



CanAg S100 EIA

REF 708-10

IVD

CE

Istruzioni per l' uso. 2010-05

EN	EXPLANATION OF SYMBOLS
BG	ОБЯСНЕНИЕ НА СИМВОЛИТЕ
CS	VÝZNAM SYMBOLŮ
DA	SYMBOLFORKLARING
DE	ERKLÄRUNG DER SYMBOLE
EL	ΕΠΕΞΗΓΗΣΗ ΤΩΝ ΣΥΜΒΟΛΩΝ
ES	SIGNIFICADO DE LOS SÍMBOLOS
ET	SÜMBOLITE SELGITUS
FR	EXPLICATION DES SYMBOLES
HR	OBJAŠNJENJE SIMBOLA
HU	JELMAGYARÁZAT
IT	SPIEGAZIONE DEI SIMBOLI
LT	SIMBOLIŲ PAAIŠKINIMAI
LV	SIMBOLU SKAIDROJUMS
NL	VERKLARING DER SYMBOLEN
NO	SYMBOLFORKLARING
PL	OBJAŚNIENIE SYMBOLI
PT	EXPLICAÇÃO DOS SÍMBOLOS
RO	SEMNIIFICAȚIA SIMBOLURILOR
RU	ОБОНАЧЕНИЯ
SE	SYMBOLFÖRKLARING
SK	VÝZNAM SYMBOLOV
SL	RAZLAGA SIMBOLOV
SR	OBJAŠNJENJE SIMBOLA
TR	SEMBOLLERİN AÇIKLAMALARI



Use By/Годно до/Použitelné do/
Holdbar til/Verwendbar bis/
Ημερομηνία λήξης/Fecha
de caducidad/Kölblik kuni/
Utiliser jusque/Rok valjanosti/
Felhasználható/Utilizzare entro/
Sunaudoti iki/Izlietot līdz/Houdbaar
tot/Brukes innen/Użyć przed/
Prazo de validade/Expiră la/
Использовать до/Använd före/
Použite né do/ Uporabno do/
Upotrebljivo do/Son Kullanma Tarihi

LOT

Batch code/Номер на партида/
Číslo šarže/Lotnummer/
Chargenbezeichnung/Αριθμός
Παρτίδας/Código de lote/Partii
kood/Code du lot/Kod serije/
Sarzs szám/Codice del lotto/
Partijos kodas/Partijas kods/Lot
nummer/Partikode/Kod partii/
Código do lote/Număr de lot/
Номер лота/Lotnummer/Číslo
šarže/Številka serije/Kod partije/
Parti Kodu



Date of manufacture/Дата на производство/Datum výroby/
Produktionsdato/Herstellungsdatum/
Ημερομηνία παραγωγής/Fecha de fabricación/
Valmistamise kuupäev/
Date de fabrication/Datum proizvodnje/
Gyártási idő/Data di produzione/
Pagaminimo data/Ražošanas datums/
Productiedatum/Fremstillingsdato/
Data produkcyj/Data de fabrico/Data fabricației/Дата производства/
Tillverkningsdatum/Dátum výroby/Datum izdelave/Datum proizvodnje/Üretim tarihi



Temperature limitation/
Температурни граници/
Teplotní omezení/
Temperaturbegrænsning/
Temperaturbegrenzung/
Περιορισμοί θερμοκρασίας/
Limites de temperatura/
Temperatuuri piirang/
Limite de température/
Temperaturno ograničenje/
Hőmérsékletre vonatkozó korlátozás/
Limiti di temperatura/
Temperatūriņiai apribojimai/
Temperatūras ierobežojums/
Temperatuurbepërking/
Temperaturbegrensninger/
Temperatury graniczne/
Limite de temperatura/
Limite de temperatură/
Температурный режим/
Temperaturbegrænsning/
Teplotné obmedzenie
Omejitve temperature/
Temperaturno ograničenje/
Sıcaklık sınırlaması/



In Vitro Diagnostic Medical Device/
Медицински уред за диагностика
ин витро/Lékařský přístroj pro diagnostiku in vitro/Medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik/
In-vitro-Diagnostikum/
Ιατροτεχνολογικό προϊόν για διάγνωση
In Vitro/Dispositivo médico para diagnóstico in vitro/
In vitro diagnostiline meditsiiniseade/Dispositif médical de diagnostic in vitro/
Diagnostički medicinski uređaj In Vitro/
In vitro orvosdiagnostikai eszköz/Dispositivo medico per test diagnostici in vitro/
In Vitro Diagnostinè Medicinos Priemonė/
Medicīniska ierīce in vitro diagnostikai/
In vitro-diagnostisch medisch instrument/
In vitro diagnostisk medisinsk utstyr/
Wyrób medyczny do diagnostyki in vitro/
Dispositivo Médico de Diagnóstico In Vitro/
Dispozitiv medical pentru diagnostic in vitro/
Только для диагностики In Vitro/
Endast för in vitro-diagnostik/
Zdravotnícka pomôcka na diagnostiku in vitro/
In vitro diagnostični pripomoček/
Diagnostički medicinski uređaj In Vitro/
<96> testleri için yeterlilik içerir



Contains sufficient for <96> tests/Σύдържа достатъчно количество за тестове <96>/Lze použít pro <96> testů/
Ineholder tilstrækkeligt/
Inhalt ausreichend für <96> Prüfungen/
Περιεχόμενο επαρκές για «96» εξετάσεις/
Contenido suficiente para <96> ensayos/
Kogusest piisab <96> testi läbiviimiseks/
Contenu suffisant pour «96» tests/
Sadrži dovoljno za <96> testova/
A doboz tartalma <96> vizsgálat elvégzéséhez elegendő/
Contenuto sufficiente per «96» saggi/
Turinys skirtas atlikti <96> tyrimus/
Saturis pietiekams <96> testiem/
Inhoud voldoende voor «96» testen/
til «96» test/
Tilstrækkelig innhold for <96> prøver/
Wystarczy na wykonanie <96> testów/
Conteúdo suficiente para «96» ensaios/
Conținut suficient pentru 96 de teste/
Содержит достаточные количества для «96» определений/
Innehåller tillräckligt till «96» antal tester/
Obsah postačuje na tento počet testov:
<96>/Vsebina zadostuje za <96> testov/
Sadržina dovoljna za <96> testova/
<96> testleri için yeterlilik içerir



Catalogue number/Каталожен номер/
Katalogové číslo/Katalognummer/
Bestellnummer/Αριθμός καταλόγου/
Número de catálogo/Kataloogi number/
Numéro de catalogue/Kataloški broj/
Katalógusszám/Numero di catalogo/
Katalogo numeris/Numurs katalogā/
Catalogusnummer/Katalognummer/
Numer katalogowy/Número do catálogo/
Număr de catalog/Номер по каталогу/
Produktnummer/Katalógové číslo/
Kataloška številka/Kataloški broj/
Katalog numarası



Consult Instructions for Use/
 Прочетете инструкцията за
 употреба/Konzultujte s návodem
 k použití/Se brugsanvisning/Siehe
 Gebrauchsanweisung/Συμβουλευτείτε
 τις Οδηγίες σχετικά με τη χρήση/
 Consulte las instrucciones de uso/
 Vt kasutusjuhendit/Consulter le mode
 d'emploi/Pročitajte upute za uporabu/
 Olvassa el a használati utasítást/
 Consultare le istruzioni per l'uso/Dél
 naudojimo žiūrėkite instrukcijas/Izlasiet
 lietošanas instrukciju/Raadpleeg de
 instructies voor gebruik/Les instruksene
 før bruk/Sprawdzić w instrukcji użycia/
 Consulte as Instruções de Utilização/
 Consultați instrucțiunile de utilizare/
 Обратитесь к инструкции по
 применению/Se bruksanvisning/
 Prečítajte si návod na používanie/
 Pročitajte uputstvo za upotrebu/
 Kullanım Talimatlarını Bakınız

CONT

Contents of kit/Съдържание на набора/
 Obsah sady/Kittets indhold/Inhalt des
 Kits/Περιεχόμενα του κιτ/Contenido
 del kit/Komplekt sisaldab/Contenu du
 kit/Sadržaj opreme/A készlet tartalma/
 Contenuto del kit/Rinkinio turinys/
 Komplekta saturs/Inhoud van de set/
 Settets innhold/Zawartość zestawu/
 Conteúdo do kit/Conținutul setului/
 Компоненты набора/Kit innehåll/
 Obsah súpravy/Vsebina kompleta/Sadržaj
 opreme/Kitin içindekiler



Biological risks/Биологическа
 опасност/Biologická rizika/Biologisk
 fare/Biologische Gefahren/Βιολογικοί
 κίνδυνοι/Riesgos biológicos/
 Bioloogilised ohud/Risques biologiques/
 Biološkli rizici/Biológiai kockázatok/Rischi
 biologici/Biologinis pavojus/Bioloģiskais
 risks/Biologische risico's/Biologiske
 risikoer/Zagroženie biologiczne/Riscos
 biológicos/ Biologisk risk/Pericole
 biologice/Биологическая опасность/
 Biologicky rizikové/Biologické riziká/
 Biološkli rizici/Bijoloogik riskler

ORIG HUM

Human/С човешки произход/Lidské/
 Humant/Human/δείγματα αναφοράς/
 Humano/Inimpăritolu/Humaine/Ljudskog
 porjekla/Humán/Origine Umana/
 Žmogaus kilmės/Cilvēku izcelsmes/
 Human/Menneske/Ludzka/Humano/
 Origine umană/Человеческого
 происхождения/Human/Ludské/
 Humanega izvora/Ljudskog porekla/İnsan

ORIG MOU

From mouse/С миши произход/Мыši/
 Fra mus/der Maus/από ποντίκι/de ratón/
 Hiirtelt/De souris/Mišijeg porjekla/
 Egérból/Murino/Pelés kilmés/No peles/
 Van muizen/Fra mus/Mysia/Do rato/De
 la șoareci/Мышиного происхождения/
 Från mus/Myšie/Mišjega izvora/Mišijeg
 porekla/Fareden

ORIG BOV

Bovine/С говяжди произход/
 Hovězí/Bovin/Rind/από βοειδή/
 Bovino/Veistelt/Bovine/Rogate stoke/
 Szarvasmarha/Bovino/Jaučio/No
 liellopa/Bovien/Bovin/Wołowy/Bovino/
 Origine bovină/крупного рогатого
 скота/Från ko/Hovädzie/Govejega
 izvora/Rogate krupne stoke/Bovin



Reconstitute with/Разтваряне с/
 Rozředte pomocí/Rekonstituertes med/
 Rekonstituieren mit/Ανασύσταση με/
 Reconstituir con/Lahjendamine/
 Reconstituer avec/Rekonstituiraite s/
 Feloldáshoz/Ricostituire con/Atkurti,
 ištirpdant su/Atšķaidīt ar/Reconstitutie
 met/Rekonstituertes med/Odtworzyć
 za pomocą/Reconstituir com/A
 se reconstitui cu/Растворить в/
 Rekonstituera med/Rozriedte pomocou/
 Rekonstituiraite z/s/Ponovno formiranje
 sa/Yeniden oluşturulur



Manufacturer/Производитель/Výrobce/
 Producent/Hersteller/Κτασκευαστής/
 Fabricante/Tootja/Fabricant/Proizvođač/
 Gyártó/Fabbricante/Gamintojas/
 Ražotājs/Fabrikant/Produsent/
 Producent/Fabricante/Producător/
 Производител/Тиллverkare/ Výrobca/
 Izdelovalec/Proizvođač/Üretici

CanAg S100 EIA

Istruzioni per l'uso

Dosaggio immunoenzimatico

96 tests

FINALITA' DEL DOSAGGIO

Il kit CanAg S100 EIA è finalizzato alla determinazione quantitativa in siero di S100B (S100A1B + S100BB).

INTRODUZIONE

S100 è una proteina di 20 kDa appartenente alla superfamiglia S100/ calmodulina/ troponina C delle proteine leganti il calcio di tipo EF. S100 è stato originariamente isolato dal cervello umano e considerato come una proteina specifica delle cellule gliali (1). Oggi sono stati identificati sulla base di similitudini funzionali e strutturali ben 20 monomeri della famiglia S100 (2, 3). La maggioranza delle proteine appartenenti alla famiglia S100 esiste sotto forma di dimeri e viene espressa in modo cellulare specifico. Due dei monomeri S100, designati come S100A1 e S100B (4) sono altamente conservati fra le specie e si trovano come omo (BB) e eterodimeri (A1B) nelle cellule gliali del sistema nervoso centrale ed in alcune cellule periferiche come esempio le cellule di Schwann, i melanociti, gli adipociti ed i condrociti (5). S100A1B e S100BB sono anche presenti in tessuti maligni, specialmente nei melanomi ed in misura minore nei gliomi, nei carcinomi delle cellule tiroidee e delle cellule renali (2).

La determinazione di S100B nel siero è stato dimostrato essere clinicamente utile nella prognosi, nella terapia e nel monitoraggio di pazienti affetti da melanoma maligno (6-9). Alcuni studi suggeriscono anche che S100B può essere utile nella gestione di pazienti con danno cerebrale provocato da traumi cranici, asfissia perinatale, arresto cardiaco, chirurgia cardiaca ed infarto (10-13).

PRINCIPIO DEL DOSAGGIO

Il CanAg S100 EIA è un dosaggio immunoenzimatico non competitivo a due step in fase solida, basato su due anticorpi monoclonali di origine murina specifici per i due differenti epitopi espressi in S100B. Il dosaggio determina sia S100A1B che S100BB senza cross-reattività con altre forme di S100. I calibratori ed i campioni dei pazienti vengono incubati con l'anticorpo monoclonale biotilinato Anti-S100B MAbs S23 in pozzetti sensibilizzati con streptavidina. S100B presente nei calibratori o nei campioni viene assorbito sui pozzetti sensibilizzati con streptavidina attraverso l'anticorpo monoclonale biotilinato Anti-S100B durante l'incubazione. I pozzetti vengono quindi lavati ed incubati con l'anticorpo monoclonale Anti-S100B Mab S53 marcato con perossidasi di 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 S100 presente nei campioni. L'intensità del colore viene misurata con 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 S100 presente nei campioni.

REATTIVI

- Ogni kit CanAg S100 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 reagenti 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.

Componente	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.

Componente	Quantità	Stabilità e conservazione dopo apertura
Calibratori S100	6 flaconi, liofilizzati	4 settimane a 2–8° C 3 mesi a ≤–30° C
CAL S100 A	1 x 1 mL	
CAL S100 B	1 x 1 mL	
CAL S100 C	1 x 1 mL	
CAL S100 D	1 x 1 mL	
CAL S100 E	1 x 1 mL	
CAL S100 F	1 x 1 mL	

I calibratori liofilizzati contengono S100 di origine bovina in matrice proteica con 0.02% di NaN₃ come conservante. Ricostituire con acqua prima dell'uso. **NOTA:** La concentrazione esatta di S100B è specifica per ogni lotto ed è indicata sull'etichetta di ogni flacone.

BIOTIN Anti-S100		
Biotina Anti-S100	1 x 15 mL	2 – 8°C fino alla scadenza riportata sul flacone

Biotina Anti-S100 anticorpo monoclonale murino, approssimativamente 2 µg/mL. Contiene una soluzione salina tamponata con tampone fosfato (pH 7.2) con CaCl₂, sieroalbumina bovina, immunoglobina bovina, agenti bloccanti, Tween 20, un colorante blu inerte e lo 0.01% di metil-isotiazolone (MIT) come conservante. Pronto all'uso.

CONJ Anti-S100		
Tracciante, HRP Anti-S100	1 x 0.75 mL	2-8° C fino alla scadenza riportata sul flacone

Soluzione stock di HRP Anti-S100 anticorpo monoclonale murino, approssimativamente 20 µg/mL. Contiene conservanti . Diluire col Diluente del Tracciante prima dell'uso.

Componente	Quantità	Stabilità e conservazione dopo apertura
------------	----------	---

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

Diluyente 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, agenti bloccanti, detergenti, un colorante inerte blu e 0,01% metil-isotiazolone (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 e 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

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 eliminati lavare con abbondante quantità d'acqua per prevenire il rischio di reazione dell'azide
- Seguire le normative vigenti relative all'eliminazione del materiale usato

PRELIEVO E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Il kit CanAg S100 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 preferibilmente 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 multiple con puntali di plastica a gettare.

5. Acqua distillata o deionizzata

Per la ricostituzione dei calibratori S100 e la preparazione della soluzione di lavaggio diluita.

NOTE

1. La comprensione globale di questo libretto d'istruzioni garantisce l'uso appropriato del kit CanAg S100 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 portati lentamente a temperatura ambiente e 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

Calibratori S100

4 settimane a 2–8°C

3 mesi a –30° C almeno

Aggiungere esattamente 1.0 mL di acqua distillata ad ogni flacone ed agitare gentilmente. Attendere per almeno 15 minuti per ottenere la completa dissoluzione del reattivo. **NOTA:** la concentrazione dei calibratori è specificata sulle etichette e deve essere usata per il calcolo dei risultati.

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-S100 con 1 mL di Diluente del Tracciante per strip (vedi tabella):

No. of Strips	Tracciante, HRP Anti-S100 (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 di lavoro del Tracciante.

Alternativa: Versare il contenuto del flacone del Tracciante, HRP Anti-S100 nel flacone del Diluente del Tracciante e mescolare gentilmente. Assicurarsi che tutto il contenuto del flacone del Tracciante, HRP S100 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 i Calibratori S100, 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 50 µL dei calibratori S100 (CAL A, B, C, D, E, F) e dei campioni diluiti (Unk) nei pozzetti seguendo lo schema sottoindicato:

	1	2	3	4	5	6	7 etc
A	Cal A	Cal E	Etc.				
B	Cal A	Cal E					
C	Cal B	Cal F					
D	Cal B	Cal F					
E	Cal C	Unk1					
F	Cal C	Unk1					
G	Cal D	Unk2					
H	Cal D	Unk2					

4. Aggiungere 100 µL di Biotina Anti-S100 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 le strips per 2ore (± 10 min) a temperatura ambiente (20–25°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 (20–25°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 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.
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 µL di Reattivo Bloccante, mescolare e leggere l'assorbanza a 405 nm con uno spettrofotometro per micropiastre entro 15 minuti dall'aggiunta del Reattivo Bloccante

Intervallo di misura

CanAg S100 EIA misura concentrazioni comprese fra 10 e 3500 ng/L. 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 S100 endogena (vedi " Calcolo dei risultati").

Controllo di Qualità

I sieri di controllo CanChek Tumor Marker Livelli 1 e 2 (disponibili separatamente, REF 107-20) sono raccomandati 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.

Riferimenti

Poichè non esistono riferimenti ufficiali per S100A1B o S100BB, il valore dei calibratori di CanAg S100 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 consultare il manuale e creare un programma usando le concentrazioni riportate sulle etichette di ogni calibratore S100.

Per il calcolo automatico dei risultati S100 si raccomanda di usare uno dei seguenti metodi:

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

Nota: Si sconsiglia di usare metodi di valutazione a 4 parametri 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 S100 contro la corrispondente concentrazione di S100 espressa in ng/L (vedi figura). Le concentrazioni ignote di S100 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 S100 è superiore a quella del Calibratore F (circa 3500 ng/L), i campioni devono essere diluiti 1/10 con siero umano normale e rianalizzati per ottenere una accurata concentrazione di S100 nei campioni.

NOTA: il campione usato per la diluizione deve anche essere misurato per determinare la concentrazione di del S100 endogeno.

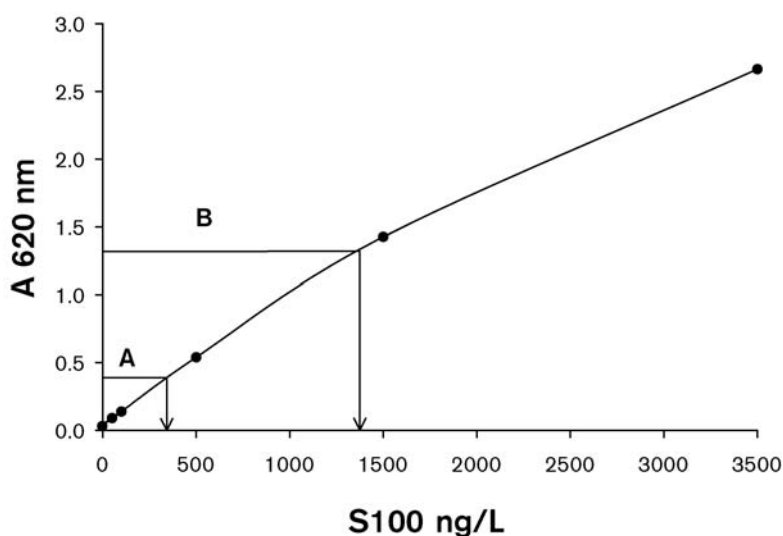
La concentrazione di S100 dei campioni indiluiti viene calcolata come :

Diluizione 1/10: $10 \times ([S100]_{\text{Campione diluito}} - (0.9 \times [S100]_{\text{Siero normale}}))$

Esempio di risultati

Campioni	Valore dei Calibratori	Assorbanza media (A)	S100 ng/L			
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>S100</td><td>A</td></tr></table>	CAL	S100	A	0 ng/L	0.041	
CAL	S100	A				
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>S100</td><td>B</td></tr></table>	CAL	S100	B	50 ng/L	0.091	
CAL	S100	B				
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>S100</td><td>C</td></tr></table>	CAL	S100	C	100 ng/L	0.139	
CAL	S100	C				
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>S100</td><td>D</td></tr></table>	CAL	S100	D	500 ng/L	0.540	
CAL	S100	D				

Campioni	Valore dei Calibratori	Assorbanza media (A)	S100 ng/L
CAL S100 E	1500 ng/L	1.425	
CAL S100 F	3500 ng/L	2.663	
Campione A		0.352	305
Campione B		1.377	1435



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

LIMITI DEL DOSAGGIO

La concentrazione di S100 non può essere intesa come evidenza assoluta della presenza o della assenza di patologia tumorale ed il dosaggio di S100 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 S100 non può sostituire altri metodi consolidati di valutazione clinica.

Livelli elevati di S100B nel siero devono essere attentamente valutati nei pazienti che hanno subito dei traumi come fratture ossee, ustioni, danni interni ai tessuti molli ed interventi chirurgici, poichè tali condizioni cliniche sono caratterizzate da un consistente rilascio di S100 nel sangue (14).

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 S100 è stato dosato in 269 donatori di sangue apparentemente sani. 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. I limiti di riferimento possono quindi essere stimati al 97,5% (superiore) percentili.

	Media	SD (ng/L)	Limite di riferimento (ng/L)
donatori di sangue n=269	54	15.6	90

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.

PRESTAZIONI METODOLOGICHE

Precisione

La precisione è stata determinata in accordo con NCCLS direttiva EP5-A (15) usando quattro livelli di pool di sieri umani congelati con aggiunta di S100 e 22 differenti combinazioni dei reattivi di CanAg S100 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 (ng/L)	Intrasaggio SD (ng/L)	Intrasaggio CV %	Interdies SD (ng/L)	Interdies CV %
S100 1	80	70	2	2.5	2	2.2
S100 2	80	302	5	1.6	8	2.5
S100 3	80	1440	20	1.4	21	1.5
S100 4	80	2260	30	1.3	45	2.0

Limiti del dosaggio

Il limite del dosaggio del kit CanAg S100 EIA è ≤ 10 ng/L definito come la concentrazione corrispondente alla media dei valori di assorbanza del Calibratore A di S100 più 2 deviazioni standard secondo la formula:

$$\frac{2 \times \text{SD CAL A}}{\text{OD CAL B} - \text{OD CAL A}} \times [\text{CAL B}] \text{ ng/L}$$

Recupero

Campioni di siero sono stati preparati aggiungendo l'antigene S100 a campioni di siero normali. Il recupero dell'antigene aggiunto è stato nell'intervallo 97–105%. **NOTA:** gli studi di recupero non devono essere effettuati usando i calibratori del kit.

Effetto gancio

Nessun effetto gancio si è verificato in campioni fino a 150 000 ng/L. **NOTA:** in campioni ad alta concentrazione di S100 il colore del substrato cambia dal blu al verdastro (ed eventualmente giallo in campioni ad altissima concentrazione). Questo fatto comporta una misura dell'assorbanza a 620nm erroneamente bassa e, in casi estremi, l'assorbanza può cadere a valori interni alla curva di calibrazione originando così l'effetto gancio.

Linearità

Campioni di pazienti sono stati diluiti con siero umano normale ed analizzati. I valori ottenuti si posizionavano nell'intervallo $\pm 10\%$ dei valori attesi.

Specificità

Il kit CanAg S100 EIA si basa su due anticorpi monoclonali di origine murina espressi in S100B, il Mab S23 che si lega all'antigene ed il Mab S53 che lo evidenzia. In tal modo il dosaggio determina sia S100A1B che S100BB senza reazioni crociate con altre forme di S100.

Le linee guida EP7-P di NCCLS (16) sono state seguite 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	3.9 mg/mL

Confronto metodologico

Il kit CanAg S100 EIA è stato confrontato con I corrispondenti kit S100 di Byk Sangtec.

98 sieri umani provenienti da pazienti con melanoma maligno, con concentrazioni varianti da 0–8000 ng/L, sono stati analizzati e la regressione lineare dell'analisi ha dato il seguente risultato:

$$\text{CanAg S100} = 0.4 \times \text{Sangtec 100} + 0.03 \quad r = 0.99$$

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.

LITERATURE REFERENCES

1. Moore BW (1965) A soluble protein characteristic of the nervous system. *Biochem Biophys Res Commun* 19:739-744.
2. Zimmer DB et al., (1995) The S100 protein family history, function and expression. *Brain Res Bull* 37:417-429.
3. Heizmann CW et al., (2002) S100 proteins:structure, functions and pathology. *Front Biosci* 7:1356-1368.
4. Schäfer BW et al. (1995) Isolation of a YAC clone covering a cluster of nine S100 genes on human chromosome 1q21: rationale for a new nomenclature of the S100 calcium-binding protein family. *Genomics* 25:638-643.
5. Takahashi K. et al., (1984) Immunohistochemical study on the distribution of α and β subunits of S-100 protein in human neoplasm and normal tissues. *Virchows Arch* 45:385-396.
6. Banfalvi T. et al., (2003) Use of serum S-100B protein levels to monitor the clinical course of malignant melanoma. *Eur J Cancer* 39:164-169.
7. Djureen-Mårtensson E., et al., (2001) Serum S-100b protein as a prognostic marker in malignant cutaneous melanoma. *J Clin Oncol* 19:824-831.
8. Hauschild A. et al., (1999) S100B protein detection in serum is significant prognostic factor in metastatic melanoma. *Oncology* 56:338-344.
9. Wunderlich MT., et al., (1999) Early Neurobehavioral Outcome after stroke is related to release of neurobiochemical markers of brain damage. *Stroke* 30:1190-1195.
10. Martens P et al., (1998) Serum S100 and neuron specific enolase for prediction of regaining consciousness after global cerebral ischemia. *Stroke* 29:2363-2366.
11. Rosén H. et al., (1998) Increased serum levels of the S-100 protein are associated with hypoxic brain damage after cardiac arrest. *Stroke* 29: 473-477.
12. Ingebrigtsen T. et al., (2000) The clinical value of serum S-100 protein measurements in minor head injury: a Scandinavian multicentre study. *Brain Inj* 14:1047-1055
13. Michetti F and Gazzolo D. (2002) S100B protein in biological fluids: A tool for perinatal medicine *Clin Chem* 48:2097-2104
14. Anderson R. et al., (2001) High serum S100B levels for trauma patients without head injuries *Neurosurgery* 48: 1255-1258
15. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices. Approved Guideline EP5-A (1999).
16. 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

