



# CanAg SCC EIA

Prod. No. 800-10

Gebrauchsanweisung

Immunometrischer Enzymimmunoassay-Kit

2009-11

Für 96 Tests

## **WICHTIGE GEBRAUCHSINFORMATION**

Das SCC Antigen ist in Haut, Schweiß und Speichel vorhanden und wird leicht durch Aerosole (z.B. durch Niesen) verteilt. Nach dem Öffnen der Packung und während der Testdurchführung sollten deshalb Handschuhe getragen werden, wenn mit den Reagenzröhrchen, der Mikrotiterplatte, den Pipettenspitzen etc. gearbeitet wird, um fälschlicherweise erhöhte Werte durch Kontamination zu vermeiden. Außerdem sollten alle erhöhten Werte durch eine Wiederholung des Tests bestätigt werden.

## **ZWECKBESTIMMUNG**

Der CanAg SCC EIA Kit ist für die quantitative Bestimmung des Plattenepithelzellkarzinom- (squamous cell carcinoma, SCC) Antigens aus Serum bestimmt und für das Management von Patienten mit Plattenepithelzellkarzinom gedacht.

## **ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG DES TESTS**

Bei dem Plattenepithelzellkarzinom-Antigen (SCC Ag) handelt es sich um eine Gruppe von Glykoproteinen mit einem Molekulargewicht von ~45 kDa. Es wird zu der Gruppe der Serin-/Cystein-Protease-Inhibitoren (1) gezählt. Ursprünglich wurde das Protein von Kato und Mitarbeitern aus humanem Plattenepithelzellkarzinomgewebe isoliert. Es zeigte sich, dass es aus mindestens 10 Unterfraktionen mit unterschiedlichen isoelektrischen Punkten besteht (2). Neuere Studien haben gezeigt, dass das SCC Antigen aus zwei verschiedenen, aber hoch homologen Genprodukten, SCCA1 und SCCA2, mit unterschiedlicher Hemmspezifität, besteht (3).

SCC Antigen ist ein serologischer Marker des Plattenepithelzellkarzinoms der Zervix, Vulva, Lunge, Hals und Nacken sowie des Ösophagus. Bei dem Plattenepithelzellkarzinom des Uterus kann eine Untersuchung des SCC Ag aus Serum als prognostischer Faktor im frühen Stadium (7) verwendet

werden. Es wurde vorgeschlagen, diese Untersuchung zur Selektion für eine adjuvante Therapie von Patientinnen mit hohem Risiko zu nutzen (4). Außerdem korreliert das Profil des SCC Ags bei Patientinnen mit erhöhter Konzentration des SCC Ags vor dem Beginn der Therapie mit der Antwort einer Strahlen- und Chemotherapie, somit kann die Bestimmung des SCC Ags zum Monitoren der Wirksamkeit der Therapie und zur frühen Erkennung eines Rückfalls der Erkrankung genutzt werden (4).

## **PRINZIP DES TESTS**

Beim CanAg SCC EIA handelt es sich um einen nicht kompetitiven Festphasen-Immunoassay auf der Grundlage des direkten Sandwich-Verfahrens. Kalibratoren und Patientenproben werden zusammen mit biotinyliertem monoklonalen Anti-SCC-Antikörper und mit Meerrettich-Peroxidase (HRP) markiertem monoklonalen Anti-SCC-Antikörper in Streptavidin-beschichteten Mikrotiterstreifen inkubiert. Nach dem Waschen wird in jede Vertiefung gepufferte Substrat-Chromogen-Lösung (Wasserstoffperoxid und 3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidin) hinzugegeben und die Enzymreaktion abgewartet. Während der Enzymreaktion entwickelt sich bei Präsenz des Antigens eine Blaufärbung. Die Farbintensität ist zu der in den Proben vorhandenen SCC-Menge proportional.

Die Farbintensität wird mit einem Mikrotiterplatten-Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 620 nm (oder wahlweise bei 405 nm nach Zugabe von Stopplösung) bestimmt. Für jeden Assay wird eine Eichkurve erstellt, indem für jeden Kalibrator der Extinktionswert gegen die Konzentration aufgetragen wird. Die SCC-Konzentrationen der Patientenproben werden dann anhand der Eichkurve abgelesen.

## **REAGENZILIEN**

- Jeder "CanAg SCC EIA-Kit" enthält Reagenzien für 96 Tests.
- Das Verfallsdatum des Kits ist auf dem Etikett außen auf dem Karton angegeben.
- Das Kit darf nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Reagenzien aus verschiedenen Kit-Chargen dürfen nicht gemischt werden.
- Den Kit bei 2–8 °C lagern. Nicht einfrieren.
- Die nachstehende Tabelle enthält Angaben zur Haltbarkeit der geöffneten Reagenzien, sofern diese nicht verunreinigt sind, in den gut verschlossenen Originalbehältnissen aufbewahrt und vorschriftsmäßig verwendet werden. Unmittelbar nach dem Gebrauch wieder bei 2–8 °C lagern.

Komponente	Menge	Lagerung und Stabilität nach dem Öffnen
------------	-------	--------------------------------------------

MICROPLA
----------

<b>Streptavidin-Mikrotiterplatte</b>	1 Platte	bis zu dem auf der Platte angegebenen Verfallsdatum bei 2 bis 8 °C
--------------------------------------	----------	--------------------------------------------------------------------

12 x 8 mit Streptavidin beschichtete Vertiefungen. Nach dem Öffnen nicht benötigte Streifen umgehend in die Aluminiumtüte mit Trockenmittel zurücklegen. Zum Trockenhalten wieder sorgfältig verschließen.

<b>SCC-Kalibratoren</b>	5 Fläschchen	4 Wochen bei 2–8 °C 3 Monate bei –20 °C oder kälter
-------------------------	--------------	--------------------------------------------------------

CAL	SCC	A
-----	-----	---

1 x 0.75 ml

CAL	SCC	B
-----	-----	---

1 x 0.75 ml

CAL	SCC	C
-----	-----	---

1 x 0.75 ml

CAL	SCC	D
-----	-----	---

1 x 0.75 ml

CAL	SCC	E
-----	-----	---

1 x 0.75 ml

Humanes SCC in einer Tris-HCl-gepufferten Salzlösung mit Rinderserumalbumin, einem inerten gelben Farbstoff und 0,01 % Methylisothiazolon (MIT) als Konservierungsmittel. Gebrauchsfertig. Vor Verwendung mit Wasser rekonstituieren. **ACHTUNG:** Die genaue SCC-Konzentration ist chargenabhängig und ist auf dem Etikett jedes Fläschchens angegeben.

BIOTIN	Anti-SCC
--------	----------

<b>Biotin Anti-SCC</b>	1 x 15 ml	bis zu dem auf dem Fläschchen angegebenen Verfallsdatum bei 2 bis 8 °C
------------------------	-----------	------------------------------------------------------------------------

Biotinylierter monoklonaler Anti-SCC-Antikörper von Mäusen, ca. 1 µg/ml. Enthält phosphatgepufferte Kochsalzlösung (pH-Wert 7,2), Rinderserumalbumin, Rinderimmunglobulin, Blockierungsreagenz, Detergente, einen inerten blauen Farbstoff und 0,01 % Methylisothiazolon (MIT) als Konservierungsmittel. Vor Gebrauch mit dem Tracer HRP Anti-SCC mischen.

Komponente	Menge	Lagerung und Stabilität nach dem Öffnen
------------	-------	-----------------------------------------

<b>CONJ</b>   <b>Anti-SCC</b>		
<b>Tracer, HRP Anti-SCC</b>	1 x 0.75 ml	bis zu dem auf dem Fläschchen angegebenen Verfallsdatum bei 2 bis 8 °C
StammLösung von mit Meerrettich-Peroxidase (HRP) markiertem monoklonalen Anti-SCC-Antikörper von Mäusen, ca. 40 µg/ml. Enthält Konservierungsmittel. Vor Gebrauch mit Biotin Anti-SCC mischen.		

<b>SUBS</b>   <b>TMB</b>		
<b>TMB HRP Substrate</b>	1 x 12 ml	bis zu dem auf dem Fläschchen angegebenen Verfallsdatum bei 2 bis 8 °C
Enthält gepuffertes Wasserstoffperoxid und 3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidin (TMB). Gebrauchsfertig.		

<b>STOP</b>		
<b>Stopp-Lösung</b>	1 x 15 ml	bis zu dem auf dem Fläschchen angegebenen Verfallsdatum bei 2 bis 8 °C
Enthält 0,12 M Chlorwasserstoffsäure. Gebrauchsfertig.		

<b>WASHBUF</b>   <b>25X</b>		
<b>Waschpufferkonzentrat</b>	1 x 50 ml	bis zu dem auf der Flasche angegebenen Verfallsdatum bei 2 bis 8 °C
Eine Tris-HCl-gepufferte Salzlösung mit Tween 20. Enthält Germall II als Konservierungsmittel. Vor Gebrauch 25fach mit Wasser verdünnen.		

#### Anhaltspunkte für Instabilität

Das TMB-HRP-Substrat sollte farblos oder leicht bläulich sein. Eine Blaufärbung ist ein Anzeichen dafür, dass das Reagenz verunreinigt ist und nicht mehr verwendet werden sollte.

#### WARNHINWEISE UND SICHERHEITSVORKEHRUNGEN

##### Für In-vitro-Diagnostik.

- Nur für geschultes Fachpersonal.
- Bitte beachten Sie die Vorschriften zur Laborsicherheit in der Publikation Nr. (CDC) 88-8395 des US Department of Health and Human Services (Bethesda, MD, USA) oder andere gleichwertige regionale oder nationale Bestimmungen.

- Alle Patientenproben gelten als potenziell infektiös und sind entsprechend zu handhaben.
- Befolgen Sie die lokalen Richtlinien zur Entsorgung von anfallenden Abfallstoffen.

## **PROBENTNAHME UND UMGANG MIT DEM MATERIAL**

CanAg SCC EIA dient zur Analyse von Serumproben. Durch Venenpunktion Blut abnehmen und das Serum nach üblichen Verfahren trennen. Die Proben können ein Tag bei 2 bis 8 °C gelagert werden. Bei längeren Lagerzeiten wird eine Temperatur von –70 °C oder darunter empfohlen. Die Proben nicht wiederholt einfrieren und auftauen. Tiefgefrorene Proben möglichst bei 2 bis 8 °C langsam über Nacht auftauen lassen und dann vor der Analyse auf Raumtemperatur bringen.

## **VERFAHREN**

### **Benötigtes, mit dem Kit aber nicht mitgeliefertes Material**

#### **1. Schüttler für Mikrotiterplatten**

Das Schütteln sollte mäßig bis kräftig sein. Schüttelbewegung längs: ca. 200 U/min, Schüttelfrequenz: 700-900/min.

#### **2. Waschvorrichtung für Mikrotiterplatten**

Waschen der Platte kann wahlweise vollautomatisch für 1 bis 6 Waschzyklen erfolgen (minimal 350 µL/ Kavität). Wird kein automatisches Mikrotiterplatten-Waschgerät eingesetzt, empfiehlt sich die Verwendung des manuellen Waschgerätes Nunc Immuno-8.

#### **3. Spektrophotometer für Mikrotiterplatte**

Mit einer Wellenlänge von 620 und/oder 405 nm und einem Extinktionsbereich von 0 bis 3,0.

#### **4. Präzisionspipetten**

Mit Einweg-Plastikspitzen für Mikroliter-oder Milliliter-Volumina. Eine 8-Kanal-Pipette oder Dispenserpipette mit Einweg-Plastikspitzen für 100 µl ist hilfreich, aber nicht unbedingt erforderlich.

#### **5. Destilliertes oder deionisiertes Wasser**

Zur Rekonstituierung der SCC Kalibratoren und Zur Herstellung der Waschlösung.

### **Hinweise zum Ablauf**

1. Damit der ordnungsgemäße Gebrauch des "CanAg SCC EIA-Kits" sichergestellt ist, muss die Packungsbeilage genau verstanden werden. Die im Kit enthaltenen Reagenzien sind gemeinsam zu verwenden. Keine zwar identischen, aber aus Kits mit unterschiedlichen Chargennummern stammenden Reagenzien miteinander vermischen. Die Kit-Reagenzien nach dem außen auf dem Karton aufgedruckten Verfallsdatum nicht mehr verwenden.
2. Die Reagenzien sollten vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur (20 bis 25 °C) gebracht werden. Damit genaue Ergebnisse erzielt werden, sollte der Assay nur bei Temperaturen zwischen 20 und 25 °C durchgeführt werden. Gefrorene Proben sollten nur langsam auf Raumtemperatur gebracht werden und sind nach dem Auftauen leicht, aber gründlich gemischt werden.

3. Vor dem Pipettieren von Kalibratoren, Kontrollen und Patientenproben ist es ratsam, die Streifen zu markieren, damit die Proben während der Untersuchung und danach eindeutig zugeordnet werden können.
4. Die Notwendigkeit effizienten und gründlichen Waschens zur Trennung von gebundenem und ungebundenem Antigen und von Reagenzien aus den an der Festphase gebundenen Antikörper-Antigen-Komplexen ist einer der wichtigsten Schritte in einem EIA. Damit die Effizienz der Waschschrte sichergestellt ist, müssen Sie darauf achten, dass alle Kavitäten bei jedem Waschzyklus bis zum oberen Rand vollständig mit Waschlösung gefüllt werden, dass die Waschlösung angemessen schnell pipettiert wird, dass die Flüssigkeit zwischen und nach den Waschzyklen vollständig aus den Kavitäten abgesaugt wird und dass die Kavitäten leer sind. Sollten noch Flüssigkeitsreste vorhanden sein, drehen Sie die Platte um und klopfen sie vorsichtig auf saugfähigem Papier aus.
  - Automatische Teststreifen-Waschvorrichtung: Halten Sie die Anweisungen des Herstellers zur Reinigung und Instandhaltung genau ein und führen Sie vor und nach jedem Inkubationsschritt die vorgeschriebene Anzahl an Waschzyklen durch. Es wird dringend empfohlen, den Verarbeitungsmodus „Strip“ (Teststreifen) und den Waschmodus „Overflow“ (Überlauf) mit einem Pipettiervolumen von 800 µl zu verwenden. Die Aspirations-/Waschvorrichtung sollte nicht für längere Zeit mit der Waschlösung stehen gelassen werden, da die Nadeln verstopfen könnten, was dazu führt, dass zu wenig Flüssigkeit abgegeben und wieder abgesaugt wird.
5. Das TMB-HRP-Substrat ist sehr empfindlich gegenüber Kontamination. Um eine optimale Haltbarkeit des TMB-HRP-Substrats sicherzustellen, die benötigte Menge aus dem Fläschchen in ein sorgfältig gereinigtes Behältnis oder vorzugsweise in eine Einweg-Plastikschale gießen, um eine Kontamination des Reagenzes zu vermeiden. Es ist darauf zu achten, dass nur saubere Einweg-Plastikpipettenspitzen (oder Dispenser-Pipettenspitzen) verwendet werden.
6. Es ist darauf zu achten, dass beim Umgang mit Proben und Reagenzien nur saubere Einweg-Plastikpipettenspitzen verwendet werden und eine einwandfreie Pipettiertechnik angewandt wird. Verschleppung ist zu verhindern, indem die Pipettenspitze knapp über den oberen Rand der Vertiefung gehalten wird. Weder den den Plastikstreifen noch die Oberfläche der Flüssigkeit berühren. Besonders bei der Verwendung der TMB-HRP-Substrat-Lösung ist ordentliches Pipettieren unerlässlich.

---

#### **Vorbereitung der Reagenzien**

---

#### **Stabilität der vorbereiteten Reagenzien**

---

#### **SCC-Kalibratoren**

4 Wochen bei 2–8 °C

3 Monate bei –20 °C oder kälter

Exakt 0,75 mL destilliertes Wasser in jedes Fläschchen geben und vorsichtig schütteln. Mindestens 15 Minuten stehen lassen, damit die Rekonstituierung vollständig stattfinden kann.

**ACHTUNG:** Die Konzentration der Kalibratoren ist auf den Etiketten angegeben und sollte zur Berechnung der Ergebnisse herangezogen werden.

---

---

**Vorbereitung der Reagenzien**

---

**Stabilität der vorbereiteten Reagenzien**

---

**Waschlösung**

in einem geschlossenen Behälter zwei Wochen  
bei 2 bis 25 °C

Die 50 mL Waschkonzentrat in einen sauberen Behälter geben und 1200 mL destilliertes oder entionisiertes Wasser zugeben, um eine 25 fach verdünnte, gepufferte Waschlösung zu erhalten.

---

**Antikörperlösung**

drei Wochen bei 2 bis 8 °C

Die benötigte Menge Antikörperlösung vorbereiten, indem 50 µl Tracer, HRP Anti-SCC mit 1 ml Biotin Anti-SCC pro Streifen vermischt werden (siehe nachfolgende Tabelle und Protokoll).

---

<b>Anzahl der Streifen</b>	<b>Tracer, HRP Anti-SCC (µl)</b>	<b>Biotin Anti-SCC (ml)</b>
1	50	1
2	100	2
3	150	3
4	200	4
5	250	5
6	300	6
7	350	7
8	400	8
9	450	9
10	500	10
11	550	11
12	600	12

---

Zur Herstellung der Antikörperlösung eine saubere Flasche aus Kunststoff oder Glas verwenden.

**Alternative:** Den Inhalt des Tracers, HRP Anti-SCC in das Fläschchen mit Biotin Anti-SCC gießen und vorsichtig mischen. Es ist darauf zu achten, dass der gesamte Tracer, HRP Anti-SCC in das Fläschchen mit Biotin Anti-SCC gegossen wird.

**HINWEIS:** Die Antikörperlösung ist bei 2 bis 8 °C für 3 Wochen stabil. Nicht mehr Antikörperlösung vorbereiten, als innerhalb dieser Zeit verbraucht wird. Es ist darauf zu achten, dass die Lösung vorschriftsgemäß gelagert wird.

### Testdurchführung

Jede Bestimmung für Kalibratoren und Patientenproben sollte doppelt durchgeführt werden. Bei jedem Assay sollte eine Eichkurve erstellt werden. Alle Reagenzien und Proben sind vor Testbeginn auf Raumtemperatur (20–25 °C) zu bringen.

1. Mit der Vorbereitung der SCC-Kalibratoren, der Waschlösung und der Tracer-Arbeitslösung beginnen. Es ist wichtig, nur saubere Behälter zu verwenden und die Anweisungen sorgfältig zu befolgen.
2. Benötigte Anzahl Streifen der Mikrotiterplatte in den Rahmen einsetzen. (Die nicht benötigten Streifen umgehend wieder in die Aluminiumtüte mit Trockenmittel geben und die Tüte wieder sorgfältig verschließen). Jeden Streifen einmal mit der Waschlösung waschen. Nur so viele Streifen waschen, wie innerhalb von 30 min bearbeitet werden können.
3. Nach folgendem Schema 25 µl der SCC-Kalibratoren (CAL A,B,C,D,E) und Patientenproben (Pat.) in die Vertiefungen pipettieren:

	1	2	3	4	5	6	7 usw.
A	Cal A	Cal E					
B	Cal A	Cal E					
C	Cal B	Pat1					
D	Cal B	Pat1					
E	Cal C	Pat2					
F	Cal C	Pat2					
G	Cal D	usw.					
H	Cal D						

4. Mit einer 100-µl-Präzisionspipette (oder einer 100-µl-8-Kanal-Präzisionspipette) 100 µl Antikörperlösung in jede Vertiefung gegeben. Verschleppung verhindern, indem die Pipettenspitze knapp über die Vertiefungen gehalten wird. Nicht den Kunststoffstreifen oder die Oberfläche der Flüssigkeit berühren.
5. Den Rahmen mit den Mikrotiterstreifen unter konstantem Schütteln auf einem Mikrotiterplatten-Schüttler bei Raumtemperatur (20–25 °C) über 1 Stunde ( $\pm 5$  min) inkubieren.
6. Jeden Streifen nach dem unter Punkt 4 des Abschnitts "Hinweise zum Ablauf" beschriebenen Verfahren 6 Mal waschen.
7. Nach dem unter Punkt 4 in diesem Abschnitt beschriebenen Pipettierverfahren jeder Vertiefung 100 µl TMB-HRP-Substrat zugeben. Das TMB-HRP-Substrat sollte so schnell wie möglich in die Vertiefungen gegeben werden: die Zeit zwischen Zugabe in die erste und letzte Vertiefung sollte 5 Minuten nicht überschreiten.
8. Unter konstantem Schütteln 30 Minuten ( $\pm 5$  Minuten) lang bei Raumtemperatur inkubieren. Direkte Sonneneinstrahlung vermeiden.

9. Die Extinktionswerte in einem Mikrotiterplatten-Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 620 nm ablesen.

#### **Alternativopotion zu Punkt 9:**

Verfügt Ihr Labor nicht über ein Mikrotiterplatten-Spektrophotometer zum Ablesen der Extinktion bei 620 nm, können die Extinktionswerte wie folgt bestimmt werden:

**Alt. 9.** 100 µl Stopplösung in die Vertiefungen geben. Mischen und die Extinktion innerhalb von 15 Minuten nach Zugabe der Stopplösung bei 405 nm in einem Mikrotiterplatten-Spektrophotometer ablesen.

#### **Messbereich**

Mit dem "CanAg SCC EIA-Kit" können Konzentrationen zwischen 0,3 und 50 µg/l gemessen werden. Wenn mit SCC-Konzentrationen zu rechnen sind, die oberhalb dieses Messbereichs liegen, wird empfohlen, die Proben vor der Analyse mit normalem Humanserum zu verdünnen. **ACHTUNG:** Das zur Verdünnung verwendete Serum sollte ebenfalls analysiert werden, um die endogene SCC-Konzentration bestimmen zu können (vgl. "Berechnung der Ergebnisse").

#### **Qualitätskontrolle**

Die CanChek Tumor Marker Kontroll Seren Level 1 und 2 (gesondert erhältlich unter REF 107-20) werden für die Validierung der Testserien empfohlen. Falls Werte außerhalb des angegebenen Bereichs erhalten wurden, sollten die Reagenzien sowie die Funktion des Readers überprüft und die Bestimmung wiederholt werden.

#### **Referenzmaterial**

Da für SCC-antigen keine handelsüblichen Referenzmaterialien erhältlich sind, werden die CanAg SCC-Kalibrator-Werte anhand firmeninterner Referenzstandards abgeglichen.

#### **BERECHNUNG DER ERGEBNISSE**

Bei Verwendung eines Mikrotiterplatten-Spektrophotometers mit einem eingebautem Datenkalkulationsprogramm, sollte anhand der Gebrauchsanweisung des Gerätes und der auf den Etiketten jedes einzelnen SCC-Kalibrators angegebenen Konzentrationen ein entsprechendes Programm erstellt werden.

Zur automatischen Berechnung der SCC-Ergebnisse wird empfohlen, eine der nachfolgend beschriebenen Methoden anzuwenden:

- Kurvenanpassung mit kubischem Spline. Kalibrator 0 sollte mit dem Wert 0 µg/l in die Kurve aufgenommen werden.
- Kurvenanpassung mit geglättetem Spline. Kalibrator 0 sollte als Leerwert eingesetzt werden.
- Interpolation mit Punkt-zu-Punkt-Bewertung. Kalibrator 0 sollte mit dem Wert 0 µg/l in die Kurve aufgenommen werden.

- Quadratische Kurvenanpassung. Kalibrator 0 sollte mit dem Wert 0 µg/l in die Kurve aufgenommen werden.

**HINWEIS:** Eine 4-Parameter-Regression oder eine lineare Regression sollte nicht verwendet werden.

Zur manuellen Auswertung wird eine Eichkurve erstellt, indem die Extinktionswerte (E) für jeden SCC-Kalibrator gegen die entsprechende SCC-Konzentration (in µg/l) aufgetragen werden, siehe Abbildung weiter unten. Die unbekanntes SCC-Konzentrationen können dann unter Verwendung des Extinktionsmittelwertes jeder Patientenprobe von der Eichkurve abgelesen werden.

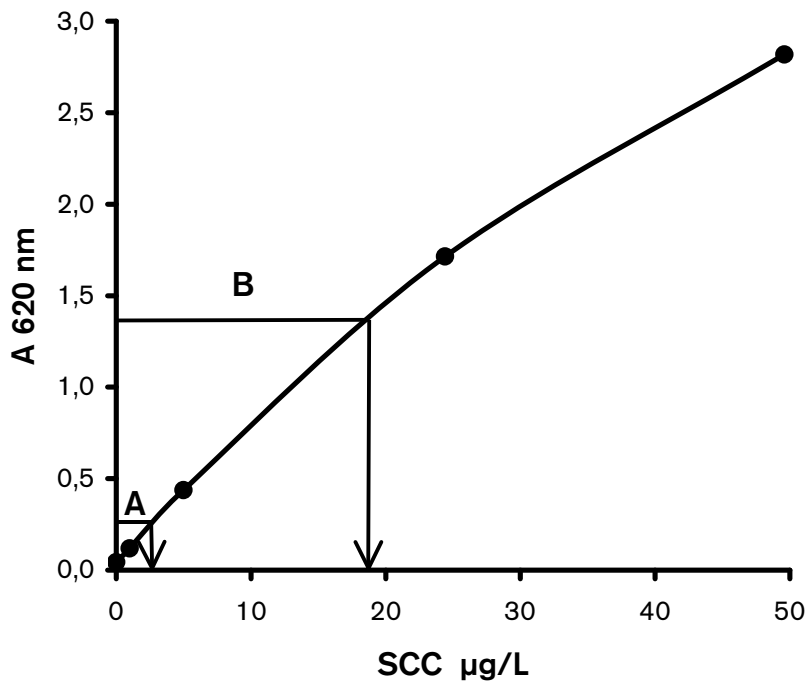
Wenn Proben in einer ersten Analyse SCC-Konzentrationen ergeben, die höher liegen als Kalibrator E (ca. 50 µg/l), sollten die Proben 1:10 mit normalem Humanserum verdünnt und erneut analysiert werden, um die korrekte SCC-Konzentration zu erhalten. **ACHTUNG:** Die zur Verdünnung verwendete Probe sollte ebenfalls analysiert werden, um die endogene SCC-Konzentration zu bestimmen.

Die SCC-Konzentration der unverdünnten Probe wird wie folgt berechnet:

Verdünnung 1:10: 
$$10 \times ([\text{SCC}]_{\text{Verdünnte Probe}} - (0,9 \times [\text{SCC}]_{\text{Normales Serum}}))$$

### Ergebnisbeispiele

Probe	Kalibrator- werte	Mittlerer Extinktionswert (E)	SCC µg/l
Calibrator A	0 µg/l	0.043	
Calibrator B	1 µg/l	0.119	
Calibrator C	5 µg/l	0.437	
Calibrator D	24 µg/l	1.715	
Calibrator E	50 µg/l	2.818	
Specimen A		0.245	2.6
Specimen B		1.363	18.3



Beispiel (diese Kurve und die obige Tabelle dürfen nicht zur Bestimmung der tatsächlichen Assay-Ergebnisse verwendet werden!).

## GRENZEN DES TESTS

SCC Antigen ist in normalem Plattenzellepithel vorhanden und erhöhtes SCC Antigen kann bei Hautveränderungen, in denen eine Hyperkeratinisierung beteiligt ist (z.B. Psoriasis und Ekzeme), auftreten. Erhöhte Mengen werden auch unter gutartigen Bedingungen wie einer Entzündung der Lunge und Leber oder bei Niereninsuffizienz gefunden (4, 9).

Der SCC-Wert kann nicht als absoluter Nachweis für das Vorhandensein oder Nichtvorhandensein einer malignen Krankheit genutzt werden und der SCC-Test sollte nicht in der Krebsvorsorge angewandt werden. Die Testergebnisse sollten nur in Verbindung mit anderen Untersuchungen und Verfahren zur Krankheitsdiagnose und zum Patientenmanagement interpretiert werden und der SCC-Test sollte keine der bewährten klinischen Untersuchungen ersetzen.

Das SCC Antigen ist in Haut, Schweiß und Speichel vorhanden und wird leicht durch Aerosole (z.B. durch Niesen) verteilt. Nach dem Öffnen der Packung und während der Testdurchführung sollten deshalb Handschuhe getragen werden, wenn mit den Reagenzröhrchen, der Mikrotiterplatte, den Pipettenspitzen etc. gearbeitet wird, um fälschlicherweise erhöhte Werte durch Kontamination zu vermeiden. Außerdem sollten alle erhöhten Werte durch eine Wiederholung des Tests bestätigt werden.

Gelegentlich können Anti-reagierende-Antikörper (humaner Anti-Maus-Antikörper (HAMA) oder heterophile Antikörper) in der Patientenprobe den Assay stören, obwohl spezifisches Blockierungsreagenz im Puffer enthalten ist.

## ERWARTUNGSWERTE

CanAg SCC wurde bei 175 gesunden Blutspendern bestimmt. Der untere und obere Extremwert des Normal-Bereichs wurde nach der vom IFCC empfohlenen parameterfreien Statistik untersucht. Das Referenzintervall beinhaltet die zentrale 95%-Fraktion der Referenzverteilung. Das Referenzintervall umfasst 95% der um den Mittelwert herum angeordneten Werte der Referenzverteilung, entsprechend liegen die Referenzgrenzen des (unteren) 2,5%-Fraktils und des (oberen) 97,5%-Fraktils. Diese Grenzwerte schließen auf jeder Seite der Referenzverteilung 2,5% der Werte aus. Parameterfreie Schätzungen:

	Mittelwert (µg/l)	Standard- abweichung (µg/l)	Median (µg/l)	Bereich (µg/l)	Obere Referenzgrenze (Zentrale 95%- Fraktion)
Gesunde Blutspender n=175	0,58	0,24	0,54	0,16 – 1,5	1,2 µg/l

Jedes Labor sollte einen eigenen Normbereich bestimmen, um dem jeweiligen Umfeld wie Ernährung, Klima, Lebensbedingungen, Auswahl des Patientenkollektivs, usw. Rechnung zu tragen. Ferner sollte bedacht werden, dass die eigenen Baseline-Ergebnisse des einzelnen Patienten den wichtigsten Bezugspunkt für die Interpretation der Ergebnisse bieten.

## LEISTUNGSMERKMALE

### Präzision

Die Gesamtpräzision wurde nach der NCCLS-Richtlinie EP5-A (10) unter Verwendung von gefrorenem gepooltem humanem Serum, das zusätzlich SCC in 4 verschiedenen Konzentrationen enthielt, und 18 verschiedenen "CanAg SCC EIA"-Reagenzienkombinationen berechnet. Jede Probe wurde nach dem Zufallsprinzip pipettiert (n=2/Analyse) und zwanzig Tage lang täglich zwei Mal analysiert.

Probe	Parallelprobe	Mittelwert (µg/l)	Standard- abweichung innerhalb des Laufs (µg/l)	CV innerhalb des Laufs (%)	Standard- abweichung innerhalb eines Tages (µg/l)	CV innerhalb eines Tages (%)
SCC 1	80	2.62	0.05	1.9	0.04	1.3
SCC 2	80	7.77	0.16	2.0	0.15	1.9
SCC 3	80	17.7	0.34	1.9	0.20	1.1
SCC 4	80	30.2	0.71	2.4	0.38	1.3

### Nachweisgrenze

Die Nachweisgrenze des CanAg SCC EIA liegt bei  $\leq 0,3 \mu\text{g/l}$  und ist definiert als die Konzentration, die dem Mittelwert der Extinktionswerte von SCC-Kalibrator A plus 2 Standardabweichungen laut folgender Formel entspricht:

$$\frac{2 \times \text{SD CAL A}}{\text{OD CAL B} - \text{OD CAL A}} \times [\text{CAL B}] \mu\text{g/l}$$

### Wiederfindungsrate

Markierte Serumproben wurden hergestellt, indem normalen Serumproben humanes SCC-Antigen zugegeben wurde. Die Wiederfindungsrate des zugesetzten Antigens lag zwischen 90 und 110 %.

### Hook-Effekt

Bei Proben bis zu 50 000 µg/l wurde kein Hook-Effekt festgestellt. **ACHTUNG:** In Proben mit sehr hoher Konzentration wechselt die Farbe des Substrats von blau zu grünlich (und bei extrem hohen Konzentrationen schließlich zu gelb). Dies führt zu einem falsch erniedrigten Extinktionswert bei 620 nm, und in extremen Fällen kann die Extinktion in den Bereich der Kalibrationskurve fallen und sich als Hook-Effekt bemerkbar machen.

### Linearität

Die Patientenproben wurden mit normalem Humanserum seriell verdünnt und analysiert. Die erhaltenen Werte lagen innerhalb 90 und 110 % der erwarteten Werte.

### Spezifität

Der CanAg SCC EIA basiert auf zwei monoklonalen Maus-Antikörpern, der Fänger-Antikörper MAb SCC140 und der Detektions-Antikörper MAb SCC 107 (11). Bei der Ermittlung möglicher Interferenzquellen wurde die NCCLS-Richtlinie EP7-P (12) befolgt. Folgende Substanzen und Konzentrationen wurden getestet und haben den Test nicht gestört.

	Konzentration ohne signifikante (± 10 %) Interferenz
Lipemia (Intralipid®)	10 mg/ml
Bilirubin, unkonjugiert	0.6 mg/ml
Hämoglobin	5 mg/ml

### Methodenvergleich

Der CanAg SCC EIA wurde mit dem Imx SCC MEIA verglichen.

Es wurden 72 humane Serumproben zwischen 0 und 4 µg/l bestimmt. Die lineare Regressionsanalyse der Ergebnisse ergab folgendes Resultat:

$$\text{CanAg SCC} = 1,02 \times \text{IMx SCC} + 0,03 \quad r = 0,86$$

Es wurden 138 humane Serumproben zwischen 0 und 50 µg/l bestimmt. Die lineare Regressionsanalyse der Ergebnisse ergab folgendes Resultat:

$$\text{CanAg SCC} = 0,82 \times \text{IMx SCC} + 0,06 \quad r = 0,98$$

## **GARANTIE**

Die hier vorgestellten Daten wurden unter Verwendung des angegebenen Assay-Verfahrens erzielt. Jede nicht vom Hersteller Fujirebio Diagnostics empfohlene Änderung oder Modifizierung des Verfahrens kann die Richtigkeit der Ergebnisse beeinflussen. Für diese Fälle lehnt Fujirebio Diagnostics jegliche Garantie (ob ausdrückliche, stillschweigende oder gesetzliche, einschließlich der stillschweigenden Garantie der marktgängigen Qualität und Gebrauchseignung) des Produktes ab.

## QUELLENVERZEICHNIS

1. Suminami Y., Kishi F., Sekiguchi K., Kato H. (1991) Squamous cell carcinoma antigen is a new member of the serine protease inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun* 181, 51-58.
2. Kato H. and Torigoe T. (1977) Radioimmunoassay for tumor antigen of human cervical squamous cell carcinoma. *Cancer* 40, 1621-1628.
3. Schneider S.S., Schick C., Fish K.E., Miller E., Pena J.C., Treter S.D., Hui S.M., Silverman G.A. (1995) A serine protease inhibitor locus at 18q21.3 contains a tandem duplication of the human squamous cell carcinoma antigen gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92, 3147-3151.
4. de Bruijn H.W.A., Duk J.M., van der Zee A.G.J., Pras E., Willemse P.H.B., Boonstra H., Hollema H., Mourits M.J.E., de Vries E.G.E., Aalders J.G. (1998) The Clinical Value of Squamous cell Carcinoma Antigen in Cancer of the Uterine Cervix. *Tumor Biol* 19, 505-516.
5. Vassiliakopoulos T., Troupis T., Sotiropoulou C., Zacharatos P., Katsaounou P., Parthenis D., Noussia O., Troupis G., Papiris S., Kittas C., Roussos C., Zakyntinos S., Gorgoulis V. (2001) Diagnostic and prognostic significance of squamous cell carcinoma antigen in non-small cell lung cancer *Lung Cancer* 32, 137-144.
6. Snyderman C.H., Dámico F., Wagner R., Eibling D.E. (1995) A Reappraisal of the Squamous Cell Carcinoma Antigen as a Tumor Marker in Head and Neck Cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 121, 1294-1297.
7. Duk J.M., Groenier K.H., de Bruijn H.W.A., Hollema H., ten Hoor K.A., van der Zee A.G.J., Aalders J.G. (1996) Pretreatment Serum Squamous cell Carcinoma Antigen: A Newly Identified Prognostic Factor in Early-Stage Cervical Carcinoma. *J Clin Oncol* 14, 111-118. 1997
8. Fleisher M. et al. (2002) Practice guidelines and recommendations for use of tumor markers in the clinic. *National Academy of Clinical Biochemistry* 15: p.19.
9. Yuyama N., et al., (2002) Analysis of novel disease-related genes in bronchial asthma. *Cytokine* 19(6), 287-296.
10. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices. Approved Guideline EP5-A (1999).
11. Röijer E., Nilsson K., Oskarsson M., Dahlén U., Andersson I., Nilsson O. (2003) Development of Monoclonal Antibodies and Immunoassays against different forms of Squamous Cell Carcinoma Antigens (SCCA). *Tumor Biol* 24, p. 83.
12. National Committee for Clinical Laboratory Standards, National Evaluation Protocols for Interference Testing, Evaluation protocol Number 7, Vol. 6, No 13, August (1986).



---

CanAg<sup>®</sup> ist ein eingetragenes Warenzeichen der 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