



CanAg CEA EIA

Prod. No. 401-10

Istruzioni per l' uso

Dosaggio immunoenzimometrico

2009-11

96 tests

FINALITA' DEL DOSAGGIO

Il kit CanAg CEA EIA è finalizzato alla determinazione quantitativa in siero dell' antigene tumore associato CEA.

INTRODUZIONE

L'antigene carcinoembrionico (CEA) è una glicoproteina, che è stata identificata per la prima volta in pazienti con tumore al colon ed in tumori epiteliali di origine endotermica (tratto gastrointestinale) da Gold e Freedman (1). La molecola del CEA è molto eterogenea a causa del contenuto di carboidrati (50-60%) ed in relazione al metodo di purificazione usato: è solubile in acido perclorico ed ha un peso molecolare di circa 175.000 – 200.000 Daltons (2). La caratterizzazione immunologia e genetica del CEA ha portato alla luce una famiglia di molecole CEA-simili che presentano determinanti antigenici comuni. La molecola CEA-simile più importante è NCA (Non-specific Cross-reacting Antigen) sintetizzata sia da tessuti normali che patologici. Il problema della reazione crociata delle molecole CEA-simili nella determinazione del CEA può essere superato attraverso l'uso di anticorpi monoclonali. Il kit CanAg CEA EIA è basato su due anticorpi monoclonali di origine murina specifici per gli epitomi di Gold IV e V (3, 4).

Il CEA viene secreto dalle cellule tumorali e rappresenta un marcatore serologico ampiamente usato dei tumori gastrointestinali, polmonari e mammari. Nel tumore coloretale, l'uso clinico della determinazione del CEA nel monitoraggio della terapia e nella evidenziazione della progressione della malattia rappresenta una tecnica ben definita (5, 6). Il CEA può anche essere presente in malattie infiammatorie gastrointestinali di natura benigna od in patologie epatobiliari. Sulla base delle osservazioni fatte è comunque necessario enfatizzare che il dosaggio del CEA non deve essere usato come un test di screening per il tumore.

PRINCIPIO DEL DOSAGGIO

Il metodo utilizzato da CanAg CEA 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-CEA e l'anticorpo monoclonale Anti CEA 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 CEA 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 CEA presente nei campioni.

REATTIVI

- Ogni kit CanAg CEA 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'essicatore e richiudere accuratamente in modo tale da conservare in ambiente asciutto.

Componenti	Quantità	Stabilità e conservazione dopo apertura			
CEA Calibratori	6 flaconi	2–8° C fino alla scadenza riportata sui flaconi			
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>CEA</td><td>0</td></tr></table>	CAL	CEA	0	0 µg/L 1 x 8 mL	
CAL	CEA	0			
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>CEA</td><td>2</td></tr></table>	CAL	CEA	2	2 µg/L 1 x 0.75 mL	
CAL	CEA	2			
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>CEA</td><td>5</td></tr></table>	CAL	CEA	5	5 µg/L 1 x 0.75 mL	
CAL	CEA	5			
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>CEA</td><td>15</td></tr></table>	CAL	CEA	15	15 µg/L 1 x 0.75 mL	
CAL	CEA	15			
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>CEA</td><td>50</td></tr></table>	CAL	CEA	50	50 µg/L 1 x 0.75 mL	
CAL	CEA	50			
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>CEA</td><td>75</td></tr></table>	CAL	CEA	75	75 µg/L 1 x 0.75 mL	
CAL	CEA	75			
L'antigene umano CEA 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.					
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>CEA</td><td>0</td></tr></table>	CAL	CEA	0	deve essere usato per la diluizione dei campioni.	
CAL	CEA	0			

CEA Controlli	2 flaconi	2–8° C fino alla scadenza riportata sui flaconi			
<table border="1"><tr><td>CONTROL</td><td>CEA</td><td>1</td></tr></table>	CONTROL	CEA	1	1 x 0.75 mL	
CONTROL	CEA	1			
<table border="1"><tr><td>CONTROL</td><td>CEA</td><td>2</td></tr></table>	CONTROL	CEA	2	1 x 0.75 mL	
CONTROL	CEA	2			

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

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

Biotina Anti-CEA anticorpo monoclonale murino, approssimativamente 3 µg/mL. Contiene tampone fosfato (pH 7.2), sieralbumina bovina, immunoglobina bovina, agenti bloccanti, Tween 20, un colorante blu inerte e lo 0.01% di metil-isotiazolone (MIT) come conservante. Da mescolare col Tracciante, HRP Anti-CEA, prima dell'uso.

Componenti	Quantità	Stabilità e conservazione dopo apertura
CONJ Anti-CEA		
Tracciante, HRP Anti-CEA	1 x 0,75 mL	2–8° C fino alla scadenza riportata sul flacone
Soluzione stock di HRP Anti-CEA anticorpo monoclonale murino, approssimativamente 60 µg/mL. Contiene conservanti. Mescolare con Biotina Anti-CEA prima dell'uso.		
SUBS TMB		
TMB HRP- Substrato	1 x 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	1 x 15 mL	2–8° C fino alla scadenza riportata sul flacone
Pronto all'uso. Contiene 0.12 M HCl.		
WASHBUF 25X		
Tampone Lavaggio Concentrato	1 x 50 mL	2–8° C fino alla scadenza riportata sul flacone
Diluire con H ₂ 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 CEA 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 2 giorni. 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 a 6 cicli di lavaggio con un minimo volume di riempimento di 350 µL/pozzetto/ciclo di lavaggio. Si consiglia il lavatore di strip manuale Nunc Immuno 8 nel caso un lavatore di micropiastre automatico non sia disponibile.

3. Spettrofotometro per micropiastre

Lettole 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 microlitri e 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 CEA 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 decongelamento.
3. Prima di dispensare i calibratori, i controlli 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.	

Soluzione Anticorpi	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-CEA con 1 mL di Biotina Anti-CEA per strip (vedere la tabella sottostante).	

No. di Strips	Tracciante, HRP Anti-CEA (µL)	Biotina Anti-CEA (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-CEA nel flacone di Biotina Anti-CEA e mescolare gentilmente. Assicurarsi che tutto il contenuto del flacone del Tracciante, HRP Anti-CEA sia stato effettivamente trasferito in quello della Biotina Anti-CEA.

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. 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 25µL dei calibratori CEA (CAL 0, 2, 5, 15, 50, 75), 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 50	Unk1				
B	Cal 0	Cal 50	Unk1				
C	Cal 2	Cal 75	Unk2				
D	Cal 2	Cal 75	Unk2				
E	Cal 5	C1	Etc.				
F	Cal 5	C1					
G	Cal 15	C2					
H	Cal 15	C2					

4. Aggiungere 100 µL di Soluzione Anticorpo ad ogni pozzetto usando una pipetta di precisione (od una pipetta di precisione da 100µL 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 micropiastre per 1 ora (\pm 5 min) a temperatura ambiente (20-25°C) agitando in continuazione con un agitatore per micropiastre.
6. Lavare 6 volte ogni strip, usando il procedimento di lavaggio descritto nelle Note Procedurali al punto 4.

7. Aggiungere 100 μL 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.
8. Incubare per 30 min (± 5 min) a temperatura ambiente con costante agitazione. Evitare l'esposizione diretta alla luce del sole.
9. 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 segue:

Alternativa 9: Aggiungere 100 μL di Reattivo Bloccante. Mescolare e leggere l'assorbanza a 405 nm con uno spettrofotometro per micropiastre entro 15 minuti.

Intervallo di misura

CanAg CEA EIA misura concentrazioni comprese fra 0.25 e 75 $\mu\text{g/L}$. Se si devono misurare concentrazioni superiori si raccomanda di diluire i campioni con il CEA Calibratore 0 prima del dosaggio.

Controllo di Qualità

I controlli CEA 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

La 1st International Reference Preparation IRP 73/601 può essere usata come standard di riferimento. I valori dei Calibratori e dei Controlli CEA sono stati definiti sulla base di un set di standard di riferimento interno i cui valori sono confrontabili a IRP 73/601 usando il fattore di conversione 13.5, cioè 1 $\mu\text{g/L}$ corrisponde a 13.5 IU/L.

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 CEA.

Per il calcolo automatico dei risultati CEA si raccomanda di usare uno dei seguenti metodi:

- Metodo di fitting con curva spline cubica: inserire il calibratore 0 nella curva col valore 0 $\mu\text{g/L}$
- 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 $\mu\text{g/L}$
- Metodo di fitting con curva quadratica. Il calibratore 0 deve essere incluso nella curva col valore 0 $\mu\text{g/L}$

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 CEA contro la corrispondente concentrazione di CEA espressa in $\mu\text{g/L}$ (vedi figura). Le concentrazioni ignote di CEA 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 CEA è superiore a $75 \mu\text{g/L}$, i campioni devono essere diluiti 1/10 ed 1/100 con il CEA Calibratore 0 per ottenere una accurata concentrazione di CEA nei campioni.

Diluizione 1/10 = $50 \mu\text{L}$ of campione + $450 \mu\text{L}$ di CEA $0 \mu\text{g/L}$

Diluizione 1/100 = $50 \mu\text{L}$ della diluizione 1:10 + $450 \mu\text{L}$ di CEA $0 \mu\text{g/L}$

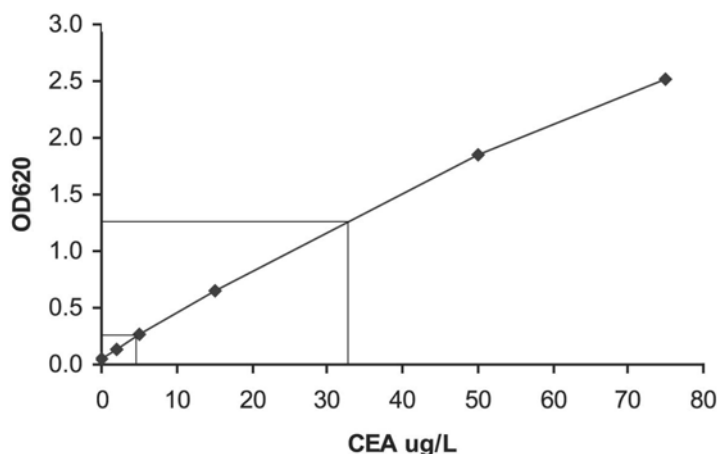
La misurazione della concentrazione di CEA nei campioni indiluiti viene quindi effettuata come segue:

Diluizione 1/10: $10 \times$ il valore misurato

Diluizione 1/100: $100 \times$ il valore misurato

Esempio di risultati

Campioni	Valore dei Calibratori	Valore medio (A)	CEA $\mu\text{g/L}$
CAL CEA 0	$0 \mu\text{g/L}$	0.050	
CAL CEA 2	$2 \mu\text{g/L}$	0.131	
CAL CEA 5	$5 \mu\text{g/L}$	0.259	
CAL CEA 15	$15 \mu\text{g/L}$	0.657	
CAL CEA 50	$50 \mu\text{g/L}$	1.857	
CAL CEA 75	$75 \mu\text{g/L}$	2.519	
Campione A	0.220	4.1	
Campione B	1.290	32.3	



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

LIMITI DEL DOSAGGIO

La concentrazione di CEA non può essere intesa come evidenza assoluta della presenza o della assenza di patologia tumorale ed il dosaggio di CEA 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 CEA 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 CEA è stato dosato in 95 donatori di sangue sani ed in 117 soggetti sani di età compresa tra i 60 ed i 65 ANNI. 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

	Valore medio (µg/L)	SD (µg/L)	Mediana (µg/L)	Intervallo (µg/L)	Limite di riferimento superiore Frazione centrale (95%)
Donatori sani n=95	1.3	1.0	1.0	0.5 – 9.1	3.2 µg/L
Soggetti sani età 60-64, n=117	2.4	1.7	1.9	0.5 – 8.8	7.4 µg/L

96% dei soggetti sani presenta valori inferiori a 5 µg/L

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. Il fumo può provocare aumenti del livello di CEA negli individui sani.

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 CEA umana e due differenti combinazioni di reagenti di CanAg CEA EIA. Ogni campione è stato pipettato a caso (n=2/analisi) in ed analizzato due volte al giorno per 20 giorni consecutivi.

Campioni	Replicati	Media (µg/L)	Intrasaggio SD (µg/L)	Intrasaggio CV %	Intersaggio SD (µg/L)	Intersaggio CV %
CEA 1	80	2.78	0.07	2.5	0.08	2.7
CEA 2	80	5.97	0.15	2.6	0.11	1.8
CEA 3	80	20.8	0.44	2.1	0.36	1.7
CEA 4	80	57.3	1.57	2.7	0.87	1.5

Limiti del dosaggio

Il limite del dosaggio del kit CanAg CEA EIA è $\leq 0.25 \mu\text{g/L}$ definito come la concentrazione corrispondente alla media dei valori di assorbanza del Calibratore 0 di CEA più 2 deviazioni standard secondo la formula:

$$\frac{2 \times \text{SD CAL 0}}{\text{OD CAL 2} - \text{OD CAL 0}} \times 2 \mu\text{g/L}$$

Recupero

Campioni di siero sono stati preparati aggiungendo CEA umano a campioni di siero normali.

Il recupero dell'antigene aggiunto è stato nell'intervallo 90-115%

Effetto gancio

Quando la densità ottica viene letta a 405 nm, usando il procedimento di dosaggio alternativo che prevede l'aggiunta di Reattivo Bloccante, nessun effetto gancio si è verificato per i campioni con concentrazioni fino 250.000 µg/L. Quando la densità ottica viene invece letta a 620nm i campioni con concentrazioni molto elevate possono produrre il cambiamento del colore del substrato dal blu al verdastro. Ciò può condurre ad un valore di assorbanza erroneamente basso misurabile nell'intervallo della curva di calibrazione che deve essere considerato prodotto dall'effetto gancio. Tale effetto gancio a 620 nm si è verificato per campioni contenenti più di 2000µg/L.

Per evitare questi inconvenienti che si verificano quando la densità ottica viene letta a 620nm si raccomanda di usare il dosaggio alternativo nei pazienti per i quali i marcatori vengono determinati per la prima volta o laddove siano attesi valori elevati di CEA.

Linearità

Campioni di pazienti sono stati diluiti con il CEA Calibratore 0 e dosati. I valori ottenuti si posizionavano nell'intervallo 90-120% dei valori attesi.

Specificità

Il kit CanAg CEA EIA si basa su due anticorpi monoclonali di origine murina, il Mab 12-140-10 specifico per l'epitopo Gold IV ed il Mab 12-140-1 che evidenzia l'epitopo Gold V (4, 5).

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.

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

Confronto Metodologico

Il kit CanAg CEA EIA è stato confrontato con il kit Wallac Delfia CEA. Settantasette sieri umani con valori compresi tra 0-790 µg/L sono stati dosati e l'analisi della regressione lineare dei risultati ha prodotto il seguente risultato:

$$\text{CanAg CEA} = 0.90 \times \text{Delfia CEA} + 0.53$$

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. Gold P. and Freedman S. O. (1965) Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system. *J. Exp Med* 122: 467–481.
2. Thompson J.A. and Zimmerman W. (1988) The carcinoembryonic antigen gene family: Structure, expression and evolution. *Tumor Biol*; 9: 63–83.
3. Börner, O.P. (1992) Thesis “Immunoassays for Carcinoembryonic antigen, Specificity and Interferences”, ISBN 82–7633–014–2.
4. Hammarström S. et al. (1989) Antigenic sites in carcinoembryonic antigen. *Cancer Res* 49: 4852–4858.
5. Tumor Marker Expert Panel, ASCO (1996) Clinical practice guidelines for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer. *J. Clin Oncol*; 14: 2843–2877.
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[®] è un marchio registrato di 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