



CanAg CA242 EIA

Prod. No. 101-10

Istruzioni per l'uso

Dosaggio immunoenzimometrico

2009-06

96 tests

FINALITA' DEL DOSAGGIO

Il kit CanAg CA 242 EIA è finalizzato alla determinazione quantitativa in siero dell' antigene tumorale CA242.

INTRODUZIONE

Il marcatore tumorale CA242 è riconosciuto dall'anticorpo monoclonale C242. La struttura chimica del determinante antigenico è parzialmente sconosciuta, ma si è dimostrato che il determinante ha una struttura sialilata carboidrata. Nel siero CA242 si presenta sullo stesso complesso mucinico di CA50 e di sialilato Lewis (CA19-9). Pertanto CA242 è simile ma non identico all'epitopo del CA19-9 (1, 2). Le concentrazioni sieriche di CA242 sono basse nei soggetti sani ed in quelli con patologie benigne, mentre normalmente s'innalzano nel siero di pazienti con tumore gastro-intestinale (3).

Il marcatore tumorale CA242 può essere usato come un'aiuto nella diagnosi e nel follow-up di pazienti affetti da tumori gastrointestinali diagnosticati o sospetti (4, 9). Il kit CanAg 242 EIA non deve essere usato in alternativa ad alcun metodo consolidato di valutazione clinica del tumore, ma può essere usato come complemento agli attuali metodi clinici e di laboratorio.

PRINCIPIO DEL DOSAGGIO

Il metodo utilizzato da CanAg CA242 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 biotilinato Anti-CA242 (Mab) 241 in pozzetti sensibilizzati con streptavidina. CA242 presente nei calibratori, nei controlli e nei campioni viene adsorbito nei pozzetti sensibilizzati con streptavidina attraverso Mab anti CA242 biotilinato durante l'incubazione i pozzetti vengono quindi lavati ed incubati con Mab anti-CA242 legato a perossidasi da rafano (HRP). 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 CA242 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 CA242 presente nei campioni.

REATTIVI

- Ogni kit CanAg CA242 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

Micropiastra sensibilizzata	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.

CA242 Calibratori	5 flaconi	2-8°C fino alla scadenza riportata sui flaconi
--------------------------	-----------	--

CAL	CA242	15	1 x 0.75 mL
-----	-------	----	-------------

CAL	CA242	50	1 x 0.75 mL
-----	-------	----	-------------

CAL	CA242	100	1 x 0.75 mL
-----	-------	-----	-------------

CAL	CA242	150	1 x 0.75 mL
-----	-------	-----	-------------

L'antigene umano CA242 è conservato in una soluzione salina tamponata Tris-HCl contenente sieralbumina bovina, un colorante inerte giallo e 0,05% di sodio azide (NaN₃) come conservante. Pronto all'uso.

Componenti	Quantità	Stabilità e conservazione dopo apertura			
CA242 Controlli	2 flaconi	2-8°C fino alla scadenza riportata sui flaconi			
<table border="1"><tr><td>CONTROL</td><td>CA242</td><td>1</td></tr></table>	CONTROL	CA242	1	1 x 0.75 mL	
CONTROL	CA242	1			
<table border="1"><tr><td>CONTROL</td><td>CA242</td><td>2</td></tr></table>	CONTROL	CA242	2	1 x 0.75 mL	
CONTROL	CA242	2			

L'antigene umano CA242 è conservato in una soluzione salina tamponata Tris-HCl contenente sieralbumina bovina e 0,05% di sodio azide (NaN₃) come conservante. Pronto all'uso.

<table border="1"><tr><td>BIOTIN</td><td>Anti-CA242</td></tr></table>	BIOTIN	Anti-CA242		
BIOTIN	Anti-CA242			
Biotina Anti-CA242	1 x 15 mL	2-8°C fino alla scadenza riportata sul flacone		

Biotina Anti-CA242 anticorpo monoclonale murino, approssimativamente 1,5µg/mL. Contiene soluzione salina tamponata con Tris-HCl (pH 7.75), sieralbumina bovina, immunoglobina bovina, agenti bloccanti, un detergente, un colorante rosso inerte e lo 0.05% di sodio azide (NaN₃) come conservante. Pronto all'uso.

<table border="1"><tr><td>CONJ</td><td>Anti-CA242</td></tr></table>	CONJ	Anti-CA242		
CONJ	Anti-CA242			
Tracciante, HRP Anti-CA242	1 x 0,75 mL	2-8° C fino alla scadenza riportata sul flacone		

Soluzione stock di HRP Anti-CA242 anticorpo monoclonale murino, approssimativamente 40 µg/mL. Contiene conservanti. Diluire con il Diluente del Tracciante prima dell'uso.

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

DIL	CONJ
-----	------

Diluente del Tracciante	1 x 15 mL	2-8° C fino alla scadenza riportata sul flacone
--------------------------------	-----------	---

Soluzione salina tamponata con Tampone Fosfato (pH 7.2) con sieroalbumina bovina, immunoglobulina bovina, agenti bloccanti, un detergente, un colorante blu inerte e 0,01% di metiliso tiazolone (MIT) come conservante. Pronto all'uso.

SUBS	TMB
------	-----

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

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

STOP

Reattivo Bloccante	1 x 15 mL	2-8°C fino alla scadenza riportata sul flacone
---------------------------	-----------	--

Contiene 0.12 M HCl. Pronto all'uso

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

Tampone Lavaggio Concentrato	1 x 50 mL	2-8°C fino alla scadenza riportata sul flacone
-------------------------------------	-----------	--

Diluire con H₂O distillata x25 prima dell'uso. Soluzione tampone Tris-HCl con Tween 20. Contiene Germall II come conservante. Diluire con acqua distillata x 25 prima dell' uso.

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
- I reattivi contengono sodio azide (NaN_3) come conservante. Il sodio azide può reagire con piombo e rame formando azidi metallici altamente esplosivi. Quando i reattivi vengono scartati lavare con abbondante quantità di acqua per prevenire il rischio di reazione dell'azide
- 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 CA242 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 -20°C. Evitare il congelamento ed il ricongelamento ripetuto dei campioni. Effettuare il congelamento 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, 3 e 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 CA242 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 (20-28°C) prima dell'uso. Il dosaggio deve essere effettuato ad una temperatura compresa tra 20-28°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.

Preparazione dei reattivi	Stabilità dei reattivi ricostituiti
----------------------------------	--

Soluzione Lavaggio	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.

Tracciante-Soluzione di lavoro	3 settimane a 2-8°C in un contenitore accuratamente chiuso
---------------------------------------	---

Preparare la quantità richiesta di Soluzione di lavoro del Tracciante mescolando 50 µL di Tracciante, HRP Anti-CA242 con 1 mL di Diluente del Tracciante per strip (vedi tabella):

No. di Strips	Tracciante, HRP Anti-CA242 (µL)	Diluente del Tracciante (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

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-CA242 nel flacone del Diluente del Tracciante e mescolare gentilmente. Assicurarsi che tutto il contenuto del flacone del Tracciante, HRP Anti-CA242 sia stato effettivamente trasferito in quello del Diluente del Tracciante.

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

Procedimento Analitico

Eseguire in duplicato il dosaggio dei calibratori, 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 di lavoro del Tracciante. E' importante usare contenitori puliti. Seguire attentamente le istruzioni.
2. 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.
3. Pipettare 25 µL dei calibratori CA242 (CAL0, 15, 50, 100, 150), 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 150	Unk2				
B	Cal 0	Cal 150	Unk2				
C	Cal 15	C1	Etc.				
D	Cal 15	C1					
E	Cal 50	C2					
F	Cal 50	C2					
G	Cal 100	Unk1					
H	Cal 100	Unk1					

4. Aggiungere 100 µL di Biotina Anti-CA242 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).
5. Incubare la micropiastra per 2 ore (\pm 10 min) a temperatura ambiente (20-28°C) agitando in continuazione con un agitatore per micropiastre.
6. Dopo la prima incubazione aspirare e lavare ogni strip 3 volte usando la stessa procedura di lavaggio descritta nelle note Procedurali al punto 4.
7. Aggiungere 100 µL della soluzione di lavoro del Tracciante ad ogni pozzetto. Usare la stessa procedura di pipettamento descritta nelle note procedurali al punto 4.
8. Incubare per 1 ora (\pm 5 min) a temperatura ambiente (20-28°C) con costante agitazione.

9. Dopo la seconda incubazione aspirare e lavare ogni strip 6 volte, usando il procedimento di lavaggio descritto nelle note Procedurali al punto 4.
10. Aggiungere 100 μ L di TMB HRP Substrato ad ogni pozzetto usando la stessa procedura descritta al punto 4. 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.
11. Incubare per 30 min (\pm 5 min) a temperatura ambiente con costante agitazione. Evitare l'esposizione diretta alla luce del sole.
12. 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 12.

Alternativa 12: Aggiungere 100 μ L di Reattivo Bloccante, mescolare e leggere l'assorbanza a 405 nm con uno spettrofotometro per micropiastre entro 15 minuti dopo l'aggiunta del Reattivo Bloccante.

Intervallo di misura

CanAg CA242 EIA misura concentrazioni comprese fra 1 e 150 U/mL. Se si devono misurare concentrazioni superiori si raccomanda di diluire i campioni con siero umano normale prima del dosaggio.

NOTA: Il siero usato per la diluizione deve anche essere testato per determinare la concentrazione di CA242 endogena (vedi "Calcolo dei risultati").

Controllo di Qualità

I controlli CA242 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 CA242, il valore dei calibratori di CanAg CA242 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 CA242.

Per il calcolo automatico dei risultati CA242 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 micropiastro.
- 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 CA242 contro la corrispondente concentrazione di CA242 espressa in U/mL (vedi figura). Le concentrazioni ignote di CA242 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 CA242 è superiore a 150 U/mL, i campioni devono essere diluiti 1/10 con siero umano normale e rianalizzati per ottenere una accurata concentrazione di CA242 nei campioni.

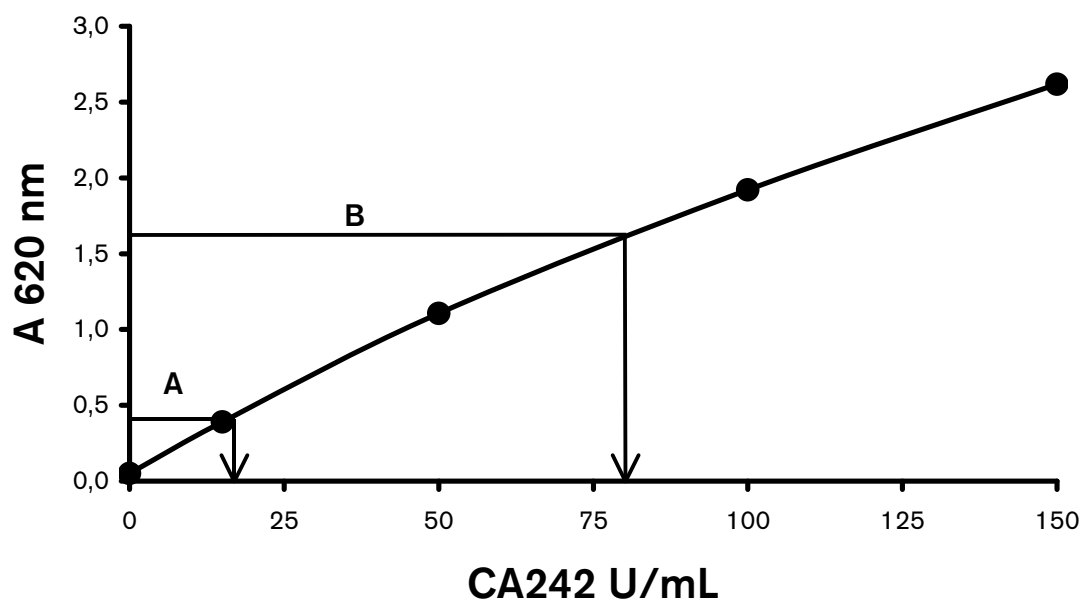
NOTA: il campione usato per la diluizione deve anche essere misurato per determinare la concentrazione di del CA242 endogeno.

La concentrazione di CA242 nei campioni non diluiti viene calcolata come:

$$\text{Diluizione 1/10:} \quad 10 \times ([\text{CA242}]_{\text{Campione diluito}} - (0.9 \times [\text{CA242}]_{\text{Siero normale}}))$$

Esempio di risultati

Campioni			Valore dei Calibratori	Valore medio (A)	CA242 U/mL
CAL	CA242	0	0 U/mL	0.050	
CAL	CA242	15	15 U/mL	0.390	
CAL	CA242	50	50 U/mL	1.107	
CAL	CA242	100	100 U/mL	1.922	
CAL	CA242	150	150 U/mL	2.617	
Specimen A				0.410	16.1
Specimen B				1.636	80.9



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

LIMITI DEL DOSAGGIO

La concentrazione di CA242 non può essere intesa come evidenza assoluta della presenza o della assenza di patologia tumorale ed il dosaggio di CA242 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 CA242 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 CA242 è stato dosato in 184 donatori di sangue apparentemente sani, 97 donne e 87 uomini sono stati analizzati ed il valore medio ottenuto è stato 8.5 ± 7.6 U/ml. Gli estremi superiori ed inferiori dell'intervallo di normalità sono stati esaminati usando il modello statistico non parametrico raccomandato da IFCC. I limiti di riferimento possono quindi 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:

Frazione	Limite di riferimento (U/mL)	95% confidenza
2.5 th (inferiore)	0	0-0
97.5 th (superiore)	29	25-44

93 % dei soggetti sani presentava un valore < alle 20 U/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 (9).

PRESTAZIONI METODOLOGICHE

Precisione

La precisione totale è stata determinata in accordo con NCCLS direttiva EP5-A (10) usando quattro livelli di pool di sieri umani congelati con aggiunta di CA242 da pazienti con tumore gastro-intestinale. 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 42 mesi da ≥ due differenti operatori usando 20 lotti diversi di kit CanAg CA242 EIA.

Campioni	Replicati	Media (U/mL)	Intrasaggio SD (U/mL)	Intrasaggio CV %	Interdies SD (U/mL)	Interdies CV %
CA242 1	80	16.2	0.67	4.1	0.39	2.4
CA242 2	80	48.4	1.93	4.0	1.82	3.8
CA242 3	80	79.5	2.99	3.8	2.46	3.1
CA242 4	80	124	5.81	4.7	2.74	2.2

Limiti del dosaggio

Il limite del dosaggio del kit CanAg CA242 EIA is ≤ 1 U/mL definito come la concentrazione corrispondente alla media dei valori di assorbanza del calibratore 0 di CA242 più due 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 CA242 umano a campioni di siero normali.

Il recupero dell'antigene aggiunto è stato nell'intervallo 87–107%. **NOTA:** gli studi di recupero non devono essere effettuati usando i calibratori del kit.

Effetto gancio

Nessun effetto gancio si è verificato fino ad una concentrazione di 150000 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 siero umano normale delipemizzato ed analizzati. I valori ottenuti si posizionavano nell'intervallo 97–108% dei valori attesi.

Specificità

Il kit CanAg CA242 EIA si basa su due anticorpi monoclonali di origine murina, il Mab C241 che si lega all' epitopo sialilato Lewis ed il Mab C242 specifico per l'epitopo CA242. Pertanto il dosaggio evidenzia S-Le contenenti l'antigene (i) mucinico che esprime l'epitopo CA242. EP7-P (7) 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.

	Concentrazione con interferenza non significativa (± 10%)
Lipemia (Intralipid®)	8 mg/mL
Bilirubina libera	0.6 mg/mL
Emoglobina	5 mg/mL

Confronto metodologico

Il kit CanAg CA242 EIA è stato confrontato con CA242 Delfia. 145 campioni di siero provenienti da donatori sani e da pazienti con patologia maligna e benigna, con valori 0-250 U/mL sono stati analizzati per ottenere la seguente regressione lineare (4):

$$\text{CanAg CA242 EIA} = 1.02 \times \text{CA242 Delfia} - 1.1 \quad r = 0.99$$

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.

BIBLIOGRAFIA

1. Johansson, C., Nilsson, O., Baeckström, D., Jansson, E.-L. and Lindholm, L. (1991) Novel Epitopes on the CA50-Carrying Antigen: Chemical and Immunochemical Studies, *Tumor Biol.*, 12, 159-179.
2. Johansson, C., Nilsson, O. and Lindholm, L., (1991) Comparison of Serological Expression of Different Epitopes on the CA50-Carrying Antigen CanAg, , *Int. J. Cancer*, 48, 757-763.
3. Nilsson, O., Johansson, C., Glimelius, B., Persson B., Nørgaard-Pedersen, B., Andrén-Sandberg, Å., and Lindholm L. (1992): Sensitivity and specificity of CA242 in gastro-intestinal cancer. A comparison with CEA, CA50 and CA19-9. *Br J Cancer* 65, 215 - 221.
4. Dahlén U., Karlsson B., Lindholm L., Nilsson O., (1993) Development of an enzyme immuno-assay for determination of the tumour associated antigen CA242, *J. Tumor Marker Oncology* 8, 3, p 111.
5. Kawa, S., Tokoo, M., Hasebe, O., Hayashi, K., Imai, H., Oguchi, H., Kiyosawa, K., Furuta, S., and Homma, T.,(1994) Comparative study of CA242 and CA19-9 for the diagnosis of pancreatic cancer, *Br. J. Cancer*, 70, 481-486.
6. Von Kleist, Hesse, Kananeeh, (1996) Comparative Evaluation of Four Tumor Markers, CA 242, CA 19-9, TPA, and CEA in Carcinomas of the Colon, *Anticancer Research* 16: 2325-2332.
7. Spila A, Ferroni P, Cosimelli M, D'Alessandro R, Abbolito MR, Mariotti S, Aloe S, Carone MD, Graziano F, Tedesco M, Martini F, Mancini R, Stigliano V, Roselli M, Guadagni F. (2001) Comparative analysis of CA 242 and CA 19-9 serum tumor markers in colorectal cancer patients. A longitudinal evaluation. *Anticancer Res. Mar-Apr;21(2B):1263-70.*
8. Carpelan-Holmström, M., Haglund, K., Lundin, J., Järvinen, H and Roberts, P., (1996) Pre-operative serum levels of CA 242 and CEA predict outcome in colorectal cancer. *Eur. J. Cancer* 32(7), 1156-1161.
9. Engarås B. (2003) Individual cutoff levels of carcinoembryonic antigen and CA 242 indicate recurrence of colorectal cancer with high sensitivity. *Dis Colon Rectum.* Mar;46(3):313-21.
10. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices. Approved Guideline EP5-A (1999).
11. National Committee for Clinical Laboratory Standards, National Evaluation Protocols for Interference Testing, Evaluation protocol Number 7, Vol. 6, No 13, August (1986).



CanAg[®] 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