



## CanAg CA15-3 EIA

Prod. No. 200-10

Istruzioni per l'uso

Dosaggio immunoenzimometrico

2009-06

96 tests

### FINALITA' DEL DOSAGGIO

Il kit CanAg CA 15-3 EIA è finalizzato alla determinazione quantitativa in siero dell' antigene tumore associato MUC-1 (CA 15-3).

### INTRODUZIONE

L'antigene MUC-1 è una glicoproteina di tipo mucinico legata alla membrana cellulare presente sulle cellule epiteliali normali e maligne di alcuni organi come ad esempio il seno, l'ovaio, il pancreas ed il colon (1). L'apoproteina della mucina MUC-1 contiene un gene transmembranico, un gene citoplasmatico ed un gene extracellulare ricco di carboidrati. Il gene extracellulare è caratterizzato da polimorfismo relativamente al numero di 20 aminoacidi ripetuti in tandem (polimorfismo VNTR). Il kit CanAg CA 15-3 EIA si basa su due anticorpi monoclonali , MA695 che riconosce l'epitopo carboidrato sialilato espresso sull'antigene di MUC-1 e Ma552 usato come tracciante che riconosce la regione PDTRPAPG del core della proteina (2, 5).

La mucina MUC-1 del tumore mammario (antigene CA15-3) viene secreta dalle cellule tumorali e viene riconosciuta come un marcatore serologico utile nel monitoraggio del decorso clinico dei pazienti affetti da tumore mammario

### PRINCIPIO DEL DOSAGGIO

Il metodo utilizzato da CanAg CA15-3 EIA è un dosaggio immunoenzimatico non competitivo in fase solida, basato sulla tecnica del sandwich diretto. I calibratori, i controlli ed i campioni dei pazienti vengono incubati con l'anticorpo monoclonale biotinilato Anti-CA15-3 e l'anticorpo monoclonale Anti CA15-3 marcato con perossidasi di rafano (HRP) in pozzetti sensibilizzati con streptavidina.

Dopo il lavaggio il reagente tamponato Substrato/Cromogeno (perossido d'idrogeno e 3, 3', 5, 5'

tetrametilbenzidina) viene dispensato in tutti i pozzetti attivando in tal modo la reazione enzimatica. Durante la reazione enzimatica si sviluppa una colorazione blu nel caso l' antigene sia presente. L'intensità del colore sviluppato è proporzionale alla concentrazione di CA15-3 presente nei campioni. L'intensità del colore viene misurata per mezzo di un lettore spettrofotometrico di micropiastre alla lunghezza d'onda di 620 nm ( oppure a 405 nm dopo l'aggiunta del Reattivo Bloccante). Le curve di calibrazione vengono estrapolate dai valori di assorbanza ottenuti alla concentrazione di ogni calibratore e su di esse viene misurata la concentrazione di CA15-3 presente nei campioni.

## REATTIVI

- Ogni kit CanAg CA15-3 EIA contiene reattivi sufficienti per eseguire 96 dosaggi
- La data di scadenza è specificata sull'etichetta posta sull'esterno della scatola del kit
- Non usare il prodotto oltre la data di scadenza
- Non mescolare reattivi provenienti da kit di lotti diversi
- Conservare i kit a 2-8°C. Non congelare
- I reattivi una volta aperti sono stabili alle condizioni descritte nella tabella che segue, a condizione che non siano contaminati, vengano conservati nei flaconi originali opportunamente chiusi e manipolati come prescritto. Riportare i reattivi a 2-8°C immediatamente dopo l'uso.

Componenti	Quantità	Stabilità e conservazione dopo apertura
------------	----------	---

### MICROPLA

<b>Micropiastra sensibilizzata</b>	1 Piastra	2-8°C fino alla scadenza riportata sulla piastra
------------------------------------	-----------	--

12x8 pozzetti a frattura predeterminata sensibilizzati con streptavidina. Dopo l'apertura rimettere immediatamente le strips non usate nell'apposita busta di alluminio contenente l'essiccatore e richiudere accuratamente in modo tale da conservare in ambiente asciutto.

<b>CA15-3 Calibratori</b>	5 flaconi	2-8° C fino alla scadenza riportata sui flaconi
---------------------------	-----------	---

CAL	CA15-3	0	0 U/mL	1 x 0.75 mL
-----	--------	---	--------	-------------

CAL	CA15-3	15	15 U/mL	1 x 0.75 mL
-----	--------	----	---------	-------------

CAL	CA15-3	50	50 U/mL	1 x 0.75 mL
-----	--------	----	---------	-------------

CAL	CA15-3	125	125 U/mL	1 x 0.75 mL
-----	--------	-----	----------	-------------

Componenti	Quantità	Stabilità e conservazione dopo apertura
------------	----------	---

CAL	CA15-3	250
-----	--------	-----

250 U/mL 1 x 0.75 mL

L'antigene MUC-1 è conservato in una soluzione salina tamponata Tris-HCl contenente sieralbumina bovina, un colorante inerte giallo e 0,01% di metil-isotiazolone ( MIT) come conservante. Pronto all'uso.

**CA15-3 Controlli** 2 flaconi 2–8° C fino alla scadenza riportata sui flaconi

CONTROL	CA15-3	1
---------	--------	---

1 x 0.75 mL

CONTROL	CA15-3	2
---------	--------	---

1 x 0.75 mL

L'antigene MUC-1 è conservato in una soluzione salina tamponata Tris-HCl contenente sieralbumina bovina e 0,01% di metil-isotiazolone ( MIT) come conservante. Pronto all'uso.

BIOTIN	Anti-CA15-3
--------	-------------

**Biotina Anti-CA15-3** 1 x 15 mL 2–8°C fino alla scadenza riportata sul flacone

Biotina Anti – CA15-3 anticorpo monoclonale murino, approssimativamente 2,5µg/mL. Contiene tampone fosfato ( pH 7.2), sieralbumina bovina, immunoglobina bovina, agenti bloccanti, un colorante blu inerte e lo 0.01% di metil-isotiazolone ( MIT ) come conservante. Da mescolare col Tracciante, HRP Anti-CA15-3, prima dell'uso.

CONJ	Anti-CA15-3
------	-------------

**Tracciante, HRP Anti-NSE** 1x0,75 mL 2–8° C fino alla scadenza riportata sul flacone

Soluzione stock di HRP Anti-CA15-3 anticorpo monoclonale murino, approssimativamente 50 µg/mL. Contiene conservanti. Mescolare con Biotina Anti-CA15-3 prima dell'uso.

Componenti	Quantità	Stabilità e conservazione dopo apertura
------------	----------	---

**DIL** | **SPE**

**Diluyente del Campione**                      2x50 mL                      2-8° C fino alla scadenza riportata sul  
flacone

Soluzione salina tamponata Tris-HCl contenente sieralbumina bovina, un colorante inerte giallo e 0,01% di metil-isotiazolone ( MIT) come conservante. Pronto all'uso. Ulteriore diluyente del campione può essere ottenuto ordinando il prodotto: " Sample Diluent CA15-3 EIA" Prod. No. 200-24 contenente 50 mL.

**SUBS** | **TMB**

**TMB HRP- Substrato**                      1x 12 mL                      2-8°C fino alla scadenza riportata sul  
flacone

Pronto all'uso. Contiene perossido d'idrogeno tamponato 3, 3', 5, 5' tetrametilbenzidina ( TMB ).

**STOP**

**Reattivo Bloccante**                      1x15 mL                      2-8°C fino alla scadenza riportata sul  
flacone

Pronto all'uso. Contiene 0.12 M HCl

**WASHBUF** | **25X**

**Tampone Lavaggio Concentrato**                      1x50 mL                      2-8°C fino alla scadenza riportata sul  
flacone

Diluire con H<sub>2</sub>O distillata x25 prima dell'uso. Soluzione tampone Tris-HCl con Tween 20. Contiene Germall II come conservante

#### Indicatori di instabilità

La soluzione TMB HRP-substrato deve essere incolore o al massimo leggermente azzurra. Una intensa colorazione blu significa che il reattivo è stato contaminato e pertanto non deve essere usato.

## **AVVERTENZE E PRECAUZIONI**

### **Per uso diagnostico in vitro**

- Solamente per uso professionale
- Come riferimento si consiglia la pubblicazione No. ( CDC ) 88-8395 del US Department of Health and Human Service o qualsiasi altro regolamento locale o nazionale relativo alle Norme di Sicurezza da seguire nei Laboratori Diagnostici
- Manipolare i campioni dei pazienti come potenzialmente infetti
- Seguire le normative vigenti relative all'eliminazione del materiale usato

### **Precauzioni**

Il materiale usato nella preparazione dei reattivi di origine umana è stato testato e trovato Non Reattivo per l'anticorpo anti-HIV 1-2, per l'anticorpo anti-HCV e per l'antigene di superficie dell'Epatite B (HbsAg). Tuttavia poichè nessun metodo diagnostico è in grado di escludere completamente la possibilità di trasmissione di infezioni attraverso il sangue si consiglia di manipolare questi reattivi di origine umana come potenzialmente infettivi.

## **PRELIEVO E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI**

Il kit CanAg CA15-3 EIA richiede l'uso di campioni di siero umano. Prelevare il sangue per via venosa e separare il siero seguendo le normali procedure. I campioni si possono conservare a 2-8°C per 24 ore. Per periodi più lunghi conservare i campioni ad almeno -70°C. Provette contenenti gel non devono essere usate se il campione deve essere conservato a lungo. I campioni non devono essere conservati in congelatori a scongelamento automatico. Evitare il scongelamento ed il ricongelamento ripetuto dei campioni . Effettuare il scongelamento lentamente a 2-8°C durante la notte e portare quindi i campioni a temperatura ambiente prima del dosaggio.

## **PROCEDIMENTO OPERATIVO**

### **Materiali richiesti per il dosaggio ma non forniti con il kit**

#### **1. Agitatore di micropiastre**

L'agitazione va effettuata con modalità mediamente vigorose. L'agitazione longitudinale deve essere tarata sulle 200 rotazioni/min e 700-900 oscillazioni/min.

#### **2. Lavatore di micropiastre**

Lavatore di micropiastre automatico in grado di effettuare da 1 a 6 cicli di lavaggio o lavatore di micropiastre semiautomatico collegato ad una pompa a vuoto od aspiratore collegato ad una pompa a vuoto con contenitore per i liquidi aspirati. Si consiglia il lavatore di strip manuale Nunc Immuno-8 nel caso che un lavatore di micropiastre automatico non sia disponibile.

#### **3. Spettrofotometro per micropiastre**

Lettore spettrofotometrico con lunghezza d'onda a 620nm e/o 405nm ed un intervallo di assorbanza da 0 a 3.0.

#### 4. Pipette di precisione

Con puntali a gettare in grado di dispensare millilitri. Utili ma non indispensabili per dispensare 100 µl sono le pipette a 8 canali o le pipette graduate con puntali di plastica a gettare.

#### 5. Acqua distillata o deionizzata

Per la preparazione della soluzione di lavaggio diluita.

#### NOTE

1. La comprensione globale di questo libretto d'istruzioni garantisce l'uso appropriato del kit CanAg CA15-3 EIA. I reattivi forniti col kit devono essere usati come una unità integrale. Non mescolare reattivi di kits con differente numero di lotto. Non usare i reattivi dopo la data di scadenza indicata sull'esterno della scatola del kit.
2. Portare i reattivi a temperatura ambiente (20-25°C) prima dell'uso. Il dosaggio deve essere effettuato ad una temperatura compresa tra 20-25° C per ottenere risultati accurati. I campioni congelati devono essere gentilmente ma accuratamente mescolati dopo il scongelamento.
3. Prima di dispensare i calibratori ed i campioni dei pazienti è consigliabile segnare le strip in modo tale da poterle facilmente identificare durante e dopo il dosaggio.
4. Un lavaggio efficace per la separazione dei reagenti legati e non legati dal complesso antigene-anticorpo adsorbito in fase solida è uno dei requisiti più importanti in un test EIA. Per garantire un lavaggio efficiente, occorre accertare che: in ogni ciclo di lavaggio tutti i pozzetti siano completamente riempiti fino al bordo superiore dalla soluzione di lavaggio; la soluzione di lavaggio sia dispensata con un flusso appropriato; l'aspirazione del liquido nei pozzetti, tra e dopo ogni ciclo di lavaggio, sia completa e che i pozzetti siano perfettamente asciutti. Nel caso in cui rimanga del liquido residuo sul fondo dei pozzetti, capovolgere la micropiastra, premendola con cura contro della carta assorbente.
  - Lavaggio automatico: Seguire le istruzioni del produttore per una accurata pulizia e manutenzione ed effettuare il numero richiesto di cicli di lavaggio prima e dopo ogni incubazione. Si raccomanda vivamente di utilizzare la modalità di trattamento delle strip e la modalità di lavaggio overflow con un volume di dispensazione di 800 µL. Il sistema di lavaggio ed aspirazione non va lasciato per lunghi periodi a contatto della soluzione di lavaggio, altrimenti si rischia l'intasamento degli ugelli e quindi una dispensazione e un'aspirazione insufficienti.
5. Il TMB HRP-Substrato è molto sensibile alla contaminazione. Per garantire una stabilità ottimale del TMB HRP-Substrato versare la quantità necessaria dal flacone in un contenitore accuratamente pulito o preferibilmente in una vaschetta di plastica monouso in modo da evitare la contaminazione del reattivo. Usare puntali di plastica puliti monouso (o puntali di pipetta graduata).
6. Assicurarsi di usare pipette con puntali di plastica monouso ed un appropriata tecnica di pipettamento manipolando campioni e reattivi. Tenere il puntale della pipetta leggermente al di sopra del bordo superiore del pozzetto, evitando di toccare la plastica della strip o la superficie del liquido per non provocare contaminazione fra i pozzetti (carry over). Un appropriata tecnica di pipettamento è particolarmente importante quando si maneggia il TMB HRP-Substrato.

<b>Preparazione dei reattivi</b>	<b>Stabilità dei reattivi ricostituiti</b>
<b>Soluzione Lavaggio</b>	2 settimane a 2-25°C in un contenitore accuratamente chiuso

Versare 50 mL di Tampone Lavaggio concentrato in un contenitore pulito e diluire x25 aggiungendo 1200 mL di acqua distillata o deionizzata ottenendo in tal modo una Soluzione Lavaggio tamponata

<b>Soluzione Anticorpi</b>	3 settimane a 2-8°C In un contenitore accuratamente chiuso
----------------------------	---

Preparare la quantità di Soluzione Anticorpi necessaria mescolando 50 µL di Tracciante HRP Anti-CA15-3 con 1 mL di Biotina Anti-CA15-3 per strip (vedere la tabella sottostante).

<b>No. di Strips</b>	<b>Tracciante, HRP Anti-CA15-3 (µL)</b>	<b>Biotina Anti-CA15-3 (mL)</b>
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

Assicurarsi di usare un flacone di plastica o di vetro pulito per la preparazione della Soluzione Anticorpi

**Alternativa:** Versare il contenuto del flacone del Tracciante, HRP Anti-CA15-3 nel flacone di Biotina Anti-15-3 e mescolare gentilmente. Assicurarsi che tutto il contenuto del flacone del Tracciante, HRP Anti-CA15-3 sia stato effettivamente trasferito in quello della Biotina Anti-CA15-3.

**NOTA:** la Soluzione Anticorpi è stabile per 3 settimane a 2-8°C. Non preparare più Soluzione Anticorpi del necessario ed assicurarsi che venga conservata correttamente.

### Procedimento Analitico

Eseguire in duplicato il dosaggio dei calibratori, controlli e dei campioni. Eseguire una curva di calibrazione per ogni seduta analitica. Tutti i reattivi ed i campioni devono essere portati a temperatura ambiente ( 20-25°C) prima di eseguire il dosaggio.

1. Iniziare a preparare la Soluzione Lavaggio e la Soluzione Anticorpi. E' importante usare contenitori puliti. Seguire attentamente le istruzioni.

2. Diluire i campioni 1:41 mescolando 25µL di campione con 1 mL di Diluente del Campione.

**NOTA:** i calibratori ed i controlli CA15-3 numero 1 e 2 **non** devono essere diluiti.

3. Trasferire il numero necessario di strips nell'apposito supporto (riporre immediatamente le restanti strips nella busta di alluminio contenente un essiccante e sigillare attentamente). Lavare ogni strip una volta con la Soluzione Lavaggio. Non lavare un numero maggiore di strips di quelle che possono essere usate in 30 minuti.

4. Pipettare 25µL dei calibratori CA15-3(CAL0, 15, 50, 125, 250), dei controlli (C1, C2) e dei campioni diluiti (Unk) nei pozzetti seguendo lo schema sottoindicato:

	1	2	3	4	5	6	7 etc
A	Cal 0	Cal 250	Unk2				
B	Cal 0	Cal 250	Unk2				
C	Cal 15	C1	Etc.				
D	Cal 15	C1					
E	Cal 50	C2					
F	Cal 50	C2					
G	Cal 125	Unk1					
H	Cal 125	Unk1					

5. Aggiungere 100 µL di Soluzione Anticorpo ad ogni pozzetto usando una pipetta di precisione (od una pipetta di precisione da 100 µL ad 8 canali) Tenere il puntale della pipetta leggermente al disopra del bordo superiore del pozzetto, evitando di toccare la plastica della strip o la superficie del liquido per evitare la contaminazione (carry over).

6. Incubare la micropiastra per 2ora (± 5 min) a temperatura ambiente ( 20-25°C) agitando in continuazione con un agitatore per micropiastre.

7. Lavare 6 volte ogni strip, usando il procedimento di lavaggio descritto nelle Note Procedurali al punto 4.

8. Aggiungere 100 µL di TMB HRP Substrato ad ogni pozzetto usando la stessa procedura descritta al punto 5. Il TMB HRP Substrato deve essere dispensato nei pozzetti il più velocemente possibile ed il tempo di dispensazione fra il primo e l'ultimo pozzetto non deve superare i 5 minuti.

9. Incubare per 30 min ( $\pm$  5 min) a temperatura ambiente con costante agitazione. Evitare l'esposizione diretta alla luce del sole.
10. Leggere subito l'assorbanza a 620nm usando uno spettrofotometro per micropiastre.

### **Opzione**

Se uno spettrofotometro per micropiastre in grado di leggere a 620 nm non è disponibile in laboratorio la densità ottica può essere determinata come descritto al punto 11.

**Alternativa 11:** Aggiungere 100 $\mu$ L di Reattivo Bloccante, mescolare e leggere l'assorbanza a 405 nm con uno spettrofotometro per micropiastre entro 15 minuti.

### **Intervallo di misura**

CanAg CA15-3 EIA misura concentrazioni comprese fra 1 e 250 U/mL. Se si devono misurare concentrazioni superiori si raccomanda di diluire i campioni 1/400 ed 1/4000 con il Diluente del Campione prima del dosaggio.

### **Controllo di Qualità**

I controlli CA15-3 numero 1 e 2 possono essere usati per la validazione delle serie analitiche. Gli intervalli dei risultati attesi sono indicati sulle etichette dei flaconi. Se si ottengono valori al di fuori degli intervalli indicati, bisogna effettuare un controllo completo della funzionalità dei reattivi e del lettore e l'analisi deve essere ripetuta. Si raccomanda a tutti i laboratori di preparare i propri pool di sieri a diverse concentrazioni da usare come controlli interni per garantire la precisione del dosaggio.

### **Riferimenti**

Poiché non esistono riferimenti ufficiali per l'antigene MUC-1 (CA15-3), il valore dei calibratori di CanAg CA15-3 EIA vengono definiti sulla base di un set di standard di riferimento interno.

## **CALCOLO DEI RISULTATI**

Se viene usato uno spettrofotometro con procedimento di calcolo programmato consultarne il manuale e creare un programma usando le concentrazioni riportate sulle etichette di ogni calibratore CA15-3.

Per il calcolo automatico dei risultati CA15-3 si raccomanda di usare uno dei seguenti metodi:

- Metodo di fitting con curva spline cubica: inserire il calibratore 0 nella curva col valore 0 U/mL
- Metodo di fitting con curva spline linearizzata. Usare il calibratore 0 come bianco della micropiastre
- Interpolazione con valutazione punto a punto. Il calibratore 0 deve essere incluso nella curva col valore 0 U/mL
- Metodo di fitting con curva quadratica. Il calibratore 0 deve essere incluso nella curva col valore 0 U/mL

**Nota:** Si sconsiglia di usare metodi di valutazione 4-parametrica o di regressione lineare.

Per la misurazione manuale la curva di calibrazione si traccia riportando su grafico lineare-lineare i valori di assorbanza (A) ottenuti per ogni calibratore CA15-3 contro la corrispondente concentrazione di CA15-3 espressa in U/mL (vedi figura). Le concentrazioni ignote di CA15-3 possono quindi essere estrapolate dalla curva di calibrazione usando il valore medio di assorbanza di ogni campione Se, ad una prima analisi, la concentrazione di CA15-3 è superiore a 250 U/mL, i campioni diluiti ( 1/41) devono essere ulteriormente diluiti 1/10 ed 1/100 con il Diluente del Campione per ottenere una accurata concentrazione di CA15-3 nei campioni. Il risultato viene quindi calcolato con il seguente procedimento:

Diluizione 1/10 = 50 µL of campione + 450 µL di Diluente del Campione

Diluizione 1/100 = 50 µL della diluizione 1:10 + 450 µL di Diluente del Campione

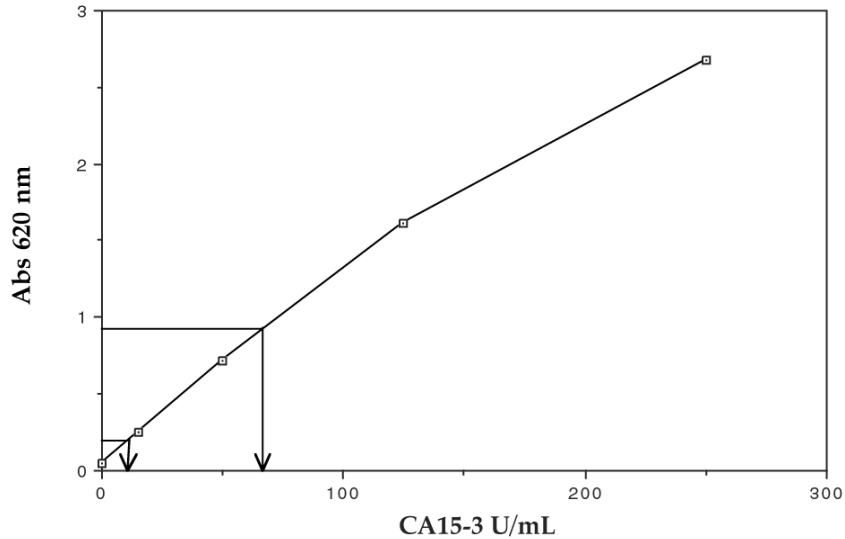
La concentrazione di CA15-3 nei campioni indiluiti viene calcolata come segue:

Diluizione 1/10: 10 x il valore misurato

Diluizione 1/100: 100 x il valore misurato

#### Esempio di risultati

Campioni			Valore dei Calibratori	Valore medio (A)	CA15-3 U/mL
CAL	CA15-3	0	0 U/mL	0.044	
CAL	CA15-3	15	15 U/mL	0.252	
CAL	CA15-3	50	50 U/mL	0.723	
CAL	CA15-3	125	125 U/mL	1.612	
CAL	CA15-3	250	250 U/mL	2.680	
Campione A				0.241	14.1
Campione B				0.895	63.1



*Esempio ( non usare questa curva o la tabella sopra riportata per determinare veri risultati).*

## LIMITI DEL DOSAGGIO

La concentrazione di CA15-3 non può essere intesa come evidenza assoluta della presenza o della assenza di patologia tumorale ed il dosaggio di CA15-3 non deve essere usato per lo screening del tumore. I risultati del dosaggio sono interpretabili solo unitamente ad altri sistemi di investigazione della diagnosi della malattia ed il dosaggio di CA15-3 non può sostituire altri metodi consolidati di valutazione clinica.

Anticorpi diretti contro agenti contenuti nei reattivi (anticorpi umani anti -topo (HAMA) od anticorpi eterofili) presenti nel siero dei pazienti possono occasionalmente interferire nel dosaggio, anche se specifiche sostanze bloccanti sono contenute nel tampone.

## VALORI ATTESI

CanAg CA15-3 è stato dosato in 51 donatrici di sangue sane. Il valore medio ottenuto è stato 15 U/ml con una deviazione standard di 6, 8. Il valore mediano è stato 13,8 U/mL, con un intervallo di 6-36 U/mL. Gli estremi superiori ed inferiori dell'intervallo di normalità sono stati esaminati usando il modello statistico non parametrico raccomandato da IFCC. L'intervallo di riferimento contiene il 95% della frazione centrale della distribuzione di riferimento. Conseguentemente i limiti di riferimento possono essere stimati al 2,5% (inferiore) ed al 97,5% (superiore) percentili. Questi limiti escludono una frazione del 2,5% dei valori di ogni coda della distribuzione di riferimento.

Stime non parametriche: N = 51

Frazione	Limite di riferimento (U/mL)
2.5 <sup>th</sup> (inferiore)	7
97.5 <sup>th</sup> (superiore)	36

94% delle donne sane presentava un valore di CA 15-3 inferiore alle 30U/mL.

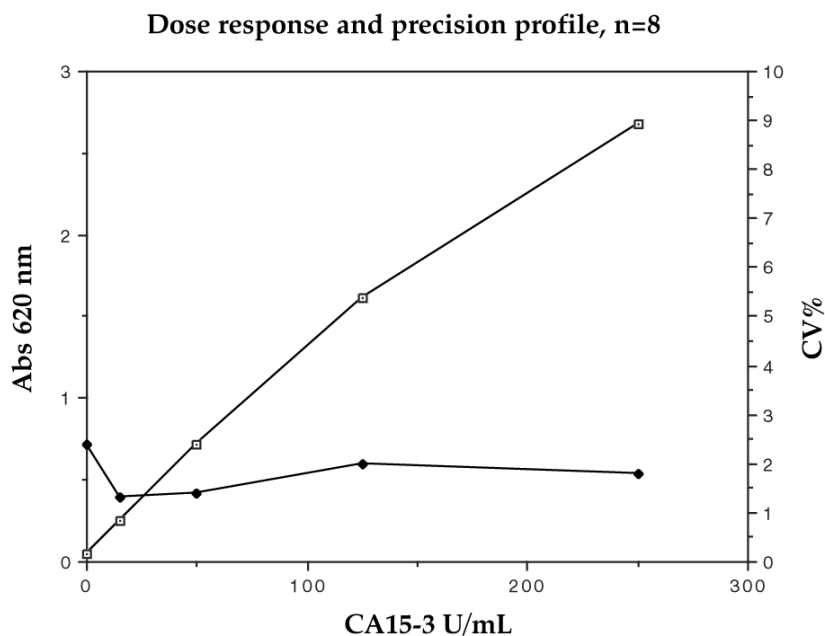
Si raccomanda ad ogni laboratorio di definire il proprio intervallo di normalità per tenere conto di fattori ambientali locali quali la dieta, il clima, le condizioni di vita, il criterio di scelta dei pazienti, ecc.

E' opportuno inoltre considerare che l' anamnesi clinica del paziente rappresenta il più importante riferimento nell'interpretazione del valore del marcatore tumorale.

## PRESTAZIONI METODOLOGICHE

### Precisione

La precisione totale è stata determinata in accordo con NCCLS direttiva EP5-A (7) usando quattro livelli di pool di sieri umani congelati con aggiunta di CA15-3 umana. Ogni campione è stato pipettato a caso (n=2/analisi) in ed analizzato due volte al giorno per 20 giorni consecutivi. I dosaggi sono stati effettuati durante un periodo di 40 mesi da  $\geq$  tre differenti operatori usando 20 lotti diversi di kit CanAg CA15-3 EIA.



Campione	Replicati	Media (U/mL)	Intrasaggio SD (U/mL)	Intrasaggio CV %	Interdies SD (U/mL)	Interdies CV %
CA15-3 1	80	15.8	0.55	3.5	1.16	7.3
CA15-3 2	80	57.0	1.73	3.0	6.37	11
CA15-3 3	80	78.6	2.93	3.7	5.29	6.7
CA15-3 4	80	148	4.86	3.3	8.37	5.6

### Limiti del dosaggio

Il limite del dosaggio del kit CanAg CA15-3 EIA è < 1 U/mL definito come la concentrazione corrispondente alla media dei valori di assorbanza del calibratore 0 di CA15-3 più 2 deviazioni standard secondo la formula:

$$\frac{2 \times \text{SD CAL 0}}{\text{OD CAL 15} - \text{OD CAL 0}} \times 15 \text{ U/mL}$$

### Recupero

Campioni di siero sono stati preparati aggiungendo CA15-3 umano a campioni di siero normali.

Il recupero dell'antigene aggiunto è stato nell'intervallo 95-110%.

### Effetto gancio

Nessun effetto gancio si è verificato fino ad una concentrazione di 7200 U/mL.

**NOTA:** in campioni ad alta concentrazione il colore del substrato varia dal blu al verdastro (ed eventualmente giallo in campioni ad altissima concentrazione). Questo fatto comporta una densità ottica erroneamente bassa a 620 nm, ed in casi estremi la densità ottica può ricadere all'interno della curva di calibrazione provocando l'effetto gancio.

### Linearità

Campioni di pazienti sono stati diluiti con il Diluente del Campione e dosati. I valori ottenuti si posizionavano nell'intervallo 93-102% dei valori attesi nell'intervallo 25-250 U/mL.

### Specificity

Il kit CanAg CA15-3 EIA si basa su due anticorpi monoclonali di origine murina, il Mab MA695 che si lega ad un epitopo sialilato carboidrato ed il Mab Ma552 che evidenzia il peptide idrofilico PDTRPAPG del core della proteina.

EP7-P (8) di NCCLS è stata seguita per determinare possibili fonti d'interferenza. Le seguenti sostanze sono state analizzate alle concentrazioni indicate e sono state trovate non interferenti nel dosaggio.

---

	<b>Concentrazione con interferenza non significativa (± 10%)</b>
Lipemia (Intralipid®)	10 mg/mL
Bilirubina libera	0.6 mg/mL
Emoglobina	5 mg/mL

---

## **AVVERTENZE**

I dati di funzionalità presentati sono stati ottenuti usando il procedimento analitico descritto in questo libretto d'istruzioni. Ogni variazione o modifica del procedimento analitico non indicato da Fujirebio Diagnostics può alterare i risultati. In questo caso Fujirebio Diagnostics non si assume alcuna delle responsabilità espresse, implicite o legali, inclusa la responsabilità implicita della commerciabilità e della proprietà d'uso.

## REFERENCES

1. Bon, G., Kenemans, P., Yedema, C.A., vanKamp, G.J., Nijman, H.W., and Hilgers, J. (1990) Clinical relevance of the tumor marker CA15.3 in the management of cancer patients in "From Clone to Clinic" p. 111-122, Crommelin and Schellekens (eds.) Kluwer Academic Publishers
2. Nilsson O., Karlsson B., Lindholm L., Pettersson A. (1994) Development of assays for determination of MUC-1 breast cancer antigen, 7th Symposium on Tumor Markers, Hamburg 1993, R Klapdor (ed) Current Tumor Diagnostics: Applications, Clinical Relevance, Research, Trends. W. Zuckswerdth Verlag München, 1994.
3. Baeckström D., Nilsson O., Price MR, Lindholm L., and Hansson GC. (1993) Discrimination of MUC1 mucins from other Sialyl-Le<sup>a</sup>-carrying glycoproteins by colon carcinoma cells using a novel monoclonal antibody. *Cancer Res.*, 53: 755.
4. Blockzijl A, Nilsson K, and Nilsson O. (1998) Epitope characterization of MUC1 antibodies *Tumor Biology* 19 suppl. 1:46-56
5. Price M.R. et al., (1998) Summary Report on the ISOBM TD-4 Workshop: Analysis of 56 Monoclonal Antibodies against the MUC1 Mucin *Tumor Biology* 19 suppl. 1:1-20
6. Fleisher M. et al. (2002) Practice guidelines and recommendations for use of tumor markers in the clinic. *National Academy of Clinical Biochemistry* 15: 26-29.
7. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices. Approved Guideline EP5-A (1999).
8. National Committee for Clinical Laboratory Standards, National Evaluation Protocols for Interference Testing, Evaluation protocol Number 7, Vol. 6, No 13, August (1986).



---

CanAg<sup>®</sup> è un marchio registrato di Fujirebio Diagnostics AB

Fujirebio Diagnostics AB  
Elof Lindälvs gata 13  
PO BOX 121 32  
SE-402 42 Göteborg  
Sweden  
Phone + 46 31-85 70 30  
Fax + 46 31-85 70 40  
info@fdab.com  
www.fdab.com