

Summary

Muller Kobold AC, Boonstra JG, Bonfrère JMG. Squamous Cell Carcinoma Antigen, clinical application and analysis. *Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk* 2010; 35: 19-24.

The squamous-cell cancer antigen (SCC Ag) is expressed by squamous cells of skin, lung, digestive tract and uterine cervix. Its expression increases with increasing malignant transformation. Increased concentrations of SCC Ag can therefore be found in patients with squamous cell cancers. Although several publications describe the use of this tumormarker in squamous-cell cancers, like carcinoma of head- and neck, lung carcinoma, bladder carcinoma or rectal carcinoma, SCC Ag measurements are mainly used in follow up and/or prognosis of patients with cervix carcinoma.

The SCC Ag belongs to the family of serine-protease inhibitors (Serpins) and is known to have two isoforms: SCCA1 and SCCA2. Current assays used for routine analysis of SCC Ag all detect both isoforms. Little is known about the sensitivity for both isoforms in current routine assays. In this paper we discuss assay characteristics and clinical application of the assays currently available for SCC Ag. Furthermore, preanalytical aspects and the results of a Dutch external quality-assurance initiative are discussed.

Keywords: SCC; cervixcarcinoma; squamous cell cancer; immunoassay

Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk 2010; 35: 24-27

Bepaling van 'squamous-cell carcinoma antigen' (SCC) op de Kryptor Compact

G.W.A. LANSBERGEN¹, S.M.A. SMIT de WOLF¹, C.M. KORSE², J.M.G. BONFRÈRE² en J.G. BOONSTRA¹

'Squamous-cell carcinoma antigen' (SCC) is een tumormarker voor plaveiselcelcarcinomen van o.a. de cervix, longen, hoofd-halsgebied, oesofagus en anus. De concentratie SCC in serum kan in immunoassays worden bepaald middels fotometrie, luminescentie en fluorescentiedetectiemethoden. In het Erasmus MC en Antoni van Leeuwenhoek Ziekenhuis werd tot voor kort de IMx (Abbott) gebruikt voor het bepalen van SCC en is nu een overstap gemaakt naar de Kryptor Compact (BRAHMS). Zowel de IMx als de Kryptor Compact werken met een fluorescentiedetectiemethode.

Dit artikel beschrijft de evaluatie van de SCC-bepaling op de Kryptor Compact, waarbij de reproduceerbaarheid (precisie) en lineariteit zijn geëvalueerd op basis van het NCCLS-EP-10-, -EP-15- en -EP-6-protocol. De intrarunvariatiëcoëfficiënt van een pool van 0,9 ng/ml SCC bedroeg 5,9%, van 14,2 ng/ml SCC 1,9% en van 29,5 ng/ml SCC 1,1%. De interrunvariatiëcoëfficiënt van 0,9 ng/ml SCC was 6,1%, van 14,2 ng/ml SCC 1,9% en van 29,5 ng/ml SCC 1,8%. Middels een correlatiestudie volgens NCCLS-EP-9 zijn de SCC-concentraties van 302 patiëntenmonsters vergeleken zoals bepaald op de IMx en de Kryptor Compact systemen. Er werden geen significante verschillen geconstateerd tussen de gemeten patiëntenuitslagen op beide apparaten.

Uit de verkregen resultaten met patiëntenmateriaal kan worden geconcludeerd dat de SCC-immunoassay op de Kryptor Compact goed vergelijkbaar is met de IMx. In combinatie met een betere precisie is de Kryptor Compact een goede keuze voor het bepalen van de tumormarker SCC in een klinisch-chemisch laboratorium.

Trefwoorden: Squamous-cell carcinoma; SCC; evaluatie, Kryptor Compact; IMx

'Squamous-cell carcinoma antigen' (SCC) is een tumormarker voor plaveiselcelcarcinomen van o.a. de cervix (baarmoederhalskanker), longen, hoofd-halsgebied, oesofagus en anus (1-3). Inmiddels lijkt SCC volgens recente literatuur ook een plaats te hebben gekregen in de diagnostiek van hepatocellulaire carcinomen (4-6). Hoewel SCC in het algemeen niet bruikbaar is voor het stellen van een diagnose vanwege te lage sensitiviteit en specificiteit, is het wel bruikbaar voor het vervolgen van het ziekteproces. De SCC-concentratie is gecorreleerd met tumorgrootte, tumorstadium, achtergebleven tumorresten na behandeling en het hernieuwd uitgroeien daarvan.

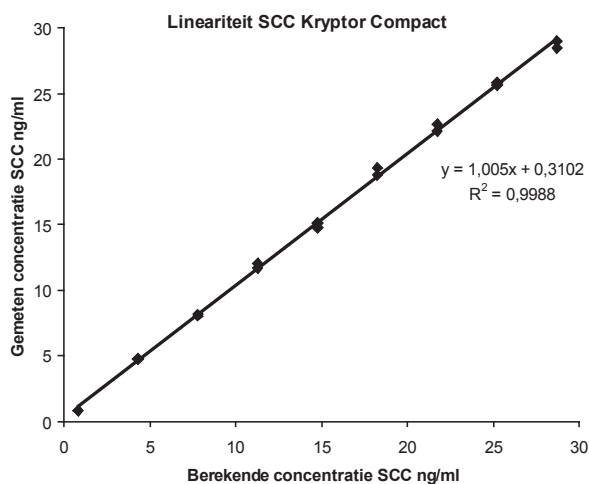
Veel laboratoria die SCC bepalen gebruik(t)en de assays van Abbott op het IMx- of Architect-platform (Abbott Laboratories; Abbott Park, Illinois, U.S.A.). Het IMx-systeem is inmiddels verouderd en wordt door diverse laboratoria vervangen voor nieuwere systemen. Een aantal klinisch-chemische laboratoria waaronder die van het Erasmus MC en het Antoni van Leeuwenhoek Ziekenhuis, is overgestapt naar de SCC-assay op de Kryptor Compact van de firma BRAHMS (BRAHMS AG; Hennigsdorf, Germany). Dit manuscript beschrijft de evaluatie van de SCC-tumormarker op de Kryptor Compact in vergelijking met de IMx.

Afdeling Klinische Chemie - Erasmus MC Rotterdam¹, Algemeen Klinisch Laboratorium - Antoni van Leeuwenhoek Ziekenhuis Amsterdam²

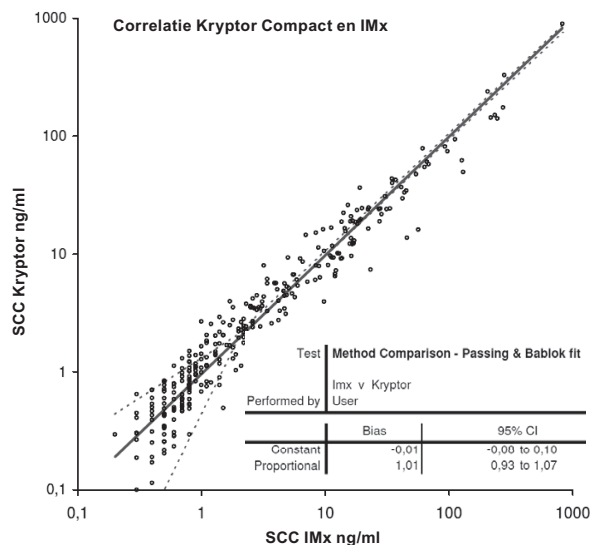
Correspondentie: dr. J.G. Boonstra, Afdeling Klinische Chemie, Erasmus MC-Daniel den Hoed, Postbus 5201, 3008 AE Rotterdam
E-mail: j.boonstra@erasmusmc.nl

Methode

De SCC-bepalingen zijn verricht op de Kryptor Compact (BRAHMS) middels een TRACE ('Time Resolved Amplified Cryptate Emission')-immunoassay en op de IMx (Abbott) middels een micropartikel-enzymimmunoassay (MEIA). Beide assays herkennen zowel SCCA1- als SCCA2-isovormen (7, 8). In het reagens van de TRACE-immunoassay bevinden zich monoklonale muis-anti-SCC-antistoffen welke geconjugeerd zijn met europiumcryptaat. Het tweede reagens bevat monoklonale muis-anti-SCC-antistoffen die geconjugeerd zijn met XL665 (een lichtabsorberend algeneiwit). De TRACE-techniek is gebaseerd op niet-radiatieve energieoverdracht van een donor (cryptaat) naar een ontvanger (XL665), wat slechts kan plaatsvinden wanneer beide dicht genoeg bij elkaar zitten in een immuuncomplex. Met laserlicht van 337 nm wordt cryptaat aangestraald, waarna bij energieoverdracht naar XL665 er een emissie plaatsvindt van 620 nm. Deze TRACE-techniek is gebaseerd op het onderzoekswerk van de Franse scheikundige Jean-Marie Lehn, aan wie de Nobelprijs voor scheikunde werd uitgereikt in 1987.



Figuur 1. Lineariteit van een verdunningsreeks op basis van het NCCLS-EP-6 protocol.



Figuur 2. Correlatie tussen de Kryptor Compact en de IMx voor 289 meetbare patiëntensera volgens het NCCLS-EP-9-protocol m.b.v. de methode van Passing en Bablok, in logaritmische schaalverdeling.

Met de MEIA-techniek van Abbott wordt gebruik gemaakt van anti-SCC-antistoffen gebonden aan micropartikels. Na het vormen van een immuuncomplex met het SCC-antigeen worden de micropartikels irreversibel gebonden aan een glasvezelmatrix en gewassen. Een secundair anti-SCC-antigeen, gekoppeld aan een alkalischefosfataseconjugaat, wordt gebonden aan de matrix. Na een volgende wasprocedure wordt het substraat, 4-methylbelliferylfosfaat, toegevoegd en wordt de intensiteit van het fluorescerende licht gemeten met behulp van de fluorescentiemeter.

De bepaling van de precisie is uitgevoerd middels het NCCLS-EP-10- en -EP-15-protocol met metingen van drie poolsera met laag, midden en hoge concentraties SCC (0,9 ng/ml, 14,2 ng/ml en 29,5 ng/ml), en twee controles van de firma BRAHMS. Met behulp van de lage en hoge concentraties is de lineariteit van de assay getest op basis van het NCCLS-EP-6-protocol. Daarbij zijn twee poolsamples met de lage en de hoge concentratie tegelijk met gelijkmatig verdeelde tussenliggende mengverhoudingen van beide monsters gemeten.

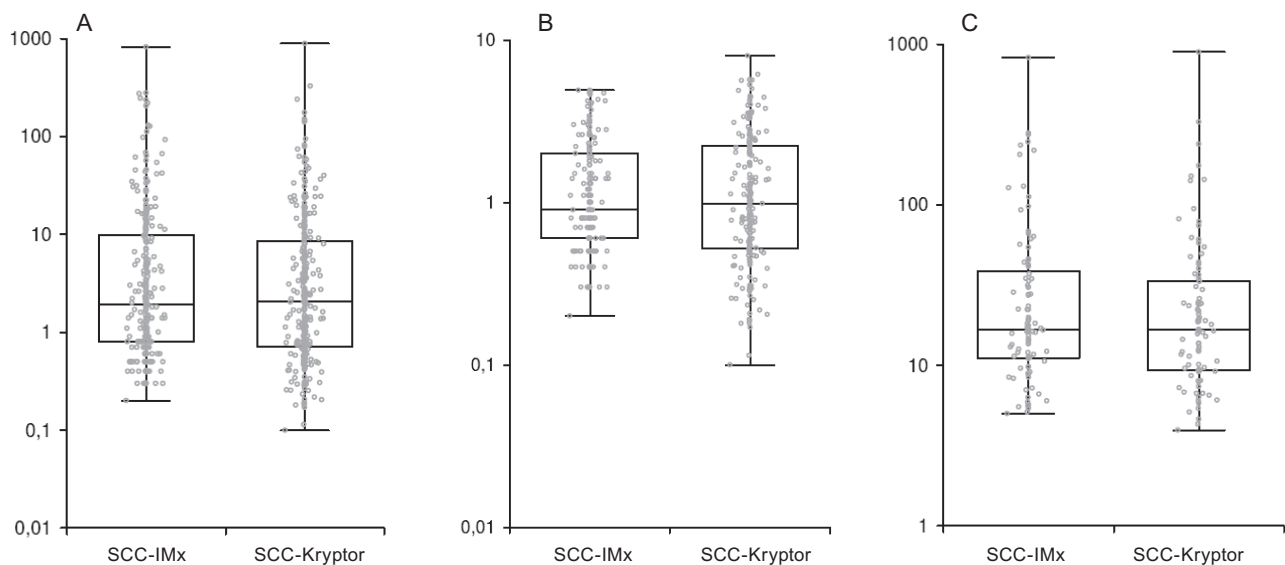
Ter vergelijking van de overeenkomst in uitslagen van de twee bepalingprocedures is een correlatiestudie uitgevoerd volgens het NCCLS-EP-9-protocol waarvoor in beide ziekenhuizen samen 302 patiëntensera zijn verzameld. Op beide locaties zijn de uitslagen van de Kryptor Compact (BRAHMS) vergeleken met de uitslagen van de IMx (Abbott). De verkregen uitslagen van beide systemen werden vervolgens verwerkt volgens de methode van Passing en Bablok. De bovengrens van de referentiewaarde werd vastgesteld met het bepalen van de 95^e percentiel bij 84 gezonde vrijwilligers volgens de 'Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) Guidelines' C28-A3 met behulp van MedCalc, versie 11.1.1.0 (MedCalc Software, Mariakerke, Belgium).

Resultaten

In tabel 1 zijn de intrarun- en interrunkvariatie van de poolsera en controlematerialen van verschillende concentraties SCC gemeten met de Kryptor Compact weergegeven. De intrarunkvariatiecoëfficiënt van een pool van 0,9 ng/ml SCC bedroeg 5,9%, van 14,2 ng/ml SCC 1,9% en van 29,5 ng/ml SCC 1,1%. De inter-runkvariatiecoëfficiënt van 0,9 ng/ml SCC was 6,1%, van 14,2 ng/ml SCC 1,9% en van 29,5 ng/ml SCC 1,8%. De lineariteit van de SCC-assay volgens NCCLS-EP-6 liet een goede en acceptabele lijn zien met een intercept van 0,31 en een helling van 1,00. Concentraties van beide monsters waren 0,9 en 29,5 ng/ml (figuur 1).

Tabel 1. Overzicht van de variatiecoëfficiënten van de intra- en interrunkvariatie van lage, midden- en hoge concentraties SCC in pool-serum en in controlemateriaal 1 en 2 voor de Kryptor Compact

SCC-monsters	(ng/ml)	Intrarun VC (%)	Interrun VC (%)
Laag	0,9	5,9	6,1
Midden	14,2	1,9	1,9
Hoog	29,5	1,1	1,8
Controle 1	1,6	3,4	4,5
Controle 2	36,8	0,9	1,3



Figuur 3. Boxplots van SCC-uitslagen van de patiëntenvergelijking in logaritmische schaalverdeling (ng/ml). A) alle SCC-uitslagen; B) SCC < 5 ng/ml en C) SCC ≥ 5 ng/ml.

In figuur 2 zijn de resultaten van de correlatiestudie weergegeven van patiëntensera. Aangezien de IMx een hogere detectielimiet kent dan de Kryptor Compact, zijn alleen de resultaten meegenomen met een meetbare uitslag: >0,3 ng/ml voor de IMx en >0,1 ng/ml voor de Kryptor Compact (N=289). De uitslagen van beide apparaten verschilden niet significant van elkaar, doch lieten enige mate van spreiding zien rondom de lijn met een intercept van -0,01 (95%-betrouwbaarheidsinterval: -0,08 tot 0,10) en een helling van 1,01 (95%-betrouwbaarheidsinterval: 0,93 tot 1,07). De data van de patiëntenvergelijking is tevens uitgezet in boxplots waarbij de verschillen in distributie zichtbaar worden (figuur 3). De SCC-uitslagen van de Kryptor Compact lieten het lagere meetbereik duidelijk zien (0,3 ng/ml IMx versus 0,1 ng/ml Kryptor Compact).

Tabel 2 laat de resultaten zien van de referentiewaardenstudie bij 84 gezonde vrijwilligers (42 mannen en 42 vrouwen). Mannen blijken gemiddeld iets hogere SCC-waarden te hebben dan vrouwen.

Controlematerialen en standaarden voor SCC van beide firma's lieten vice versa een duidelijk verschil zien van ongeveer een factor 2 tussen beide apparaten. Hierbij meet de Kryptor Compact hoger dan de IMx. Tevens werd er een vergelijkbaar verschil gevonden tussen beide apparaatgroepen met materiaal van de DGKL-rondzending voor SCC. Er is dus duidelijk sprake van een slechte commuteerbaarheid voor de SCC-bepaling. Vreemd genoeg is dit effect niet zichtbaar in de vergelijking van patiëntenmonsters volgens het EP-9-protocol. Mogelijk zijn de gevonden discrepanties te verklaren door verschil in gevoeligheid voor bepaalde matrices van materialen van standaarden en controlemonsters.

Conclusie

Uit onze studie blijkt dat de geëvalueerde SCC-assay op de Kryptor Compact een goede reproduceerbaarheid heeft. In vergelijking met de IMx heeft de Kryptor Compact een betere precisie (respectievelijk 3,8% en 1,9% voor de intrarun-, en respectievelijk 5,3% en 1,9% voor de interrunkvariatie). Deze precisie (analytische variatiecoëfficiënt) ligt beduidend lager dan de intra-individuele en interindividuele biologische variatie en de maximale imprecisie (respectievelijk 39,4%, 35,7% en 19,7%). Ook de correlatie van patiëntensera tussen de SCC-assay op de Kryptor Compact en de IMx is goed te noemen. In het lage gebied <2,0 ng/ml SCC meet de IMx een fractie lager dan de Kryptor Compact, wat de verschillen in referentiewaarden verklaart tussen beide apparaten. De Kryptor Compact heeft een lagere detectiegrens dan de IMx met als respectievelijke ondergrens 0,1 ng/ml SCC en 0,3 ng/ml SCC. In combinatie met een betere precisie dan de IMx, is de Kryptor Compact een goede keuze voor het bepalen van de tumormarker SCC in een klinisch-chemisch laboratorium.

Tabel 2. Gemiddelde waarden en referentiewaarden voor SCC voor gezonde mannen en vrouwen, gemeten op de IMx en de Kryptor Compact

	SCC - IMx (ng/ml)		SCC - Kryptor (ng/ml)	
	Gem. ± SD	ref. waarde	Gem. ± SD	ref. waarde
Mannen (n=42)	0,8 ± 0,4	< 1,6	0,9 ± 0,4	< 1,8
Vrouwen (n=42)	0,6 ± 0,3	< 1,1	0,5 ± 0,4	< 1,6
	p = 0,003		p < 0,001	

Referenties

1. Nakashima T, Yasumatsu R, Kuratomi Y, Masuda M, Kuwano T, Toh S, et al. Role of squamous cell carcinoma antigen 1 expression in the invasive potential of head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck* 2006; 28: 24-30.
2. Torre GC. SCC antigen in malignant and nonmalignant squamous lesions. *Tumour Biol* 1998; 19: 517-526.
3. Indinnimeo M, Reale MG, Cicchini C, Stazi A, Fiori E, Izzo P. CEA, TPA, CA 19-9, SCC and CYFRA at diagnosis and in the follow-up of anal canal tumors. *Int Surg* 1997; 82: 275-279.
4. Ruvoletto MG, Tono N, Carollo D, Vilei T, Trentin L, Muraca M, et al. Surface expression of squamous cell carcinoma antigen (SCCA) can be increased by the preS1 (21-47) sequence of hepatitis B virus. *J Gen Virol* 2004; 85 (Pt 3): 621-624.
5. Hussein MM, Ibrahim AA, Abdella HM, Montasser IF, Hassan MI. Evaluation of serum squamous cell carcinoma antigen as a novel biomarker for diagnosis of hepatocellular carcinoma in Egyptian patients. *Indian J Cancer* 2008; 45: 167-172.
6. Guido M, Roskams T, Pontisso P, Fassan M, Thung SN, Giacomelli L, et al. Squamous cell carcinoma antigen in human liver carcinogenesis. *J Clin Pathol* 2008; 61: 445-447.
7. Roijer E, de Bruijn HW, Dahlen U, ten Hoor K, Lundin M, Nilsson K, et al. Squamous cell carcinoma antigen isoforms in serum from cervical cancer patients. *Tumour Biol* 2006; 27: 142-152.
8. Nustad K, Dowell BL, Davis GJ, Stewart K, Nilsson O, Roijer E, et al. Characterization of monoclonal antibodies directed against squamous cell carcinoma antigens: report of the TD-10 Workshop. *Tumour Biol* 2004; 25: 69-90.

Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk 2010; 35: 27-30

De immunochemische fecaaloccultbloedtest in een screeningsstudie naar colorectaal carcinoom

A.J. van VUUREN¹, A.H.C. van ROON¹, F.M. VERHEIJEN², J. FRANCKE¹, E.J. KUIPERS¹ en J.G. BOONSTRA³

In november 2009 heeft de Gezondheidsraad geadviseerd een nationaal screeningsprogramma voor colorectaal carcinoom (CRC) in Nederland op te zetten. Het was reeds bekend dat screening voor deze aandoening met de guaiac-fecaaloccultbloedtest (gFOBT) het sterftepercentage vermindert, en recent zijn tevens ervaringen opgedaan met de immunologische FOBT (iFOBT). De gFOBT en iFOBT verschillen niet in hun detectiegraad voor CRC, echter met de iFOBT wordt een groter aantal patiënten met geavanceerde adenomen opgespoord. De kwantitatieve opzet van de gebruikte iFOBT maakt het mogelijk verschillende afkapwaarden te kiezen. Zowel klinisch als analytisch lijkt 75 ng/ml een goede afkapwaarde, mits voldoende capaciteit voor vervolgonderzoek (colonoscopie) beschikbaar is.

Colorectaal carcinoom (CRC) is een groot gezondheidsprobleem in de westerse wereld. Voor zowel vrouwen als mannen is CRC het derde meest voorkomende type kanker. Opsporing van vroege carcinomen en verwijdering van adenomen (mogelijke voorstadia van carcinomen) kunnen het sterftepercentage sterk verminderen. Ondanks aanbevelingen van de Europese Raad om personen boven de 50 jaar met een gemiddeld risico te onderzoeken voor CRC, is er in Nederland nog geen nationaal programma voor screening in de bevolking naar CRC.

Maag, Darm en Leverziekten¹, Afdeling Klinische Chemie³, Erasmus MC, Rotterdam, Geïntegreerd Klinisch Chemisch Laboratorium², Albert Schweitzer ziekenhuis, Dordrecht

Correspondentie: dr. H. van Vuuren, Afdeling Maag-, darm en leverziekten, Erasmus MC, Postbus 2040, 3000 CA Rotterdam
E-mail: a.vanvuuren@erasmusmc.nl

In het verleden is in grote gerandomiseerde studies aangetoond dat met screening middels een guaiac-fecaaloccultbloedtest (gFOBT) het CRC-sterftepercentage daalt (1-3). gFOBT is echter niet specifiek voor humaan hemoglobine (Hb) en er is voor een goede interpretatie van de test een dieetrestrictie voor de deelnemers nodig. Daarbij komt dat aankleuring van het Hb in het monster soms moeilijk te beoordelen is en ook snel verdwijnt (4), en dat automatisering van de test niet haalbaar is.

De immunochemische FOBT (iFOBT) is een veelbelovend alternatief, waarbij gebruik wordt gemaakt van polyklonale antilichamen tegen humaan HbA₀. Er bestaan diverse kwalitatieve iFOBT-testen met een vaste afkapwaarde welke gebaseerd zijn op immunochromatografische technieken. Er worden aanzienlijke verschillen gevonden in de verhouding tussen sensitiviteit en specificiteit voor deze testuitvoering (5). Daarnaast zijn er een aantal kwantitatieve geautomatiseerde iFOBT-testen voor handen. Deze beschikken niet alleen over een betere reproduceerbaarheid en geven meer mogelijkheden voor gedegen kwaliteitscontrole, maar bieden tevens de mogelijkheid om de meest optimale afkapwaarde voor een bevolkingsonderzoek te onderzoeken (4, 6). Er is echter nog weinig bekend over de analytische prestaties van iFOBT-testen zoals gebruikt in lopende studies naar screening op dikke-darmtumoren. Inzicht in de precisie van de test rondom beslisgrenzen is essentieel voor een zuivere inclusie van patiënten voor de vervolgdagnostiek. In veel studies wordt momenteel een afkapwaarde van rond de 100 ng Hb/ml feces gehanteerd. Echter, lagere afkapwaarden worden ook beschreven (7).

Dit artikel beschrijft kort een pilotscreeningsstudie in Nederland naar colorectaal carcinoom en de eerste