

PEMBUATAN KOMPONEN KIT IMMUNORADIOMETRICASSAY (IRMA) CA 15.3 UNTUK DETEKSI KANKER PAYUDARA

Puji Widayati, Agus Ariyanto, Sutari, Gina Mondrida, Siti Darwati
Pusat Radioisotop dan Radiofarmaka (PRR)
Kawasan Puspiptek, Tangerang, Banten

ABSTRAK

PEMBUATAN KOMPONEN KIT IMMUNORADIOMETRIC ASSAY (IRMA) CA 15.3 UNTUK DETEKSI KANKER PAYUDARA. Kanker payudara merupakan penyebab kematian nomor dua untuk perempuan di Indonesia. Pada hal, kanker payudara adalah salah satu jenis kanker yang dapat dideteksi secara dini. Namun, tingkat kesadaran masyarakat yang rendah untuk melakukan deteksi dini telah menyebabkan jenis kanker ini lebih sering ditemukan pada stadium lanjut yang sulit untuk ditangani. Salah satu cara yang dapat digunakan untuk deteksi dini kanker payudara adalah dengan menggunakan kit IRMA (immunoradiometricassay) CA 15.3. Dalam penelitian telah dilakukan optimasi pembuatan kit IRMA CA 15.3 untuk deteksi dini kanker payudara. Optimasi pembuatan kit IRMA CA 15.3 ini meliputi pemilihan jenis monoklonal antibodi untuk perunut, variasi dapar coating untuk pembuatan coated tube dan pembuatan standar CA 15.3. Dari hasil penelitian ini didapatkan bahwa monoklonal anti CA 15.3 jenis M37901M merupakan bahan dasar pembuatan perunut (tracer) yang lebih baik dibandingkan dengan monoklonal anti CA 15.3 jenis M37552M, karena monoklonal anti CA 15.3 jenis M37901M memberikan hasil rendemen penandaan (79,51%), aktivitas spesifik (29,12 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$), kemurnian radiokimia (94,21%) dan ratio B/T (11,94%) yang jauh lebih tinggi dibandingkan dengan monoklonal anti CA 15.3 jenis M37552M. Dari beberapa larutan coating yang telah diuji dalam penelitian ini dapar karbonat-bikarbonat 0,05 M pH 9,6 adalah merupakan dapar yang terbaik untuk penyiapan coated tube karena memberikan ikatan maksimum spesifik coated tube yang relatif tinggi (4,37%) dibandingkan dengan larutan coating. Sementara itu standar kit IRMA CA 15.3 yang disiapkan memberikan kurva kalibrasi standar yang linier (antara konsentrasi standar CA 15.3 dengan ikatan maksimum spesifik), dengan persamaan garis $Y=0,227X+0,5177$ dan koefisien korelasi R 0,9840.

Kata kunci: immunoradiometricassay, kanker payudara, tumor marker, CA-15.3

ABSTRACT

PRODUCTION OF IMMUNORADIOMETRICASSAY (IRMA) CA 15.3 KIT COMPONENT FOR DETECTION OF BREAST CANCER. YKI has ranked that breast cancer as a second disease in causing death of Indonesian women (, 2007). This phenomenon has been caused by the low level of public awareness in early detection of cancers. As a consequences this kind of cancer has generally been diagnosed in advanced stadium which is difficult to be treated.. In spite of this, the disease actually can be detected early by measuring level of CA 15.3, a tumor marker for breast cancer. One of such in vitro method is immunoradiometricassay (IRMA) for CA 15.3. The CA 15.3 itself is a glycoprotein of heterogen compound capable of reacting with monoclonal antibody CA 15.3. Production of the IRMA CA 15.3 kit has been performed in the Center for Radioisotope and Radiopharmaceutical, National Nuclear Energy Agency of Indonesia. Optimization of the kit component has been carried out using several parameter including type of monoclonal antibody for tracer and buffer coating type. The results showed that monoclonal anti CA M37901M type is better than M37552M type for tracer production. The M37901M gave yield

about 79.51%, with specific activity 29.12 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$, radiochemical purity 94.21% and %B/T about 11.94%. Several buffers have been evaluated and 0.05 M pH 9.6 carbonate bicarbonate buffer showed the highest specific binding when it was used as coating buffer. Preparation of IRMA CA 15.3 standard solution gave a linier relation between CA 15.3 concentration and the maximum binding (%B/T) $Y=0.227X+0.5177$ and correlation coefficient R 0.9840

Keywords: Radioimmunoassay, Immunoradiometricassay, tumor marker, CA-15.3

PENDAHULUAN

Senyawa Carbohydrate Antigen 15.3 (CA 15.3) dengan berat molekul antara 300,000-450,000 dalton adalah gabungan glycoprotein heterogeneous. Senyawa ini ditemukan dalam serum individu normal dengan konsentrasi di bawah 35 U/ml, sedangkan pada penderita kanker konsentrasi senyawa ini meningkat lebih tinggi dibandingkan dengan individu normal. Senyawa ini dapat bereaksi dengan monoklonal antibodi CA 15.3. Oleh sebab itu senyawa CA 15.3 dapat digunakan sebagai tumor marker yang penentuan kadarnya dapat dilakukan dengan teknik Immunoradiometric assay (IRMA)[2].

Teknik *IRMA* merupakan salah satu teknik *immunoassay* yang menggunakan radioisotop sebagai perunut agar mudah dideteksi. Teknik ini sangat cocok digunakan dalam penentuan *tumor marker* dalam serum yang mempunyai matrik yang kompleks dan kadarnya yang sangat bervariasi pada pasien normal dan pasien kanker. Teknik assay ini didasarkan pada reaksi antara antigen (Ag) yang terdapat pada cuplikan/standar (*tumor marker*) dengan antibodi bertanda (Ab*) yang berada dalam jumlah berlebih membentuk kompleks antigen-antibodi (Ab-Ag-Ab*). Dengan demikian semakin tinggi kadar *tumor marker* (Ag) yang ada, maka kompleks antigen-antibodi yang terbentuk juga semakin

tinggi sehingga akan memberikan cacahan radioaktivitas yang tinggi[2].

Dewasa ini telah banyak pereaksi atau kit IRMA CA 15.3 yang digunakan (impor). Tetapi untuk memenuhi kebutuhan dalam negeri dan untuk menekan harga yang cukup mahal dari kit impor maka Pusat Radioisotop dan Radiofarmaka (PRR) akan memproduksi kit IRMA CA 15.3 ini secara lokal. Sebelum digunakan secara klinis di rumah sakit, kit IRMA CA 15.3 perlu melewati beberapa tahap pengujian yang meliputi: optimasi pembuatan komponen kit, optimasi rancangan *assay*, validasi dan uji pre-klinis.

Penelitian ini bertujuan melakukan optimasi pembuatan komponen kit IRMA CA 15.3 yang meliputi pembuatan *tracer* (perunut) CA 15.3, pembuatan *coated tube* CA 15.3 dan pembuatan standar CA 15.3

Hipotesis penelitian ini adalah: komponen kit (larutan perunut, larutan standar dan tabung bersalut monoklonal anti CA 15.3) yang memenuhi syarat untuk digunakan dalam *assay* kit IRMA CA 15.3 dapat dibuat, dan yang pada gilirannya dapat menghemat devisa negara.

METODE PENELITIAN

Bahan dan Peralatan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini diantaranya adalah: monoklonal anti CA 15.3 (Biodesign International USA),

Human CA 15.3 antigen *calibrator grade* (Bioscience International USA), kit IRMA CA 15.3 komersil (CIAE China), $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ dan Na_2HPO_4 (Merck), kolom kromatografi PD-10 (Pharmacia), Na^{125}I (PRR, BATAN), tabung reaksi polypropilen (NUNC Swedia) dan *Bovin Serum Albumin*, BSA (Sigma),

Alat yang digunakan dalam penelitian ini diantaranya adalah pencacah Gamma (600 *Gammatec II The Nucleus* dan *Mini Assay tipe G 20*), berbagai ukuran pipet (Eppendorf) beserta tipnya, pH meter (*Fisher Accumet model 810*), pengaduk (*Vortex*), *incubator* (*Soft Incubator SL 1-6000*), timbangan analitik (*Mettler AE 160*)

Beberapa istilah yang digunakan dalam penelitian ini di antaranya adalah:

MB adalah ikatan maksimum spesifik (%B/T)

NSB adalah ikatan tidak spesifik (*Non Specific Binding*)

Ab* adalah antibodi bertanda

Penandaan monoklonal antibodi CA 15.3 dengan Na^{125}I menggunakan metode *Chloramine-T*.

Optimasi penandaan CA 15.3 dilakukan dengan variasi jenis monoklonal yang digunakan (M37552M dan M37901M). Ke dalam tabung iodinasi yang berisi larutan 3,5 μL larutan monoklonal anti CA 15.3 ditambahkan 20 μL dapar fosfat 0,5 M pH 7,4 dan 3,3 μL Na^{125}I (aktivitas $\sim 900 \mu\text{Ci}$).

Selanjutnya ditambahkan 5 μL *Chloramine-T* (1 mg dalam 1 mL dapar fosfat 0,25 M pH 7,4). Campuran kemudian dikocok selama dua menit dengan vortex yang diikuti dengan penambahan 10 μL larutan $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ (1 mg $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ dalam 1 mL dapar fosfat 0,25 M pH 7,4). Selanjutnya campuran dikocok dengan vortex selama dua menit. Hasil penandaan kemudian dimurnikan dengan menggunakan kolom PD-10 yang telah dikondisikan dengan dapar fosfat 0,01 M pH 7,4 dan dijenuhkan dengan 1 mL larutan BSA 10%. Produk monoklonal anti CA 15.3 bertanda ^{125}I (selanjutnya disebut perunut) dielusi dari kolom PD-10 dengan larutan dapar fosfat 0,01 M pH 7,4 dan fraksi eluat ditampung per fraksi dalam tabung reaksi masing-masing sebanyak 500 μL per fraksi (25 fraksi). Tiap fraksi kemudian diukur radioaktivitasnya dengan alat pencacah Gamma (*Gamma Management System, GMS*). Fraksi yang mengandung monoklonal antibodi bertanda kemudian dikumpulkan dan dihitung rendemen penandaannya dengan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{rendemen} = \frac{\text{Radioaktivitas } ^{125}\text{I} \text{ yang terikat pada antibodi}}{\text{Radioaktivitas } ^{125}\text{I} \text{ awal yang digunakan}} \times 100\%$$

Sedangkan kemurnian radiokimia monoklonal antibodi bertanda ditentukan dengan kromatografi lapisan tipis (KLT) dengan fasa diam kertas whatman 1 dan fasa gerak campuran Ethanol:Butanol: NH_4OH

dengan perbandingan 3:2:1. Persentase kemurnian dihitung dengan persamaan berikut:

$$\text{Kemurnian radiokimia} = \frac{\text{Radioaktivitas bercak } ^{125}\text{I pada KLT}}{\text{Radioaktivitas } ^{125}\text{I dalam bercak produk KLT}} \times 100\%$$

Radioaktivitas monoklonal antibodi bertanda diukur dengan dose calibrator sedangkan konsentrasi protein diukur dengan spektrometer UV pada panjang gelombang 280 nM.

Aktifitas spesifik antibodi bertanda ditentukan dengan persamaan dibawah ini.

$$\text{Aktifitas Spesifik} = \frac{\text{Radioaktivitas dalam fraksi antibodi}}{\text{Massa dari antibodi yang digunakan}}$$

Pembuatan tabung bersalut (*coated tube*) monoklonal anti CA 15.3

Optimasi pembuatan *coated tube* dilakukan dengan variasi larutan *coating* yang digunakan (dapar karbonat, dapar karbonat bikarbonat, dapar fosfat dan dapar fosfat saline, PBS). Larutan *coating* (200 µL) dimasukkan ke dalam tabung dan diinkubasikan semalam pada temperatur 4°C. Tabung kemudian dicuci dengan 1000 µL aquademin (dua kali). Selanjutnya tabung di blok dengan 500 µL larutan *blocking* (0,05 M Buffer Phosphate pH 7,4 + 10 g/L BSA + 20 g/L insitol + 1 g/L NaN₃) dan kemudian diinkubasikan semalam pada temperatur 4°C.

Terakhir tabung dicuci dengan 1000 µL aquademin sebanyak dua kali. Ikatan maksimum spesifik masing-masing tabung kemudian ditentukan dengan prosedur assay.

Pembuatan larutan standar induk CA 15.3

Larutan standar induk CA 15.3 dengan konsentrasi 250 U/ml disiapkan dengan cara memipet 25,4 µL Human CA 15.3 *calibrator grade* (196.800 U/ml) yang kemudian diencerkan dengan 19974,6 µL dapar fosfat saline (PBS) 0,01 M pH 7,4 + 0,1 % NaN₃.

Pembuatan larutan standar CA 15.3

Konsentrasi larutan standar CA 15.3 yang disiapkan adalah 0, 15, 50, 125 dan 250 mIU/mL. Larutan standar disiapkan dari larutan induk (250 U/ml) sesuai dengan Tabel 1. dibawah ini:

Tabel 1. Penyiapan larutan standar CA 15.3.

No.	Konsentrasi larutan standar CA 15,3 (mIU/mL)	Volume larutan induk Human CA 15.3 (µL) yang dipipet	Volume dapar PBS 0.01M pH 7.3 (µL) yang ditambahkan
1	250	10000	0
2	125	5000	5000
3	50	2000	8000
4	15	600	9400
5	0	0	10000

Non Spesific Binding (%NSB) dan *Maximum Binding(%MB)* setiap standar kemudian ditentukan dengan prosedur *assay* dan dihitung dengan persamaan berikut.

$$\% \text{non specific binding (NSB)} = \frac{\text{Cacahan NSB - BG}}{\text{cacahan NSB Total - BG}} \times 100\%$$

$$\% \text{maximum binding (MB)} = \frac{\text{Cacahan fasa terikat - BG}}{\text{cacahan NSB Total - BG}} \times 100\%$$

BG : Background

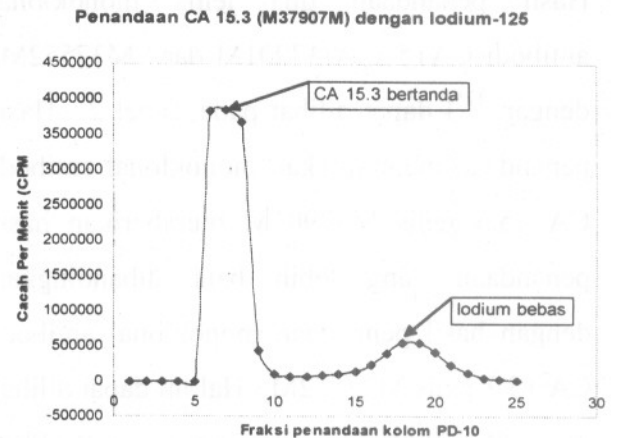
Protocol Assay

Tabung coated tube (CT) diberi nomor dan ditambah pengencer standar CA 15.3 sebanyak 150 μL . Sejumlah 50 μL larutan standar 0, 15, 50, 125 dan 250 mIU/mL dan sampel ditambahkan ke masing-masing tabung CT yang telah diberi nomor. Vortek hingga homogen dan diinkubasi dua jam pada temperatur 37 $^{\circ}\text{C}$. Cairan dibuang dan dicuci dengan aquademin dua kali 1000 μL . Sejumlah 200 μL larutan perunut dengan aktivitas $\pm 200,000$ cpm ditambahkan ke masing-masing tabung CT, vortek hingga homogen dan diinkubasi 3 jam pada suhu ruangan. Cairan dibuang dan dicuci dengan aquademin dua kali 1000 μL , kemudian didekantasi. Tabung diukur dengan alat pencacah Gamma selama 1 menit.

HASIL DAN PEMBAHASAN

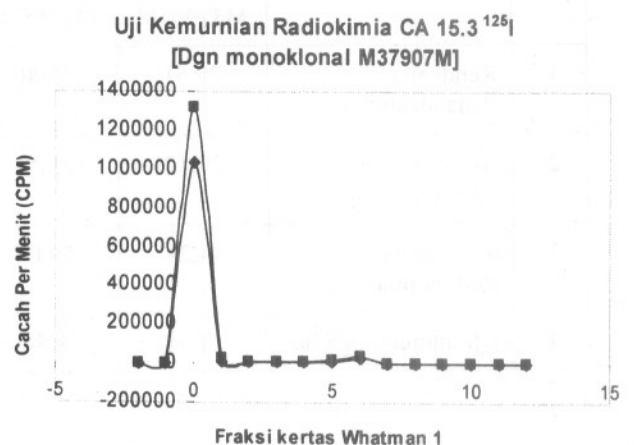
Penandaan monoklonal antibodi CA 15.3

Radiokromatogram pemisahan monoklonal antibodi CA 15.3 jenis M37901M bertanda dari fraksi bebas ^{125}I dengan kolom PD 10 dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Radiokromatogram penandaan monoklonal antibodi CA 15.3 dengan Na^{125}I (Kolom PD-10, 0.5 mL/fraksi.)

Fraksi yang mengandung monoklonal antibodi CA 15.3 jenis M37901M bertanda kemudian dikumpulkan dan diuji kemurnian radiokimianya dengan KLT. Gambar 2 memperlihatkan radiokromatogram hasil uji kemurnian ^{125}I -CA 15.3.



Gambar 2. Radiokromatogram uji kemurnian ^{125}I -CA 15.3.

Hasil penandaan dua jenis monoklonal antibodi CA15.3 (M37901M dan M37552M) dengan ^{125}I dapat dilihat pada Tabel 2. Hasil penandaan menunjukkan monoklonal antibodi CA 15.3 jenis M37901M memberikan hasil penandaan yang lebih baik dibandingkan dengan hasil penandaan monoklonal antibodi CA 15.3 jenis M37552M. Hal ini dapat dilihat dari % rendemen penandaan (79,51%), aktivitas spesifik (29,12 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$), kemurnian radiokimia (94,21%) dan uji imunologi (11,94%) yang jauh lebih tinggi dibanding dibandingkan dengan % rendemen penandaan (56,80%), aktivitas spesifik (25,51 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$), kemurnian radiokimia (79%) dan uji imunologi (0,84%) hasil penandaan monoklonal antibodi CA 15.3 jenis M37901M.

Tabel 2. Hasil Penandaan Monoklonal Antibodi perunut CA15.3

No	Analisis yang dilakukan	Jenis Monoklonal	
		M37901M	M37552M
1.	Rendemen Penandaan(%)	79,51	56,80
2.	Aktivitas Spesifik($\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$)	29,12	25,51
3.	Kemurnian Radiokimia (%)	94,21	79,00
4.	Uji imunologi(%)	11,94	0,84

Pembuatan coated tube CA 15.3

Hasil uji imunologi coatet tube CA 15.3 yang dibuat dengan variasi berberapa larutan coating dapat dilihat pada Tabel 3. Dari beberapa larutan coating yang digunakan, dapar karbonat-bikarbonat 0,05 M, pH 9.6 adalah merupakan larutan coating yang terbaik karena memberikan ikatan maksimum spesifik yang relative tinggi ($3,72 \pm \text{SD} \%$) dibandingkan dengan larutan coating lainnya (1,45 – 3,65).

Tabel 3. Hasil Uji immonologi coated tube CA 15.3 dengan barograph. CA 15.3 larutan coating.

No.	Larutan <i>Coating</i> yang digunakan	MX \pm SD (%) (Triplikasi)
1.	Dapar Phosphate 0,03 M, pH 7,5	1,45 \pm 0,33
2.	Dapar Phosphate 0,03 M, pH 8,6	1,57 \pm 0,37
3.	Dapar Karbonat 0,05 M, pH 8,6	1,50 \pm 0,35
4.	Dapar Karbonat 0,05 M, pH 9,6	1,61 \pm 0,32
5.	Dapar Karbonate-Bikarbonat 0,05 M, pH 8,6	3,65 \pm 0,38
6.	Dapar Karbonate-Bikarbonat 0,05 M, pH 9,6	3,72 \pm 0,47
7.	Dapar Fosfat- Salin 0,1 M, pH 7,5	1,58 \pm 0,25
8.	Dapar Fosfat Salin 0,05 M, Ph 7,5	2,13 \pm 0,49

Pembuatan Standar Antigen CA 15.3

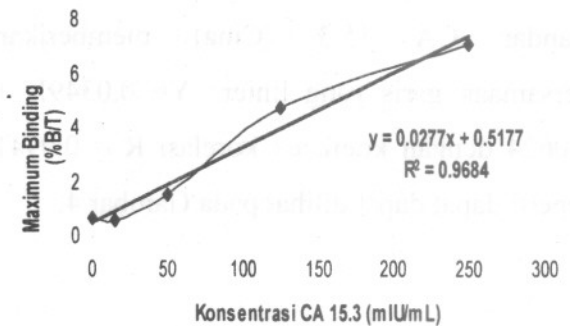
Hasil uji immonologi (*Maximum Binding*) larutan standar antigen CA 15.3 yang disiapkan dalam penelitian ini (PRR) dengan menggunakan *coated tube* dan perunut dari kit komersial CIAE dapat dilihat pada pada Tabel 4.

Tabel 4. Hasil uji immonologi larutan standar antigen CA 15.3 (PRR)

No.	Konsentrasi larutan Standar antigen CA 15.3 (mIU/mL)	Maximum Binding, %
1.	0	0,67
2.	15	0,60
3.	50	1,58
4.	125	4,82
5.	250	7,11

Kurva kalibrasi standar antara konsentrasi larutan standar antigen CA 15.3 (PRR) dengan % Maximum Binding yang memberikan persamaan garis yang linier $Y = 0,227X + 0,5177$ dengan koefisien korelasi $R = 0,9840$ dapat dilihat pada Gambar 3.

Kurva kalibrasi Standar CA 15.3, PRR; (CT, TRA) CIAE



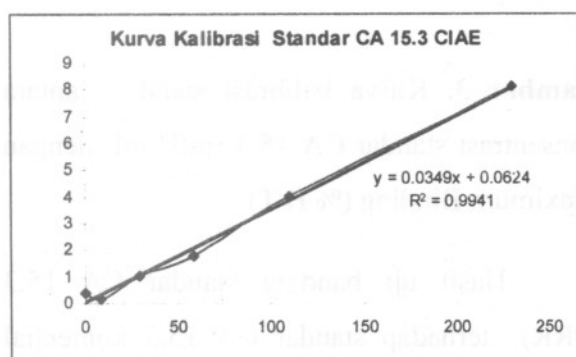
Gambar 3. Kurva kalibrasi standar antara konsentrasi standar CA 15.3 (mIU/mL) dengan Maximum Binding (% B/T)

Hasil uji banding standar CA 15.3 (PRR) terhadap standar CA 15.3 komersial dari China (CIAE) yang dilakukan dengan cara membandingkan hasil uji immonologi (% ikatan maksimum spesifik) masing-masing standar dapat dilihat pada Table 4.

Tabel 5. Perbandingan hasil uji immonologi (% ikatan maksimum spesifik) standar CA 15.3 (China) dan standar CA 15.3 (PRR)

No.	Konsentrasi larutan Standar CA 15.3 (mIU/mL)	% Ikatan Maksimum	
		CIAE (China)	PRR
1.	0	0,41	0,67
2.	8,2	0,20	0,60
3.	29	1,04	1,58
4.	58	1,76	4,82
5.	110	4,04	7,11
6.	230	8,12	

Kurva kalibrasi standar antara konsentrasi dengan % ikatan maksimum spesifik larutan standar CA 15.3 (Cina) memberikan persamaan garis yang linier $Y = 0,0349X + 0,0624$ dengan koefisien korelasi $R = 0,9941$ seperti dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Kurva Kalibrasi Standar CA 15.3 (mIU/mL), CIAE (China) dengan Maximum Binding (%B/T)

Hasil uji % ikatan maksimum spesifik antara standar CA 15.3 (PRR) dengan standar CA 15.3 (Cina) memberikan hasil yang tidak berbeda. Oleh sebab itu standar yang dibuat dalam penelitian ini selanjutnya dapat digunakan untuk optimasi rancangan *assay* kit IRMA CA 15.3.

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa: a) Monoklonal antibodi CA 15.3 jenis M37901M yang memberikan

rendemen hasil penandaan (79,51%), aktivitas spesifik (29,12 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$), kemurnian radiokimia (94,21%) dan uji imunologi (11,94%) merupakan bahan dasar untuk pembuatan *tracer* yang lebih baik dibandingkan monoklonal jenis M37552M yang hanya memberikan rendemen hasil penandaan (56,80%), aktivitas spesifik (25,51 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$), kemurnian radiokimia (79,00%) dan uji imunologi (0,84%). b) Dapar karbonat-bikarbonat 0,05 M, pH 9,6 merupakan larutan *coating* yang lebih baik untuk penyiapan *coated tube* (diindikasikan dengan ikatan maksimum spesifik *coated tube* yang relatif tinggi, 3,72%) dibandingkan dengan beberapa dapar lainnya yang memberikan *coated tube* dengan ikatan maksimum spesifik yang hanya berkisar antara 1,45 – 2,65%. c) Standar antigen CA 15.3 yang disiapkan (PRR) dapat digunakan untuk mengkalibrasi contoh karena standar ini memberikan kurva kalibrasi standar yang linier (antara konsentrasi standar CA 15.3 dengan ikatan maksimum spesifik) dengan persamaan garis $Y = 0,23X + 0,52$, koefisien korelasi $R = 0,9840$, dengan NSB 0,67% dan ikatan maksimum spesifik 7,11 %.

DAFTAR PUSTAKA

1. Yayasan Kanker Indonesia (YKI), 2007

2. W. REDIATNING, SUKIYATI DJ, Immonoradiometricassay (IRMA) Dalam Deteksi Dan Pemantauan Kanker, *Jurnal Radioisotop Dan Radiofarmaka*, P2RR-BATAN, Serpong, Vol. 3, No 1, (2000), p.55-70
3. G. SOOLETORMOS, D. NIELSEN, V.SCHIOLER, *at al*, A novel method for monitoring high-risk breast cancer with tumor marker: CA 15.3 compared to CEA and TPA, *Animal of Oncology*, **4**, (1993) 861-870
4. G.BANFI, P. PARMA, M. PONTILLO, Stability of Tomor Marker CA 19.9, CA 125, and CA 15.3 in Serum Obtained from plain Tubes and Tubes containing Thxotropic Gel Separator, *Clinical Chemistry*, **43**, (1997) p. 2430-2431
5. DE LA LANDE B, K. HACENE, J.L. FLOIRAS, *at al*, Prognotic value of CA 15.3 kinetic for metastatic breast cancer, Service de Radiotherapie, *Centre Rene Huguenin de Lutlle Contre le Cancer, saint-Cloud, France*, **17**(4) (2002): 231-8.
6. R. MOLINA, J. JO, X. FIELLA, *at al*, c-erbB-2 oncoprotein, CEA, and CA 15.3 in patients with breast cancer, *prognostic value*, **51**(2) (1998), 109-19
7. F. GUADAGNI, P. FERRONI, S. CARLINI, *at al*, A re-evaluation of carcinoembryonic antigen (CEA) as serum marker of breast cancer: a prospective longitudinal study, *Clinical Cancer Research*; **7**(8), (2001), 2357-2362
8. M BALNC, S GAUCHEZ, B COLOMBE, *at al*, False Evaluation of CA 15.3 Tumour Markers in Patients Under High Active Antiretroviral Therapy: Case Report and Aim of Study, *Antiviral Therapy*; **8**, (2003)
9. D SCUTT, J T MANNING, G H WHITEHOUSE, *at al*, The relationship between breast asymmetry, breast size and the occurrence of breast cancer, *The British Journal of Radiology*, **70**, (1997), 1017-1021.