Vergleich zweier Tests zur Bestimmung von CA 15-3

Comparison of two assays for the analysis of CA 15-3

F.-J. Schmitz, G. Schmitz, H. Reinauer

Zusammenfassung

Der Vergleich des neu entwickelten Mikropartikel-Enzym-Immuno-Assays (MEIA) für CA 15-3 am IMx® mit dem bereits existierenden CA 15-3-Test am ES 700® zeigt eine gute Übereinstimmung der Ergebnisse. Die Auswertung der Analysedaten von 191 humanen Serumproben ergab die Regressionsgerade y (IMx), x (ES 700): $y = 0{,}79x + 0{,}73$ mit dem Korrelationskoeffizienten $r = 0{,}99$. Die Präzisionen von Tag zu Tag und in der Serie beider Teste waren vergleichbar gut. Beim neu entwickelten MEIA lag die Präzision in der Serie zwischen 2,3 % und 7,6 %, die Präzision von Tag zu Tag bewegte sich zwischen 3,5 % und 5,6 %. Die Nachweisgrenze beider Teste lag bei ca. 1 U/ml und beide Assays zeigten eine gute Verdünnungslinearität. Insgesamt steht mit dem neu entwickelten IMx CA 15-3-Assay ein in Präzision, Handhabung und Zuverlässigkeit guter Test zur Verfügung, dessen Leistungsdaten mit dem Enzymun-Test von Boehringer Mannheim vergleichbar sind.

Schlüsselwörter

CA 15-3 – IMx® – ES 700® – Methodenvergleich

Summary

A comparison of the microparticle enzyme immunoassay (MEIA) CA 15-3 analyzed by the IMx® with an already existing CA 15-3 test performed on a ES 700® system showed a good comparability of results. The evaluation of 191 human serum samples resulted in the following regression line y (IMx), x (ES 700): $y = 0.79x + 0.73$ with a correlation coefficient of $r = 0.99$. Day-to-day as well as within-run-precision of both analytical systems were comparably good. The within-run-precision of the new developed MEIA was 2.3 % to 7.6 % whereas coefficients of variation, between 3.5 % and 5.6 % were found in the day-to-day precision. The limit of detection of both tests was about 1 U/ml and both assays showed good dilution linearity. In summary, the new IMx® CA 15-3 assay is good in handling and reliability as well as in day-to-day and within-run-precision. The presented data demonstrate that the analytical results obtained with both systems show good comparability.

Key words

CA 15-3 – IMx® – ES 700® – analytical comparison

Anschriften der Autoren:

Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Korrespondenz-Adresse:

Dr. med. Franz-Josef Schmitz
Dr. med. Gabriele Schmitz
Prof. Dr. med. Hans Reinauer
Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik, Moorenstraße 5
D-40225 Düsseldorf

Lab. med. 19: 290–294 (1995)

Einleitung

Das tumorassoziierte Antigen CA 15-3 wird über seine Reaktion mit zwei spezifischen monoklonalen Antikörpern, MAB 115 D8 und MAB DF 3, definiert. Das tumorassoziierte Antigen CA 15-3 ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 300 000–450 000 Dalton. Ein bereits die Primärstruktur betreffender ausgeprägter Polymorphismus, u.a. durch unterschiedliche Häufigkeit repetitiver Domänen, wird vermutet. In Analogie zum CEA kommt es auch beim CA 15-3

zu variablen Glykosilierungen, so daß auch vom CA 15-3 verschiedene Isoantigene existieren [1]. Die biologische Funktion des tumorassoziierten Antigens CA 15-3 ist bisher unbekannt.

Da CA 15-3 zu den physiologischen mucinartigen Exkretionsprodukten normaler Schleimhautzellen gehört, kann es auch bei Gesunden in Spuren im Serum nachgewiesen werden [2]. Bei verschiedenen benignen und malignen Erkrankungen werden jedoch gehäuft höhere bis stark erhöhte Serumwerte gefunden.

Wie die meisten anderen Tumormarker ist auch CA 15-3 nicht organ- und tumorspezifisch. Das Hauptindikationsgebiet für CA 15-3 ist die Verlaufskontrolle und Rezidivfrüherkennung des Mammakarzinoms [3]. Die Sensitivität des CA 15-3 beim Mammakarzinom zum Zeitpunkt der Diagnosestellung (Grenzwert 30 U/ml) bewegt sich in Abhängigkeit vom Tumorstadium (I–IV) zwischen 5 und 60 %. Die zunächst vermutete Spezifität erhöhter Werte für das Mammakarzinom hat sich nicht bestätigt, so daß CA 15-3 weder zum Screening noch zur Diagnosesicherung bei dieser Erkrankung genutzt werden sollte. CA 15-3 kommt mit geringerer Häufigkeit auch bei vielen anderen epithelialen Tumoren vor, so daß dieser Tumormarker z. B. auch beim Ovarial- und Bronchialkarzinom gelegentlich zur Verlaufskontrolle genutzt werden kann [4].

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung verglichen wir den neu entwickelten Mikropartikel-Enzym-Immuno-Assay (MEIA) der Fa. Abbott mit dem bereits etablierten Zwei-Schritt-Sandwich-Elisa der Fa. Boehringer Mannheim, welcher auf dem bekannten Prinzip der Biotin-Streptavidin-Technologie basiert. Die Analysen wurden am IMx® und parallel an einem ES 700® durchgeführt.

Material und Methoden

Im Rahmen des methodischen Vergleiches wurden humane Serumproben verwendet, die alle innerhalb von 24 Stunden nach Blutentnahme mit beiden Testen analysiert wurden. Die Lagerung der Proben bis zur Analyse erfolgte bei 2–8° C im Kühlschrank.

Der Mikropartikel-Enzym-Immuno-Assay von Abbott arbeitet mit den beiden monoklonalen Maus-Antikörpern 115D8 und DF3. Als Substrat wird 4-Methylumbelliferylphosphat verwendet und als Indikatorenzym dient alkalische Phosphatase. Das fluoreszierende Produkt wird dann photometrisch gemessen.

Der CA 15-3 Test von Abbott verwendet 6 Kalibratoren (0, 15, 60, 120, 180, 250 U/ml) und hat zwei packungsinterne Kontrollen „low" (35 U/ml) und „high" (150 U/ml).

Der Zwei-Schritt-Sandwich-Elisa von Boehringer Mannheim – basierend auf der Biotin-Streptavidin-Technologie – verwendet ebenfalls die monoklonalen Antikörper 115D8 und DF3. Als Substrat dient ABTS® (2,2-Azino-di-(3-äthyl-benzthiazolin-sulfonsäure(6))-diammoniumsalz und als Enzym wird Peroxidase verwendet. Die photometrische Auswertung des Testes erfolgt bei 422 nm.

Der CA 15-3 Test von Boehringer Mannheim verwendet chargenabhängig 5 Kalibratoren (0; 22,4; 42,7; 101; 201 U/ml) sowie 2 chargenabhängige Tumorkontrollen „Level 1" (21,7 U/ml) und „Level 2" (74,9 U/ml). Bei einer Test-Spezifität für CA 15-3 von 95 % liegt der Cut-off bei 22 U/ml, bei einer 99 %igen Spezifität dagegen bei 30 U/ml [5].

Methodenvergleich

Im Rahmen des vorliegenden Methodenvergleiches wurden 191 humane Serumproben auf dem IMx®-Gerät mit den Ergebnissen des Enzymun®-Testes am ES 700® verglichen.

Präzision innerhalb der Serie

Zur Bestimmung der Präzision innerhalb der Serie des neuen Abbott-Tests wurden an 3 Tagen die packungsinternen Kontrollen „low" und „high" sowie die Bio-Rad-Tumormarker-Kontrolle „Level 1" jeweils 20-fach parallel eingesetzt. In analoger Weise wurden am ES 700® die Tumormarker-Kontrollen Level 1 und 2 von Boehringer Mannheim verwendet.

Präzision von Tag zu Tag

Zur Bestimmung der Präzision von Tag zu Tag wurden über 10 Tage die packungsinternen Kontrollen „low" und „high" täglich jeweils in Doppelbestimmung am IMx® eingesetzt. Am ES 700® verwendeten wir in analoger Weise die Boehringer Tumormarker-Kontrollen Level 1 und 2.

Bestimmung der Nachweisgrenze

Zur Bestimmung der Nachweisgrenze des MEIA Testes wurde der „Null-Kalibrator" (Kalibrator A) an 4 verschiedenen Tagen zehnfach parallel gemessen. Auch der „Nullkalibrator" des Enzymun®-Testes wurde entsprechend am ES 700® gemessen.

Bestimmung der Verdünnungslinearität

Drei Patientenproben mit Konzentrationen von ca. 200 U/ml, 150 U/ml und 100 U/ml wurden für die Bestimmung der Verdünnungslinearität eingesetzt. Die

Proben wurden mit Verdünnungspuffer verdünnt und anschließend in Doppelbestimmung am IMx® sowie am ES 700® gemessen.

Darüberhinaus wurden die Wiederfindung der packungsinternen Abbott-Kontrollen „low" and „high" am ES 700® sowie die Wiederfindung der Boehringer Mannheim Kontrollen „Level 1" und „Level 2" am IMx® in Doppelbestimmung analysiert, um so einen Anhalt für die Wiederfindung der firmeneigenen Kontrollmaterialien mit dem Test und dem Gerät der Fremdfirma zu bekommen.

Ergebnisse und Diskussion

Methodenvergleich

Der Methodenvergleich von 191 humanen Serumproben mit beiden Assays ergab nach der statistischen Auswertung nach Passing und Bablock [6] folgende Ausgleichsgerade: y = ax + b Y: IMx (Abbott), X: ES 700 (Boehringer Mannheim): y = 0,791x + 0,733. Der Korrelationseffizient lag bei: r = 0,989 (s. Tabelle 1 und Abb. 1).

Berücksichtigt man nur die 172 humanen Serumproben, die CA 15-3 Werte am ES 700 < 30 U/ml (Cut off bei 99 %-Spezifität) aufweisen, so lautet die Ausgleichsgerade: y = 0,795x + 0,720; r = 0,978 (s. Tabelle 1 und Abb. 2).

Insgesamt zeigen die Reagenziensätze bei der statistischen Auswertung gemäß Passing und Bablock [6] also eine gute Übereinstimmung.

Tabelle 1. Vergleich humaner Serumproben für CA 15-3 am IMx® und ES 700®

	Anzahl (n)	Korrelation (r)	Steigung (a)	y-Intervall (b)
Alle Werte	191	0,989	0,791	0,733
Werte < 30 U/ml	172	0,978	0,795	0,720

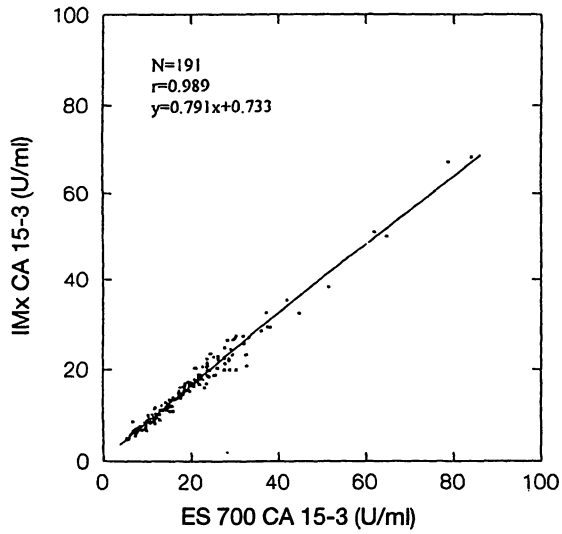

Abb. 1. Vergleich aller CA 15-3 Meßwerte mit den Assays von Abbott und Boehringer Mannheim

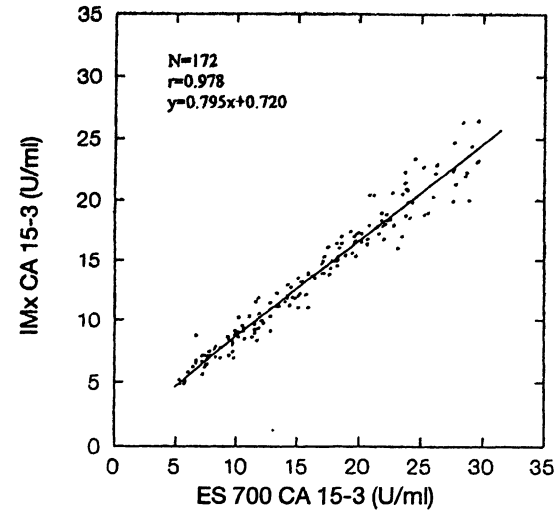

Abb. 2. Vergleich aller CA 15-3 Meßwerte < 30 U/ml mit den Assays von Abbott und Boehringer Mannheim

Präzision in der Serie

Die Daten der Präzision in der Serie für die Abbott- und Boehringer Kontrollen sowie für die BioRad Tumormarker-Kontrolle Level 1 sind in Tabelle 2 veranschaulicht.

Die Präzisionsdaten der Kontrollen sind vergleichbar akzeptabel für beide Immunoassays.

Tabelle 2. Präzision in der Serie von je 3 Läufen (n = 20) am IMx® und ES 700®

	IMx® Low-Kontrolle VK %	IMx® High-Kontrolle VK %	IMx® BioRad Level 1 VK %
Lauf 1	2,3	4,9	2,6
Lauf 2	3,5	7,6	2,7
Lauf 3	2,9	3,0	2,9
	ES 700® Level 1	**ES 700® Level 2**	**ES 700® BioRad Level 1**
	VK %	VK %	VK %
Lauf 1	2,5	3,7	2,5
Lauf 2	2,9	5,6	2,4
Lauf 3	3,1	4,1	2,8

VK = Variationskoeffizient

Präzision von Tag zu Tag

Die Präzision von Tag zu Tag wurde in Tabelle 3 wieder für die firmeneigenen Kontrollen sowie für die externe BioRad-Kontrolle dargestellt. Desweiteren zeigt Abbildung 3 den Verlauf der Abbott-Kontrollen „low" and „high" während der durchgeführten 21 IMx-Läufe.

Tabelle 3. Präzision von Tag zu Tag vom CA 15-3 Test am IMx® und ES 700®

	IMx® Low-Kontrolle	IMx® High-Kontrolle	IMx® BioRad Level 1
VK %	3,5	5,6	2,7
	ES 700® Level 1	**Es 700® Level 2**	**ES 700® BioRad Level 1**
VK %	3,0	5,4	2,8

VK = Variationskoeffizient

Als Mittelwerte bei n = 21 Läufen fanden wir für die „low"-Kontrolle 34,2 U/ml (deklariert wurde von Abbott 35 U/ml) und für die „high"-Kontrolle 146,5 U/ml (bei deklarierten 150 U/ml).

Insgesamt sind auch die Präzisionsdaten für beide Tests vergleichbar gut, wobei die IMx-"low"-Kontrolle unabhängig vom absoluten Wert weniger Schwankungen als die „high"-Kontrolle von Abbott aufweist.

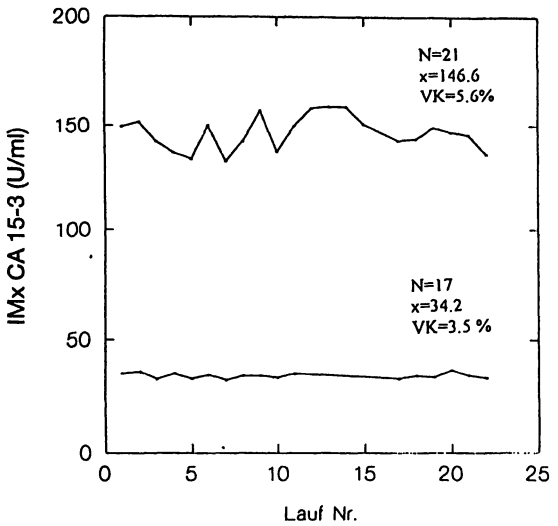

Abb. 3. Verlauf der IMx®-Kontrollen „low" (n = 17) und „high" (n = 21) von Lauf zu Lauf

Nachweisgrenze

Die Nachweisgrenze der Tests wurde von beiden Firmen als E+3s (E. Meßwert des Nullkalibrators; S:

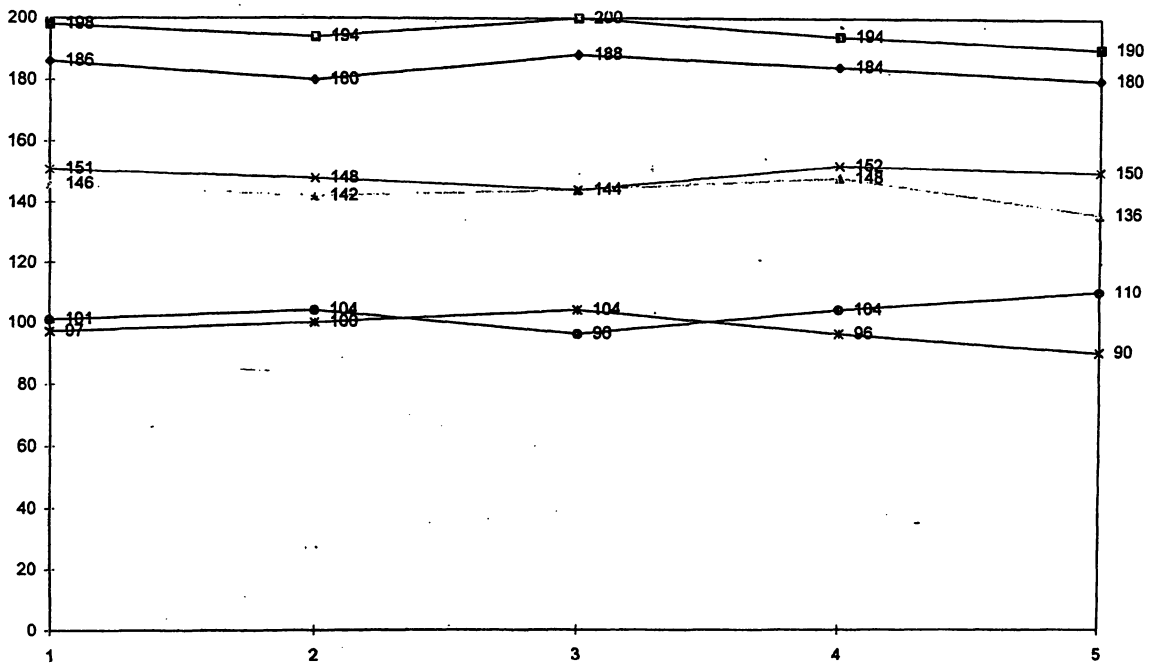

Abb. 4. Verdünnungslinearität der beiden CA 15-3 Assays von Abbott und Boehringer Mannheim

Standardabweichung der Messung des Nullkalibrators) definiert.
Die Nachweisgrenze lag für den Abbott Test bei 0,99 U/ml und für den Boehringer Mannheim Test bei 0,96 U/ml.

Verdünnungslinearität

Zur Bestimmung der Verdünnungslinearität wurden in beiden Testen 3 Seren mit ca. 200 U/ml, 150 U/ml und 100 U/ml unverdünnt sowie 1:2, 1:4, 1:8 und 1:10 verdünnt gemessen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4 dargestellt.

Die Variationskoeffizienten der Ergebnisse zur Überprüfung der Verdünnungslinearität für den Boehringer Test bewegten sich zwischen 1,98 % und 4,95 % und für den Abbott Test zwischen 1,95 % und 5,32 %.

Bei der Wiederfindung der IMx „low"- und IMx „high"-Kontrollen in Doppelbestimmung am ES 700 ergaben sich folgende Werte:

„low": 33,1 U/ml (entspricht 94,6 % des von Abbott mit 35 U/ml deklarierten Wertes)
„high": 144,8 U/ml (entspricht 96,5 % des von Abbott mit 150 U/ml deklarierten Wertes)

Die entsprechende Wiederfindungsprobe der Boehringer-Kontrollen Level 1 und 2 am IMx lieferte folgende Werte:

„Level 1": 20,3 U/ml (entspricht 93,5 % des von Boehringer Mannheim mit 21,7 U/ml deklarierten Wertes)
„Level 2": 73,0 U/ml (entspricht 97,5 % des von Boehringer Mannheim mit 74,9 U/ml deklarierten Wertes)

Die firmeneigenen Kontrollmaterialien werden mit dem Test und dem Gerät der Fremdfirma mit akzeptabler Richtigkeit analysiert.

Zusammenfassend sind die Leistungsdaten der beiden Reagenziensätze gut miteinander vergleichbar. Beide Immunoassays zeigen akzeptable Präzisionsdaten. Die Nachweisgrenze liegt bei beiden Testen bei ca. 1 U/ml und auch die Verdünnungslinearität beider Teste ist vergleichbar gut.

Der neu entwickelte CA 15-3 Assay von Abbott ist am IMx® einfach zu handhaben und die gefundenen Analyseresultate können zuverlässig reproduziert werden, so daß beide CA 15-3 Immunoassays die an sie gestellten Erwartungen erfüllen.

Literatur

1. Taylor-Papadimitriou J, Gendler S (1988) Molecular aspects of mucins. Cancer Rev. 11–12, 11–24
2. Tobias R, Rothwell C, Wagner J, Green A, Liu YS (1985) Development and evaluation of a radioimmunoassay for the detection of a monoclonal antibody defined breast tumor associated antigen 115D8/DF3. Clin Chem 31, 986
3. Pons-Anicet DM, Krebs PB, Mira R, Namer M (1987) Value of CA 15-3 in the follow-up of breast cancer patients. Br J Cancer 55, 567–569
4. Colomer R, Ruibal A, Genolla J, Salvador L (1989) Circulating CA 15-3 antigen levels in non-mammary malignancies. Br J Cancer 59, 283–286
5. Jaworek R (1991) In: Klapdor R. 6th Symposium on tumour markers. W. Zuckschwerdt Verlag, München (1992), Hamburg 1991, pp. 259–263
6. Bablok W, Passing H (1985) Application of statistical procedures in analytical instrument testing. Journal of Automatic Chemistry 7, 74–79