------------------|

La Solution Concentrée de HRP Anti-SCC, Anticorps monoclonal de souris, à la concentration approximative 40 µg/ml, contient des conservateurs.

La solution doit être mélangée avec la Solution de Biotine Anti-SCC avant utilisation.

| | |
|------|-----|
| SUBS | TMB |
|------|-----|

| | | |
|-------------------------|-----------|-----------------------------------------------------------------|
| Substrat-HRP TMB | 1 x 12 ml | +2°/+8°C jusqu'à la date d'expiration indiquée sur le flacon |
|-------------------------|-----------|-----------------------------------------------------------------|

La Solution contient un tampon de Peroxyde d'hydrogène et du 3, 3', 5, 5' tétra méthyl-benzidine (TMB).

La solution est prête à l'emploi.

| |
|------|
| STOP |
|------|

| | | |
|-------------------------|-----------|-----------------------------------------------------------------|
| Solution d'Arrêt | 1 x 15 ml | +2°/+8°C jusqu'à la date d'expiration indiquée sur le flacon |
|-------------------------|-----------|-----------------------------------------------------------------|

La Solution est prête à l'emploi. Elle contient 0.12 M d'acide chlorhydrique.

| | |
|---------|-----|
| WASHBUF | 25X |
|---------|-----|

| | | |
|--------------------------------------|-----------|-----------------------------------------------------------------|
| Solution de Lavage Concentrée | 1 x 50 ml | +2°/+8°C jusqu'à la date d'expiration indiquée sur le flacon |
|--------------------------------------|-----------|-----------------------------------------------------------------|

Il s'agit d'une solution tampon de sel Tris-HCl avec du Tween 20. Elle contient du Germall II comme conservateur. Elle doit être diluée 25 fois avec de l'eau Distillée ou Désionisée avant utilisation.

Signes d'instabilité

Le Substrat-HRP TMB doit être incolore ou légèrement bleuté. Une couleur bleue indique que le Réactif a été contaminé et qu'il doit être détruit.

MISE EN GARDE ET PRECAUTIONS D'EMPLOI

Pour un usage diagnostic in vitro.

- Pour un usage professionnel seulement.
- Prière de se référer à la publication N° (CDC) 88-8395 de l'US Department of Health and Human Services (Bethesda, Md., US), sur les procédures de sécurité dans les Laboratoires, ou tout autre Réglementation locale ou nationale.
- Manipuler les échantillons de Patients comme potentiellement infectieux.
- Suivre les Réglementations locales pour l'élimination et le traitement de tous les déchets.

PRELEVEMENT ET MANIPULATION DES ECHANTILLONS

Le Test CanAg SCC EIA est destiné à être utilisé avec du sérum. Prélever le sang par veinopuncture et séparer le sérum selon les procédures habituelles. Les échantillons peuvent être conservés à +2°/+8°C pendant un jour. Pour des périodes plus longues, il est recommandé de conserver les échantillons à -70°C ou en dessous. Eviter la congélation et la décongélation répétée des échantillons. Il est permis de décongeler lentement, préférablement à +2°/+8°C, pendant la nuit et d'amener ainsi les échantillons à température ambiante avant analyse.

MODE OPERATOIRE

Matériels nécessaire mais non fournis avec le Kit

1. Agitateur-vibreux de plaque micro-titre

L'agitation vibration doit être de moyenne à forte. L'agitation longitudinale doit être approximativement de 200 strokes/mn et les oscillations de 700 à 900/mn.

2. Laveur de plaque Micro-titre

Laveur de microplaques automatique en mesure de réaliser 1 et 6 cycles de lavage et doté d'un volume de remplissage minimum de 350 µL/puits/cycle de lavage.

Le laveur manuel de barrettes Nunc Immuno-8 est recommandé si un laveur de microplaques automatique n'est pas utilisé.

3. Spectrophotomètre de plaque Micro-titre

Lecteur avec une longueur d'onde de 620 nm et/ou 405 nm et une échelle d'absorbance de 0 à 30

4. Pipettes de Précision

Elle doivent être avec des pointes jetables en plastique, pour la distribution de volumes de l'ordre du micro litre et du millilitre. Une pipete à 8 canaux ou une pipette distributrice, avec des pointes plastique jetables, pour la délivrance de volumes de 100 µl, est utile mais pas essentiel.

5. Eau Distillée ou Désionisée

Pour la reconstitution des Calibreurs et pour la préparation de la Solution de Lavage.

NOTES DE PROCÉDURE

1. Une parfaite compréhension de la Notice est nécessaire pour assurer un usage correct du Kit SCC EIA. Les Réactifs livrés dans le Kit en font partie intégrante et ne peuvent être utilisés séparément. Ne pas mélanger des Réactifs identiques venant de Kit ayant un numéro de lot différent. Ne pas utiliser les Réactifs du Kit après la date d'expiration imprimée à l'extérieur de la boîte de Kit.
2. Les Réactifs doivent atteindre la température ambiante (+20°/+25°C) avant utilisation. Le Test doit seulement être réalisé à des températures comprises entre +20° et +25°C, pour obtenir des résultats précis. Les échantillons congelés doivent être amenés à température ambiante lentement et doivent être agités, doucement mais complètement, après décongélation.
3. Avant de commencer à pipeter, les Calibreurs et les échantillons de Patients, il est recommandé de marquer les barrettes pour faire en sorte d'identifier clairement les échantillons pendant et après le Test.

4. La condition d'un lavage efficace et poussé requise pour séparer l'antigène et les réactifs liés et non liés des complexes anticorps-antigène liés en phase solide représente l'une des étapes les plus importantes d'un dosage immunoenzymatique. Afin d'assurer un lavage efficace, assurez-vous que : tous les puits sont complètement remplis de solution de lavage pendant chaque cycle de lavage, jusqu'à ras bord ; que la solution de lavage est distribuée à un débit approprié ; que l'aspiration des puits entre et après les cycles de lavage est bien complète ; et que les puits sont bien vides. Si du liquide reste, renversez la plaque et tapotez légèrement dessus contre du papier absorbant.
- Dispositif automatique de lavage de barrette : suivez les instructions du fabricant pour un nettoyage et un entretien diligents des barrettes et pour connaître le nombre de cycles de lavage requis avant et après chaque étape d'incubation. Il est vivement recommandé de suivre le mode processuel de barrette ou le mode de lavage en trop-plein avec un volume de 800 µL. Le dispositif d'aspiration/lavage ne doit pas rester avec de la solution de lavage sur des intervalles de temps prolongés parce que les aiguilles pourraient se boucher, ce qui aurait pour résultat une baisse de la distribution et de l'aspiration de liquide.
5. Le Substrat-HRP TMB est très sensible à la contamination. Pour une stabilité optimale du Substrat-HRP TMB, transférer la quantité requise du flacon, dans un récipient délicatement lavé, ou préférablement dans un bac jetable en plastique, pour éviter la contamination du Réactif. S'assurer de l'utilisation de pipette à pointe en plastique, propre et jetable (ou d'une pipette distributrice à pointes).
6. S'assurer de l'utilisation d'une pipette à pointe en plastique, propre et jetable, et d'une technique de pipetage correcte lors de la manipulation et des Réactifs. Eviter de passer au-dessus de la plaque, en maintenant l'embout de pipette légèrement au-dessus du haut du puits et éviter de toucher la barrette plastique ou la surface du liquide.
- Une technique de pipetage correcte est d'une importance particulière lorsque l'on manipule la Solution de Substrat-HRP TMB.

| Préparation des Réactifs | Stabilité des réactifs préparés |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
| Calibreurs SCC | 4 semaines à +2°/+8°C 3 mois à -20°C ou en dessous |
| Ajouter exactement 0.75 ml d'eau Distillée à chaque flacon et mélanger doucement. Laisser debout pendant au moins 15 minutes pour se reconstituer. NOTE: La concentration des Calibreurs est indiquée sur les étiquettes et doit être utilisée pour le calcul des résultats. | |
| Solution de Lavage | 2 semaines à +2°/+25°C en conteneur fermé |
| Transférer 50 ml de Solution de Lavage Concentrée dans un conteneur et diluer 25 fois en ajoutant 1200 ml d'eau Distillée ou Désionisée pour obtenir la Solution de Lavage tamponnée. | |
| Solution d'Anticorps | 3 semaines à +2°/+8°C |
| Préparer la quantité requise de Solution d'Anticorps en mélangeant 50 µl de Traceur, HRP Anti-SCC avec 1 ml de Biotine Anti-SCC, par barrette (voir le tableau ci-dessous et la Feuille de Protocole) | |

| N°. de Barrettes | Traceur, HRP Anti-SCC (μ l) | Biotine Anti-SCC (ml) |
|------------------|-------------------------------------|--------------------------|
| 1 | 50 | 1 |
| 2 | 100 | 2 |
| 3 | 150 | 3 |
| 4 | 200 | 4 |
| 5 | 250 | 5 |
| 6 | 300 | 6 |
| 7 | 350 | 7 |
| 8 | 400 | 8 |
| 9 | 450 | 9 |
| 10 | 500 | 10 |
| 11 | 550 | 11 |
| 12 | 600 | 12 |

S'assurer de l'utilisation d'un flacon propre en plastique ou en verre, pour la préparation de la Solution d'Anticorps.

Alternative: Transférer le contenu de Traceur, HRP Anti-SCC, dans le flacon de Biotine Anti-SCC et mélanger doucement. S'assurer que tout le Traceur, HRP Anti-SCC est transféré dans le flacon de Biotine Anti-SCC.

Note: La Solution d'Anticorps est stable pendant 3 semaines à $+2^{\circ}/+8^{\circ}\text{C}$. Ne pas préparer plus de Solution d'Anticorps qu'il ne pourra en être utilisé pendant cette période et s'assurer qu'elle sera conservée correctement .

PROCEDURE DE TEST

Réaliser chaque détermination en double pour les Calibreurs, les Contrôles et les échantillons de Patients. Une courbe de calibrage doit être réalisée pour chaque Test. Tous les Réactifs et les échantillons doivent être amenés à température ambiante ($+20^{\circ}/+25^{\circ}\text{C}$) avant utilisation.

1. Commencer par la préparation des Calibreurs SCC, de la Solution de Lavage et de la Solution d'Anticorps. Il est important d'utiliser des conteneurs propres et de suivre les Instructions soigneusement.
2. Transférer le nombre requis de barrettes de plaque micro-titre sur un portoir à barrettes (Remettre immédiatement le reste de barrettes dans le sachet d'aluminium contenant un déshydratant et ressouder soigneusement). Laver chaque barrette une fois avec la Solution de Lavage. Ne pas laver plus de barrettes qu'il ne peut en être manipulé pendant 30mn.
3. Pipeter 25 μ l de Calibreurs SCC (CAL A, B, C, D, E) et d'échantillons de Patients (inconnus-Inc) dans les puits des barrettes, suivant le schéma ci-dessous :

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 etc |
|---|----------|----------|---|---|---|---|-------|
| A | Cal A | Cal E | | | | | |
| B | Cal A | Cal E | | | | | |
| C | Cal B | Inc1 | | | | | |
| D | Cal B | Inc1 | | | | | |
| E | Cal C | Inc2 | | | | | |
| F | Cal C | Inc2 | | | | | |
| G | Cal D | Etc. | | | | | |
| H | Cal D | | | | | | |

4. Ajouter 100 µl de Solution d' Anticorps à chaque puits, en utilisant une pipette de précision 100 µl (ou une pipette de précision, 100 µl, à 8 canaux). Eviter de passer au-dessus de la plaque, en maintenant l'embout de pipette légèrement au-dessus du haut du puits et éviter de toucher la barrette plastique ou la surface du liquide.
5. Incuber le portoir à barrettes pendant 1 heure (± 5 mn) à température ambiante (+20°/+25°C) avec une agitation constante de la plaque à l'aide d'un agitateur à plaque micro-titre.
6. Laver chaque barrette 6 fois, en utilisant la procédure décrite dans les Notes de Procédures, §4.
7. Ajouter 100 µl de Substrat-HRP TMB à chaque puits en utilisant la même procédure de pipetage que dans le §4, ci-dessus. Le Substrat-HRP TMB doit être ajouté aux puits, le plus vite possible et le temps entre les additions, du premier au dernier puits, ne doit pas dépasser 5mn.
8. Incuber pendant 30 mn (± 5 mn) à température ambiante avec une agitation constante. Eviter l'exposition directe à la lumière du jour.
9. Lire l'absorbance à 620nm, immédiatement, dans un Spectrophotomètre pour plaque micro-titre.

Option

Si le Laboratoire n'a pas accès à un Spectrophotomètre pour plaque micro-titre capable de lire à 620nm, l'absorbance peut être déterminée comme suit : **Alt. 9.** Ajouter 100 µl de Solution d'Arrêt. Mélanger et lire l'absorbance à 405 nm dans un Spectrophotomètre pour plaque micro-titre, dans les 15 mn après l'addition de la Solution d'Arrêt.

Intervalle de Mesure

Le Test CanAg SCC EIA mesure des concentrations entre 0.3 et 50 µg/l. Si des concentrations en SCC en dehors de l'intervalle de mesure sont attendues, il est recommandé de diluer les échantillons avec du sérum normal humain avant analyse. **Note:** le sérum utilisé pour la dilution doit aussi être analysé pour déterminer la concentration endogène de SCC (voir le § « Calcul des Résultats »)

Contrôle Qualité

CanChek Tumor Marker Control Sera, Niveaux 1 et 2 (disponible séparément, REF 107-20) sont recommandés pour la validation de séries de Test. L'intervalle des résultats attendus est indiqué sur les étiquettes des flacons. Si les valeurs obtenues sont en dehors de l'intervalle spécifié, un contrôle complet des Réactifs et de la performance du Lecteur, doit être fait et les analyses répétées.

Matériels de Référence

Puisqu'il n'y a de matériels communs de Référence pour l'Antigène SCC, les valeurs des Calibreurs de CanAg SCC EIA sont opposées à une série de Standards de Référence maison.

CALCUL DES RESULTATS

Si un Lecteur Spectrophotomètre pour plaque micro-titre avec calcul des données intégré, est utilisé, se référer au Manuel du Lecteur de plaque et créer un programme utilisant la concentration indiquée sur les étiquettes de chacun des Calibreurs SCC.

Pour un calcul automatique de résultats de SCC, il est recommandé d'utiliser l'une ou l'autre des méthodes suivantes :

- La Courbe de Cannelure Cubique correspond à la méthode. Le Calibreur 0, doit être inclus dans la courbe avec la valeur 0 µg/l.
- La Courbe lissée de la Cannelure correspond à la méthode. Le Calibreur 0, doit être utilisé comme témoin blanc.
- Interpolation avec une évaluation point par point. Le Calibreur 0, doit être inclus dans la courbe avec la valeur 0 µg/l.
- La Courbe Quadratique correspond à la méthode. Le Calibreur 0, doit être inclus dans la courbe avec la valeur 0 µg/l.

NOTE: Les méthodes, 4-paramétrique ou de régression linéaire, ne doivent pas être utilisées.

Pour une évaluation manuelle, une courbe de calibrage est construite en mettant sous forme graphique les valeurs d'absorbance(A), obtenues pour chaque Calibreur SCC, contre les concentrations correspondantes en SCC (en µg/l), voir le graphique ci-dessous.

Les concentrations inconnues en SCC peuvent alors être lues, sur la courbe de calibrage, en utilisant la valeur moyenne de l'absorbance de chaque échantillon de Patients.

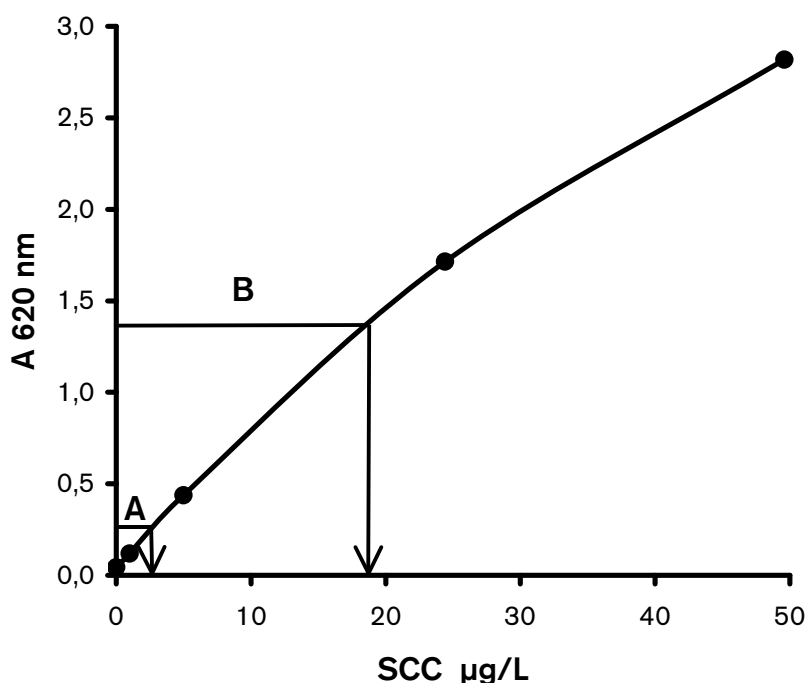
Si les échantillons, d'une analyse initiale, donnent des niveaux de SCC plus haut que 50 µg/l, ils doivent être dilués au 1/10 avec du sérum normal humain et réanalysés pour obtenir la concentration précise en SCC. **Note:** Les échantillons utilisés pour la dilution doivent être aussi analysés pour déterminer la concentration endogène en SCC.

La concentration en SCC, des échantillons non dilués, est calculée comme suit :

$$\text{DILUTION 1/10 : } 10 \times ([\text{SCC}]_{\text{ÉCHANTILLON DILUÉ}} - (0.9 \times [\text{SCC}]_{\text{SÉRUM NORMAL}}))$$

Exemple de résultats

| Calibreurs | Valeurs pour | Valeurs moyenne | SCC |
|---------------|--------------|------------------|------|
| Echantillons | Calibreurs | d'absorbance (A) | µg/l |
| Calibreur A | 0 µg/l | 0.043 | |
| Calibreur B | 1 µg/l | 0.119 | |
| Calibreur C | 5 µg/l | 0.437 | |
| Calibreur D | 24 µg/l | 1.715 | |
| Calibreur E | 50 µg/l | 2.818 | |
| Echantillon A | | 0.245 | 2.6 |
| Echantillon B | | 1.363 | 18.3 |



Exemple : (Ne pas utiliser cette courbe ou le tableau ci-dessus, pour déterminer les résultats de Test actuels)

LIMITES DE LA PROCEDURE

L'Antigène SCC est présent dans les cellules épithéliales normales squameuses et des valeurs élevées d'Antigène SCC peuvent être trouvées dans les désordres de la peau impliquant une hyper kératinisation comme le psoriasis et l'eczéma.(4,9).

Des niveaux élevés se rencontrent aussi dans des conditions bénignes comme la maladie de l'inflammation du poumon et l'insuffisance hépatique et rénale. Le niveau de SCC ne peut être utilisé ainsi comme évidence absolue de la présence ou de l'absence d'une maladie maligne, et le Test SCC ne doit pas être utilisé dans le dépistage du cancer. Le résultat du Test doit être interprété seulement en conjonction avec d'autres investigations et procédures dans le diagnostic de la maladie et la gestion des Patients et le Test SCC ne doit pas remplacer un examen clinique établi.

L'Antigène SCC est présent sur la peau, dans la sueur et la salive, et est facilement distribué en aérosols (par exemple comme le résultat d'un éternuement). Dans le but d'éviter des valeurs faussement élevées due à une contamination, des gants et un masque facial, doivent être utilisés durant la procédure de Test, lors de la manipulation des flacons de Réactifs, des plaques micro-titre, des pointes de pipettes etc. En plus, toutes les valeurs élevées doivent être confirmées en répétant le Test.

Les Anticorps Anti-Réactifs (Anticorps Anti-souris (HAMA) ou Anticorps hétérophiliques) dans l'échantillon de Patients, peuvent interférer, occasionnellement, avec le Test, bien que des agents bloquants spécifiques soient inclus dans le tampon.

VALEURS ATTENDUES

Le Test CanAg SCC EIA est utilisé pour mesurer l'Antigène SCC sur 175 donneurs de sang sains. Les plus bas et les plus haut extrêmes de l'intervalle normal sont examinés en utilisant, IFCC, traitement statistique non paramétrique recommandé. L'intervalle de référence contient 95% de la fraction centrale de la distribution de référence. La limite de référence supérieure est donc estimée comme les 97.5% de la fractile supérieure.

| | Moyenne ($\mu\text{g/l}$) | SD ($\mu\text{g/l}$) | Milieu ($\mu\text{g/l}$) | Intervalle ($\mu\text{g/l}$) | Limite de référence supérieure |
|------------------------------------|--------------------------------|---------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| Donneurs de sang sains n=175 | 0.58 | 0.24 | 0.54 | 0.16 – 1.5 | 1.2 $\mu\text{g/l}$ |

Il est recommandé à chaque Laboratoire d'établir leur propre intervalle normal pour prendre en compte les facteurs environnementaux comme le régime alimentaire, le climat, les conditions de vie, la sélection de Patients, etc... Aussi, il ne doit pas être oublié que la base propre des résultats individuels de Patients donne le meilleur point de référence pour l'interprétation des résultats du marqueur.

CARACTERISTIQUES DE LA PERFORMANCE

Précision

La précision totale est déterminée suivant la Directive EP5-A de NCCLS (10), en utilisant quatre niveaux, groupés, de sérum humain congelé, contenant de l'Antigène SCC humain additionné et 18 combinaisons de Réactifs de Kit CanAg SCC EIA différents. Chaque échantillon est pipeté au hasard (n=2/analyse) et analysé deux fois par jours pendant 20 jours.

| Echantillon | Répliques | Moyenne ($\mu\text{g/l}$) | Série SD ($\mu\text{g/l}$) | Série CV % | Entre-Jour SD ($\mu\text{g/l}$) | Entre-Jour CV % |
|-------------|-----------|--------------------------------|---------------------------------|---------------|--------------------------------------|--------------------|
| SCC 1 | 80 | 2.62 | 0.05 | 1.9 | 0.04 | 1.3 |
| SCC 2 | 80 | 7.77 | 0.16 | 2.0 | 0.15 | 1.9 |
| SCC 3 | 80 | 17.7 | 0.34 | 1.9 | 0.20 | 1.1 |
| SCC 4 | 80 | 30.2 | 0.71 | 2.4 | 0.38 | 1.3 |

Limite de Détection

La limite de détection du Test CanAg SCC EIA, est $\leq 0.3 \mu\text{g/l}$, définis comme la concentration correspondant à la moyenne des valeurs d'absorbance du Calibreur A de SCC, plus 2 Déviations Standards selon la formule :

$$\frac{2 \times \text{DS CAL A}}{\text{OD CAL B} - \text{OD CAL A}} \times [\text{CAL B}] \mu\text{g/l}$$

Récupération

Des échantillons de sérum, pointus, sont préparés en ajoutant de l'Antigène SCC humain dans des échantillons de sérum normal. La récupération de l'Antigène ajouté est dans l'intervalle 90 – 110%

Effet Crochet

Il n'a pas été observé d'Effet Crochet pour des échantillons ayant des concentrations allant jusqu'à 50 000 $\mu\text{g/l}$. **Note** : Dans le cas d'échantillons de concentrations très élevées, la couleur du Substrat peut changer du bleu au légèrement vert (et éventuellement au jaune pour des échantillons de concentration extrêmement élevée). Ceci peut entraîner des absorbances à 620nm faussement basses et dans des cas extrêmes, l'absorbance peut tomber dans l'intervalle de la courbe de calibrage et être considérée comme un Crochet.

Linéarité

Les échantillons de Patients sont dilués en série avec du sérum normal humain et analysés. Les valeurs obtenues sont entre 90 – 110% des valeurs attendues.

Spécificité

Le Test CanAg SCC EIA est basé sur deux Anticorps monoclonaux de souris, le capteur MAb SCC 140 et le détecteur MAb SCC 107 (11). La Directive EP7-P de NCCLS (12) est utilisée pour déterminer les sources possibles d'interférence.

Les substances suivantes, avec leurs concentrations correspondantes, sont testées et trouvées comme n'interférant pas avec le Test :

| | Concentration n'ayant pas d'interférence significative ($\pm 10\%$) |
|---------------------------|-----------------------------------------------------------------------|
| Lipémie (Intralipid®) | 10 mg/ml |
| Bilirubine, non conjuguée | 0.6 mg/ml |
| Hémoglobine | 5 mg/ml |

Comparaison de Méthodes

Le **CanAg SCC EIA** est comparé au **Imx SCC MEIA**.

Pour 72 échantillons humains, avec des valeurs s'étalant de 0 à 4 µg/l, l'analyse de régression linéaire des résultats donne :

$$\mathbf{CanAg\ SCC = 1.02 \times Imx\ SCC + 0.03 \quad r = 0.86}$$

Pour 138 échantillons humains, avec des valeurs s'étalant de 0 à 50 µg/l, l'analyse de régression linéaire des résultats donne :

$$\mathbf{CanAg\ SCC = 0.82 \times Imx\ SCC + 0.06 \quad r = 0.98}$$

GARANTIE

Les données de performance, présentées ici, sont obtenues en utilisant la procédure de test décrite.

Tout changement ou modification de la procédure, non recommandé par Fujirebio Diagnostics, peut affecter les résultats, dans ce cas, Fujirebio Diagnostics rejette toutes les garanties explicites, implicites ou incluant statutairement la garantie implicite de commercialisation et d'adaptation à l'utilisation.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Suminami Y., Kishi F., Sekiguchi K., Kato H. (1991) Squamous cell carcinoma antigen is a new member of the serine protease inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun* 181, 51-58.
2. Kato H. and Torigoe T. (1977) Radioimmunoassay for tumor antigen of human cervical squamous cell carcinoma. *Cancer* 40, 1621-1628.
3. Schneider S.S., Schick C., Fish K.E., Miller E., Pena J.C., Treter S.D., Hui S.M., Silverman G.A. (1995) A serine protease inhibitor locus at 18q21.3 contains a tandem duplication of the human squamous cell carcinoma antigen gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92, 3147-3151.
4. de Bruijn H.W.A., Duk J.M., van der Zee A.G.J., Pras E., Willemse P.H.B., Boonstra H., Hollema H., Mourits M.J.E., de Vries E.G.E., Aalders J.G. (1998) The Clinical Value of Squamous cell Carcinoma Antigen in Cancer of the Uterine Cervix. *Tumor Biol* 19, 505-516.
5. Vassiliakopoulos T., Troupis T., Sotiropoulou C., Zacharatos P., Katsaounou P., Parthenis D., Noussia O., Troupis G., Papiris S., Kittas C., Roussos C., Zakyntinos S., Gorgoulis V. (2001) Diagnostic and prognostic significance of squamous cell carcinoma antigen in non-small cell lung cancer *Lung Cancer* 32, 137-144.
6. Snyderman C.H., Dámico F., Wagner R., Eibling D.E. (1995) A Reappraisal of the Squamous Cell Carcinoma Antigen as a Tumor Marker in Head and Neck Cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 121, 1294-1297.
7. Duk J.M., Groenier K.H., de Bruijn H.W.A., Hollema H., ten Hoor K.A., van der Zee A.G.J., Aalders J.G. (1996) Pretreatment Serum Squamous cell Carcinoma Antigen: A Newly Identified Prognostic Factor in Early-Stage Cervical Carcinoma. *J Clin Oncol* 14, 111-118. 1997
8. Fleisher M. et al. (2002) Practice guidelines and recommendations for use of tumor markers in the clinic. *National Academy of Clinical Biochemistry* 15: p.19.
9. Yuyama N., et al., (2002) Analysis of novel disease-related genes in bronchial asthma. *Cytokine* 19(6), 287-296.
10. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices. Approved Guideline EP5-A (1999).
11. Röijer E., Nilsson K., Oskarsson M., Dahlén U., Andersson I., Nilsson O. (2003) Development of Monoclonal Antibodies and Immunoassays against different forms of Squamous Cell Carcinoma Antigens (SCCA). *Tumor Biol* 24, p. 83.
12. National Committee for Clinical Laboratory Standards, National Evaluation Protocols for Interference Testing, Evaluation protocol Number 7, Vol. 6, No 13, August (1986).



CanAg® est une Marque Déposée de Fujirebio Diagnostics AB

Fujirebio Diagnostics AB
Elof Lindälvs gata 13
SE-414 55 Göteborg
Sweden
Phone + 46 31-85 70 30
Fax + 46 31-85 70 40
info@fdab.com
www.fdab.com