



# CanAg CA242 EIA

Prod. No. 101-10

Gebrauchsanweisung  
2009-06

Enzyme Immunoassay-Kit  
Für 96 Bestimmungen

## **VERWENDUNGSZWECK**

Der CanAg CA242 EIA Kit wird für die quantitative Bestimmung des tumorassoziierten Antigens C242 im Serum eingesetzt.

## **ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNG DES ASSAY**

Der Tumormarker CA242 wird durch den monoklonalen Antikörper C242 definiert. Die chemische Struktur der antigenen Determinante ist nicht genau bekannt, aber es konnte gezeigt werden, dass es sich um eine sialisierte Kohlehydratstruktur handelt. Im Serum findet man CA242 in gleichen Mucin-Komplexen wie CA50 und sialisiertes Lewis<sup>a</sup> (CA19-9). CA242 ist verwandt aber nicht identisch mit dem Eptope von CA19-9 (1, 2). Die Serumkonzentration von CA242 ist bei gesunden Personen und bei Personen mit benignen Krankheiten niedrig, während die Werte im Serum von Patienten mit gastro-intestinalen Karzinomen in der Regel erhöht sind (3). Der Marker CA242 kann bei der Diagnostik und dem Management von Patienten mit Verdacht auf oder bekannten gastro-intestinalen Karzinomen hilfreich sein (4-9). Der CanAg Ca242 EIA sollte nicht als Ersatz für etablierte klinische Untersuchungen von Malignitäten verwendet werden, sondern als ein Zusatz zu existierenden klinischen und Labormethoden.

## **PRINZIP DES TESTS**

Der CanAg CA242 EIA ist ein nicht-kompetitiver Festphasen-Immunoassay, der auf der direkten Sandwich-Technik basiert. Kalibratoren, Kontrollen und Patientenproben inkubieren gemeinsam mit einem biotinylierten monoklonalen Anti-CA242 Antikörper (MAb) C241 (von der Maus) in Streptavidin-beschichteten Mikrotiterstreifen. Während der Inkubation wird das in den Kalibratoren oder Proben vorhandene CA242 durch den biotinylierten Anti-CA242 MAb an die Streptavidin-beschichteten Mikrotiterstreifen adsorbiert. Die Streifen werden gewaschen und anschließend mit einem HRP-markierten

Anti-CA242 MAb C242 inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wird ein gepuffertes Substrat-Chromogen-Reagenz (Hydrogenperoxid und 3, 3', 5, 5' Tetra-methylbenzidin) in jede Vertiefung pipettiert. Falls Antigen vorhanden ist, entwickelt sich während dieser Enzymreaktion eine blaue Farbe. Die Intensität der Farbe ist proportional der vorhandenen CA242-Konzentration in der Probe.

Die Farbintensität wird mit einem Mikrotiter-Spektralphotometer bei 620 nm gemessen (oder optional nach Zugabe von Stopplösung bei 405 nm).

Für jeden Testansatz wird eine Kalibrationskurve erstellt, indem die Absorptionswerte gegen die Konzentration der Kalibratoren aufgetragen werden. Aus der Kalibrationskurve werden dann die CA242-Konzentrationen der Patientenproben abgelesen.

## REAGENZIEN

- Jeder CanAg CA242 EIA Kit enthält ausreichend Reagenzien für 96 Bestimmungen.
- Das Verfallsdatum des Kits steht außen auf der Verpackung.
- Keinen Kit nach Ablauf des Verfallsdatums verwenden.
- Keine Reagenzien von verschiedenen Kit-Lots verwenden.
- Kit bei 2–8°C lagern. Nicht einfrieren.
- Geöffnete Reagenzien sind stabil entsprechend der folgenden Tabelle. Vorausgesetzt sie sind nicht kontaminiert, werden in den wieder verschlossenen Originalbehältern gelagert und wie in der Anleitung beschrieben behandelt. Sofort nach Gebrauch wieder auf 2–8°C bringen.

Komponente	Menge	Aufbewahrung und Stabilität nach dem ersten Öffnen
<b>MICROPLA</b>		
<b>Streptavidin Mikroplatte</b> Platte	1 Platte	2–8°C, bis zum auf der angegebenen Verfallsdatum

12 x 8 Streptavidin-beschichtete Wells . Nicht benötigte Streifen müssen sofort nach dem Öffnen wieder in den Aluminiumbeutel mit Trocknungsmittel gegeben werden. Sorgfältig verschliessen, um die Streifen trocken zu halten.

Komponente	Menge	Aufbewahrung und Stabilität nach dem ersten Öffnen
------------	-------	--

**CA242 Kalibratoren** 5 Fläschchen 2–8°C, bis zum auf den Fläschchen angegeben Verfallsdatum

CAL	CA242	0
-----	-------	---

1 x 0.75 mL

CAL	CA242	15
-----	-------	----

1 x 0.75 mL

CAL	CA242	50
-----	-------	----

1 x 0.75 mL

CAL	CA242	100
-----	-------	-----

1 x 0.75 mL

CAL	CA242	150
-----	-------	-----

1 x 0.75 mL

Das CA242 Antigen in Tris-HCl-Puffer, enthält Rinderserumalbumin, Detergenz, einen inerten gelben Farbstoff, und 0,05% Natriumazid als Konservierungsmittel. Gebrauchsfertig.

**CA242 Kontrollen** 2–8°C, bis zum auf dem Fläschchen angegeben Verfallsdatum

CONTROL	CA242	1
---------	-------	---

1 x 0.75 mL

CONTROL	CA242	2
---------	-------	---

1 x 0.75 mL

Das CA242 Antigen in Tris-HCl-Puffer, enthält Rinderserumalbumin, Detergenz, und 0,05% Natriumazid als Konservierungsmittel. Gebrauchsfertig.

BIOTIN	Anti-CA242
--------	------------

**Biotin Anti-CA242** 1 x 15 mL 2–8°C, bis zum auf dem Fläschchen angegeben Verfallsdatum

Biotin Anti-CA242 monoklonaler Maus-Antikörper, etwa 1,5 µg/mL. Enthält Tris-HCl-Puffer (pH 7.75), Rinderserumalbumin, Blockierungsmittel, Detergenz, einen inerten roten Farbstoff, und 0,05% Natriumazid als Konservierungsmittel. Gebrauchsfertig.

Komponente	Menge	Aufbewahrung und Stabilität nach dem ersten Öffnen
------------	-------	---

**CONJ** | **Anti-CA242**

**Tracer, HRP Anti-CA242** 1 x 0.75 mL 2–8°C, bis zum auf dem  
Fläschchen angegeben  
Verfallsdatum

Stammlösung mit monoklonalem Maus-Antikörper HRP Anti-CA242, etwa 40 µg/mL. Enthält Konservierungsmitteln. Vor Gebrauch mit Tracer-Diluent verdünnen.

**DIL** | **CONJ**

**Tracer Diluent** 1 x 15 mL 2–8°C, bis zum auf dem  
Fläschchen angegeben  
Verfallsdatum

Phosphatgepufferte Salzlösung (pH 7.2) mit Rinderserumalbumin, Blockierungsmittel, Detergenz, einen inerten blauen Farbstoff und 0,01% Methyl-Isothiazlon (MIT) als Konservierungsmittel. Gebrauchsfertig.

**SUBS** | **TMB**

**TMB HRP-Substrat** 1 x 12 mL 2–8°C, bis zum auf dem  
Fläschchen angegeben  
Verfallsdatum

Enthält gepuffertes Hydrogenperoxid und 3, 3', 5, 5' Tetra-methylbenzidin (TMB). Gebrauchsfertig.

**STOP**

**Stopplösung** 1 x 15 mL 2–8°C, bis zum auf dem  
Fläschchen angegeben  
Verfallsdatum

Enthält 0,12 M HCl. Gebrauchsfertig.

**WASHBUF** | **25X**

**Waschkonzentrat** 1 x 50 mL 2–8°C, bis zum auf dem  
Fläschchen angegeben  
Verfallsdatum

Ein Tris-HCl Puffer mit Tween 20. Enthält Germall II als Konservierungsmittel. Vor Gebrauch 1:25 mit Wasser verdünnen.

## **Anzeichen für Instabilität**

Das TMB-HRP-Substrat muß farblos oder nur leicht bläulich gefärbt sein. Eine blaue Farbe zeigt an, dass das Reagenz kontaminiert ist und verworfen werden muß.

## **WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN**

Nur für In-vitro Diagnostik

- Nur für den professionellen Gebrauch
- Bitte beachten Sie die lokalen und nationalen Vorschriften und Richtlinien um die Sicherheit im Labor zu gewährleisten.
- Behandeln Sie Patientenproben als potentiell infektiös.
- Reagenzien enthalten Natriumazid ( $\text{NaN}_3$ ) als Konservierungsmittel. Natriumazid kann mit Blei- und Kupferleitungen reagieren und hochexplosive Metallazide bilden. Spülen Sie bei der Entsorgung reichlich mit Wasser, um die Entstehung von Aziden zu vermeiden.
- Befolgen Sie die lokalen Richtlinien für die Entsorgung sämtlicher Abfälle.

### **Achtung**

Das menschliche Materialien wurde auf Antikörper gegen Hepatitis B Virusantigene, Hepatitis C Virusantigene und Human-Immunschwäche-Virus (HIV1+2) negativ befindet. Trotzdem sollten die gebotenen Vorsichtsmaßnahmen für potentiell infektiöse Materialien eingehalten werden.

## **PROBENENTNAHME UND HANDHABUNG**

Im CanAg CA242 EIA wird Serum eingesetzt. Trennen Sie nach venöser Blutentnahme das Serum ab. Proben können für 24 Stunden bei 2-8°C gelagert werden. Zur längeren Aufbewahrung müssen die Proben aliquotiert und bei -20°C tiefgefroren werden. Die Proben sollten nicht in einem Gefrierschrank mit Abtauautomatik gelagert werden. Wiederholtes Auftauen und Einfrieren muss vermieden werden. Tiefgefrorene Proben sollten langsam über Nacht bei 2-8°C aufgetaut und vor dem Testansatz auf Raumtemperatur gebracht werden.

## **VERFAHREN**

### **Materialien, die benötigt werden, aber im Kit nicht enthalten sind**

#### **1. Mikroplatten-Schüttler**

Das Schütteln sollte mittelmäßig bis kräftig erfolgen. Bei Horizontalschüttlern etwa 200 Bewegungen/min, bei Oszillationsschüttlern 700–900/min.

#### **2. Waschautomat für Mikroplatten**

Automatisches Plattenwaschgerät mit 1, 3 und 6 Waschzyklen und Mindestfüllvolumen von 350 µl/Kavität/Waschzyklus.

Das manuelle Waschgerät Nunc Immuno-8 wird empfohlen, sollte ein automatisches Waschgerät für Mikroplatten nicht vorhanden sein.

### 3. Mikroplatten-Spektrophotometer

Mit der Wellenlänge 620 nm und/oder 405 nm, und einem Absorptionsbereich von 0 bis 3,0.

### 4. Präzisionspipetten

Mit verworfbaren Plastikspitzen um  $\mu\text{L}$ -Volumina zu pipettieren. Eine 8-Kanal-Pipette oder Multipette mit verworfbaren Plastikspitzen für 100  $\mu\text{L}$  ist nützlich aber nicht notwendig. Milliliter-Pipetten.

### 5. Destilliertes oder deionisiertes Wasser

Für die Herstellung der Waschlösung.

## Hinweise zum Verfahren

1. Um die korrekte Durchführung des CanAg CA242 EIA Kits zu gewährleisten ist das vollständige Verständnis dieser Packungsbeilage notwendig. Die Reagenzien dieses Kits sind nur innerhalb dieses Kits zu verwenden. Komponenten aus Kits mit unterschiedlichen Lotnummern dürfen nicht zusammen verwendet werden. Nach Ablauf des Verfallsdatums (außen auf der Verpackung) dürfen die Kit-Reagenzien nicht mehr verwendet werden.
2. Vor Gebrauch müssen die Reagenzien auf Raumtemperatur (20–28°C) gebracht werden. Um gute Ergebnisse zu erzielen sollte der Test nur bei Temperaturen zwischen 20-28°C durchgeführt werden. Aufgetaute Proben müssen sorgfältig und ohne Schaumbildung gemischt werden.
3. Zur eindeutigen Identifizierung der Proben während und nach der Testdurchführung sollten die Mikrotiterstreifen vor Beginn entsprechend beschriftet werden.
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  $\mu\text{l}$  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 kann sehr leicht kontaminiert werden. Für eine optimale Stabilität des TMB HRP-Substrates füllen Sie nur die benötigte Menge in ein sorgfältig gereinigtes Gefäß oder

wenn möglich in ein Einmal-Gefäß, um eine Kontamination des Reagenz zu vermeiden.

Verwenden Sie nur saubere Einmal-Pipettenspitzen (oder Combitips).

6. Verwenden Sie nur saubere Einmal-Pipettenspitzen und pipettieren Sie Proben und Reagenzien sorgfältig. Vermeiden Sie Verschleppungen indem Sie die Pipette knapp über der Oberfläche des Wells halten und berühren Sie nicht die Mikrotiterstreifen oder die Flüssigkeitsoberfläche. Eine saubere Pipettiertechnik ist besonders wichtig im Umgang mit der TMB HRP-Substratlösung.

Zubereitung der Reagenzien	Stabilität des zubereiteten Reagens
<b>Waschlösung</b>	2 Wochen bei 2–25°C in einem verschlossenen Behälter
Geben Sie 50 mL Waschkonzentrat in ein sauberes Gefäß und verdünnen Sie es 25fach durch Zugabe von 1200 mL destilliertem oder deionisiertem Wasser. Sie erhalten so eine gepufferte Waschlösung.	
<b>Tracer-Arbeitslösung</b>	3 Wochen bei 2–8°C in einem verschlossenen Behälter

Stellen sie die benötigte Menge an Tracer-Arbeitslösung her. Mischen Sie dafür pro Streifen 50 µL Tracer, HRP Anti-CA242 mit 1 mL Tracer Diluent (s. Tabelle):

Anzahl der Streifen	Tracer, HRP Anti-CA242 (µL)	Tracer Diluent (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

Verwenden Sie saubere Plastik- oder Glasgefäße für die Herstellung der Tracer-Arbeitslösung.

**Alternativ:** Füllen Sie den Inhalt des Tracer-Fläschchens (HRP Anti-CA242) in das Fläschchen des Tracer-Diluents und mischen Sie sorgfältig. Der gesamte Inhalt des Tracer-Fläschchens muß in das Diluent-Fläschchen überführt werden!

**HINWEIS:** Die Tracer-Arbeitslösung ist bei 2-8°C für 3 Wochen stabil. Setzen Sie nicht mehr Arbeitslösung an, als Sie in diesem Zeitraum benötigen und sorgen Sie für die richtige Lagerung.

## Assay-Verfahren

Alle Kalibratoren und Patientenproben in Doppelbestimmung ansetzen. Für jeden Testansatz sollte eine Kalibrationskurve erstellt werden. Alle Reagenzien und Proben müssen auf Raumtemperatur (20-25°C) gebracht werden.

1. Waschlösung und Tracer-Arbeitslösung herstellen. Nur saubere Gefäße verwenden und die Anweisungen sorgfältig befolgen.
2. Benötigte Anzahl der Mikrotiterstreifen in den Rahmen einsetzen. (Nicht benötigte Streifen sofort wieder im Aluminiumbeutel mit Trocknungsmittel verschließen) Jeden Streifen einmal mit Waschlösung waschen. Nicht mehr Streifen waschen, als innerhalb von 30 Minuten abgearbeitet werden können.
3. Je 25 µL CA242 Kalibrator (CAL 0, 15, 50, 100, 150), CA242 Kontrollen (C1, C2) und Patientenproben (Unbekannte-Unk) in die Vertiefungen pipettieren (entsprechend dem folgenden Schema):

	1	2	3	4	5	6	7 etc
A	Cal 0	Cal 150	2nd Inc				
B	Cal 0	Cal 150	2nd Inc				
C	Cal 15	C1	Etc.				
D	Cal 15	C1					
E	Cal 50	C2					
F	Cal 50	C2					
G	Cal 100	1st Inc					
H	Cal 100	1st Inc					

4. 100 µL Biotin Anti-CA242 in jedes Well pipettieren mit einer 100 µL Präzisionspipette (oder 8-Kanal 100 µL Präzisionspipette). Verschleppung vermeiden indem die Pipette knapp über der Oberfläche des Wells gehalten wird. Mikrotiterstreifen oder die Flüssigkeitsoberfläche nicht mit der Pipettenspitze berühren.
5. Inkubieren für 2 Std. ( $\pm 10$  min) bei Raumtemperatur (20-28°C) und gleichmäßigem Schütteln. Mikroplatten-Schüttler verwenden.
6. Nach der ersten Inkubation werden die Streifen abgesaugt und 3mal gewaschen entsprechend der Waschanweisung unter "Anmerkungen zur Testdurchführung" Punkt 4.
7. 100 µL Tracer-Arbeitslösung in jedes Well pipettieren. Gleiche Pipettiersequenz verwenden wie bei Schritt 4.
8. Inkubieren für 1 Std. ( $\pm 5$  min) bei Raumtemperatur (20-28°C) und gleichmäßigem Schütteln.

9. Nach der zweiten Inkubation Streifen absaugen und 6mal waschen entsprechend der Waschanweisung unter "Anmerkungen zur Testdurchführung" Punkt 4.
10. 100 µL TMB HRP-Substrat in jedes Well pipettieren. Gleiche Pipettiersequenz verwenden wie bei Schritt 4. Das TMB HRP-Substrat sollte so schnell wie möglich in jede Vertiefung pipettiert werden. Das Pipettieren vom ersten bis zum letzten Well sollte 5 Min. nicht überschreiten.
11. Inkubieren für 30 min ( $\pm$  5 min) bei Raumtemperatur und gleichmäßigem Schütteln. Nicht direktem Sonnenlicht aussetzen.
12. Sofort mit einem Mikroplatten-Spektrophotometer die Absorption bei 620 nm ablesen.

### **Option**

Solte im Labor kein Mikroplatten-Spektrophotometer mit 620 nm-Filter vorhanden sein, kann die Absorption, wie in Schritt 13 beschrieben, bestimmt werden:

12. 100 µL Stopplösung pipettieren, mischen und die Absorption innerhalb von 15 Min. nach Zugabe der Stopplösung bei 405 nm messen.

### **Messbereich**

Der CanAg CA242 EIA mißt Konzentrationen zwischen 1 und 150 U/mL.

Wenn mit CA242-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 CA242-Konzentration bestimmen zu können (vgl. "Berechnung der Ergebnisse").

### **Qualitätskontrolle**

Zur Validierung jeder Testserie sollten die CA242 Kontrollen 1 und 2 verwendet werden. Der zu erwartende Kontrollbereich ist auf dem Etikett der Kontrollfläschchen vermerkt. Liegen die Werte außerhalb der spezifizierten Bereiche müssen alle Reagenzien und die Genauigkeit des Mikroplatten-Lesers überprüft werden. Der Test muss wiederholt werden. Jedes Labor kann auch eigene Serumpools mit verschiedenen Bereichen herstellen und als interne Kontrolle verwenden. Damit kann die Präzision des Testansatzes überprüft werden.

### **Referenzmaterial**

Da kein allgemeines Referenzmaterial für das CA242-Antigen vorhanden ist, wurden die CanAg CA242 EIA Kalibratoren hergestellt im Vergleich mit einem "In-house"-Referenzstandard-Set.

## BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

Falls ein Mikroplatten-Leser mit integrierter Datenkalkulation verwendet wird, beachten Sie das Handbuch des Gerätes und erstellen Sie ein Proramm mit den aktuellen Konzentrationen, die auf jedem CA242-Kalibratorfläschchen aufgedruckt sind.

Für die automatische Kalkulation der CA242 Ergebnisse wird empfohlen eine der folgenden Methoden zu verwenden:

- Kubische Splinefunktion. Kalibrator 0 sollte mit dem Wert 0 U/mL in die Kurve eingesetzt werden.
- Geglättete Splinefunktion. Kalibrator 0 sollte als Blank verwendet werden.
- Interpolation mit "Punkt zu Punkt Auswertung": Kalibrator 0 sollte mit dem Wert 0 U/mL in die Kurve eingesetzt werden.
- Quadratische Interpolation. Kalibrator 0 sollte mit dem Wert 0 U/mL in die Kurve eingesetzt werden.

**Hinweis:** 4-Parameter-Logistik oder lineare Regressions sollten nicht angewendet werden.

Zur manuellen Berechnung wird eine Kalibrationskurve erstellt. Die Absorptionwerte (A) für jeden CA242-Kalibrator werden gegen die entsprechende CA242-Konzentration (in U/mL) aufgetragen, (s. folgende Abbildung). Zum Ablesen der unbekannt CA242-Konzentration aus der Kalibrationskurve wird der Mittelwert der Absorptionwerte jeder Patientenprobe eingesetzt.

Ergibt die erste Probenanalyse CA242-Werte größer 150 U/mL, Sollten die Proben 1:10 mit normalem Humanserum verdünnt und erneut analysiert werden, um die korrekte CA242-Konzentration zu erhalten.

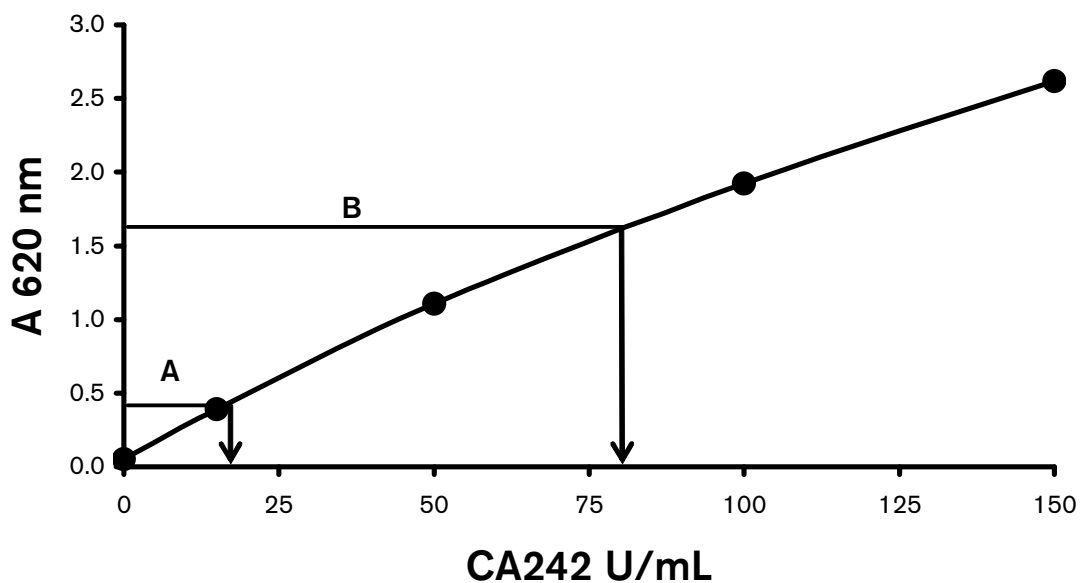
**ACHTUNG:** Die zur Verdünnung verwendete Probe sollte ebenfalls analysiert werden, um die endogene CA242-Konzentration zu bestimmen.

Die CA242-Konzentration der unverdünnten Probe wird wie folgt berechnet:

Verdünnung 1:10:  $10 \times ([\text{CA242}]_{\text{Verdünnte Probe}} - 0,9 \times [\text{CA242}]_{\text{Normales Serum}})$

## Ergebnisbeispiele

Probe	Kalibrator- konzentration	Absorptions- mittelwert (A)	CA242 (U/mL)
CAL CA242 0	0 U/mL	0.050	
CAL CA242 15	15 U/mL	0.390	
CAL CA242 50	50 U/mL	1.107	
CAL CA242 100	100 U/mL	1.922	
CAL CA242 150	150 U/mL	2.617	
Specimen A		0.410	16.1
Specimen B		1.636	80.9



*Diese Kurve dient nur als Beispiel - nicht zur Bestimmung der Assay-Ergebnisse verwenden.*

## GRENZEN DES VERFAHRENS

Aus der CA242 Konzentration ergibt sich keine eindeutige Aussage über das Vorhandensein eines Tumors. Der CA242 Test sollte nicht für ein Cancer-Screening eingesetzt werden. Die Testergebnisse sollten nur in Zusammenhang mit den Ergebnissen anderer diagnostischer Methoden interpretiert werden.

Der CA242-Test sollte etablierte klinische Untersuchungen nicht ersetzen.

Humane Anti-Maus-Antikörper (HAMA) oder heterophile Antikörper in der Patientenprobe können möglicherweise mit diesem Test interferieren, obwohl ein spezifisches Blockierungsmittel in den Pufferlösungen enthalten ist.

## ZU ERWARTENDE WERTE

Proben von 184 gesunden Blutspendern (97 Frauen und 87 Männer) wurden mit dem CanAg CA242 EIA gemessen. Der Mittelwert lag bei  $8,5 \pm 7,6$  U/mL. Für die Ermittlung der unteren und oberen Grenze des Normalbereichs wurde die vom IFCC empfohlene Methode verwendet (non-parametric statistical treatment). Das Referenzintervall beinhaltet die zentrale 95% Fraktion der Referenzverteilung. Referenzgrenzen können entsprechend bestimmt werden als die 2,5% (untere) und 97,5% (obere) Fraktile. Diese Grenzen schließen 2,5% der Werte von jedem Ende der Referenzverteilung aus. Nicht-parametrische Schätzwerte:

Fraktion	Referenzgrenze (U/mL)	95% confidence
2,5% (untere)	0	0-0
97,5% (obere)	29	25-44

93% aller gesunden Blutspendern hatten Ergebnisse unterhalb von **20 U/mL**.

Es wird empfohlen, dass jedes Labor seinen eigenen Normbereich ermittelt, um regionale Faktoren, wie Diäten, Klima, Lebensbedingungen, Patientenkollektiv, usw., zu berücksichtigen.

Es sollte ebenfalls bedacht werden, dass der individuelle Ausgangswert jedes einzelnen Patienten die wichtigste Referenz bei der Interpretation von Tumormarker-Ergebnissen darstellt (9).

## LEISTUNGSEIGENSCHAFTEN

### Präzision

Die totale Präzision wurde entsprechend den NCCLS-Richtlinien EP5-A (10) ermittelt. Es wurden 4 Level tiefgefrorener humaner Poolseren verwendet, denen Aszitespools zugesetzt wurden. Jede Probe wurde zufällig pipettiert ( $n=2$ /Analyse) und über 20 Tage zweimal pro Tag analysiert. Die Analyse wurde über einen Zeitraum von 42 Monaten, mit mindestens 2 verschiedenen Assistenten und mit 20 verschiedenen CanAg CA242 EIA Kitlots durchgeführt.

Probe	Replikate	Mittelwert U/mL	Inter-assay SD (U/mL)	Inter-assay CV %	Intra-assay SD (U/mL)	Intra-assay CV %
CA242 1	80	16.2	0.67	4.1	0.39	2.4
CA242 2	80	48.4	1.93	4.0	1.82	3.8
CA242 3	80	79.5	2.99	3.8	2.46	3.1
CA242 4	80	125	5.81	4.7	2.74	2.2

### Nachweisgrenze

Die Nachweisgrenze des CanAg CA242 EIA Tests ist < 1 U/mL, definiert als die Konzentration entsprechend dem Absorptionsmittelwert des CA242 Kalibrator 0 plus 2 Standardabweichungen, gemäß der folgenden Formel:

$$\frac{2 \times \text{SD CAL 0}}{\text{OD CAL 15} - \text{OD CAL 0}} \times 15 \text{ U/mL}$$

### Wiederfindung

Normalen Serumproben wurde humanes CA242-Antigen hinzugefügt. Die Wiederfindung des Antigens lag bei 87–107%. **HINWEIS:** Wiederfindungsstudien sollten **nicht** unter Verwendung der Kalibratoren des CanAg CA242 EIA-Kits durchgeführt werden.

### Hook Effekt

Bei Proben bis zu einer Konzentration von 150 000 U/mL wurde kein Hook Effekt festgestellt. **ACHTUNG:** Bei Proben mit sehr hohen Konzentrationen verändert sich die Farbe des Substrates von blau nach grünlich (und eventuell gelb bei extrem hohen Proben). Dies führt zu einer falsch-niedrigen Absorption bei 620 nm. In extremen Fällen kann die Absorption innerhalb der Kalibrationskurve liegen und als Hook Effekt registriert werden.

### Linearität

Die Patientenproben wurden mit normalem Humanserum seriell verdünnt und analysiert. Die erhaltenen Werte lagen zwischen 97-108 %.

### Spezifität

Der CanAg CA242 EIA arbeitet mit zwei monoklonalen Antikörpern aus der Maus. Der Fängerantikörper C241 erkennt das sialisierte Lewis<sup>a</sup> während der Nachweisantikörper C242 spezifisch für das CA242 Epitope ist. Daher detektiert der Test S-Le<sup>a</sup> enthaltende Mucinantige, die das CA242 Antigen exprimieren. Um mögliche Interferenzen zu bestimmen, wurde die NCCLS Richtlinie EP7-P (11) befolgt. Die folgenden Substanzen und Konzentrationen wurden getestet und keine Interferenzen mit dem Test festgestellt.

---

	<b>Konzentration ohne signifikante (± 10 %) Interferenz</b>
Lipemia (Intralipid <sup>®</sup> )	8 mg/mL
Bilirubin, unkonjugiert	0,6 mg/mL
Hämoglobin	5 mg/mL

### **Methodenvergleich**

Der CanAg CA242 EIA wurde mit dem CA242 Delfia verglichen. Es wurden 145 humane Serumproben von Patienten mit malignem Krankheit und von gesunden Blutspendern bestimmt, deren Werte von 0-250 U/mL reichten. Die lineare Regressionsanalyse der Ergebnisse ergab folgendes Resultat:

$$\text{CanAg CA242} = 1,02 \times \text{CA242 Delphia} - 1,1 \quad r = 0,99$$

### **GEWÄHRLEISTUNG**

Zur Ermittlung der oben präsentierten Testcharakteristika wurde der Test entsprechend der hier vorliegenden Arbeitsanleitung durchgeführt. Jede Änderung oder Modifikation der Prozedur, die nicht durch Fujirebio Diagnostics freigegeben wurde, kann die Ergebnisse beeinflussen. In diesem Fall lehnt Fujirebio Diagnostics alle angegebenen oder gesetzlichen Ansprüche und Gewährleistungen ab einschliesslich der gesetzlichen Mängelgewährleistung und Gebrauchstauglichkeit.

## LITERATURHINWEISE

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



---

CanAg® ist ein eingetragenes Warenzeichen der Fujirebio Diagnostics AB

Fujirebio Diagnostics AB  
Elof Lindälvs gata 13  
PO BOX 121 32  
SE-402 42 Göteborg  
Sweden  
Phone + 46 31-85 70 30  
Fax + 46 31-85 70 40  
info@fdab.com  
www.fdab.com