

**СОДЕРЖАНИЕ**

1. НАЗНАЧЕНИЕ	2
2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА	2
3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	3
4. СОСТАВ НАБОРА	4
5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	5
6. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ	5
7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА	5
8. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА	6
9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА	7
10. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ И НОРМЫ	8
11. ЛИТЕРАТУРА	9

**CONTENT**

1. INTENDED USE	10
2. SUMMARY AND EXPLANATION	10
3. PRINCIPLE OF THE TEST	11
4. WARNINGS AND PRECAUTIONS	11
5. KIT COMPONENTS	12
6. SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE	13
7. TEST PROCEDURE	13
8. QUALITY CONTROL	15
9. CALCULATION OF RESULTS	15
10. EXPECTED VALUES	15
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	16
12. LITERATURE	16

Инструкция составлена Руководителем службы клиентского сервиса ООО «ХЕМА»,  
к. б. н. Д. С. Кострикиным

## **ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СА19.9 В СЫВОРОТКЕ (ПЛАЗМЕ) КРОВИ «СА19.9-ИФА»**

### **1. НАЗНАЧЕНИЕ**

**1.1.** Набор реагентов «СА19.9-ИФА» предназначен для количественного определения концентрации СА19.9 в сыворотке (плазме) крови методом твердофазного иммуноферментного анализа.

**1.2.** СА19.9, или углеводный антиген сиалил-Льюиса, представляет собой антиген (эпитоп), ассоциированный с раком поджелудочной железы, печени, желудка, а также толстой и прямой кишки. Количественное определение СА19.9 в сыворотке или плазме крови, особенно одновременно с определением карциноэмбрионального антигена (КЭА, ХЕМА кат. № К224), полезно для контроля эффективности лечения и слежения за течением рака указанной локализации. Вместе с тем выведение антигена из циркуляции зависит от проходимости желчных путей, поэтому холестаза может вызвать неадекватное повышение уровня антигена в сыворотке. Кроме того, у некоторых индивидов отсутствует фермент, синтезирующий данную детерминанту; поэтому антиген СА19.9 у них не определяется, несмотря на наличие злокачественной опухоли. В связи с этим данные по содержанию СА19.9 всегда следует интерпретировать в комплексе с результатами других методов исследования и клиническими данными.

### **2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА**

Определение СА19.9 основано на использовании «сэндвич»-варианта твердофазного иммуноферментного анализа. На внутренней поверхности лунок планшета иммобилизованы мышинные моноклональные антитела к СА19.9 человека. В лунках планшета, при добавлении исследуемого образца, происходит связывание СА19.9, содержащегося в исследуемом образце, с антителами на твердой фазе. Образовавшийся комплекс выявляют с помощью конъюгата мышинных моноклональных антител к СА19.9 человека с пероксидазой хрена. В результате образуется связанный с пластиком «сэндвич», содержащий пероксидазу. Во время инкубации с раствором субстрата тетраметилбензидина (ТМБ) происходит окрашивание растворов в лунках. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации СА19.9 в исследуемом образце. Концентрацию СА19.9 в исследуемых образцах определяют по калибровочному графику зависимости оптической плотности от содержания СА19.9 в калибровочных пробах.

### 3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

**3.1. Специфичность.** Перекрестная реакция мышинных моноклональных антител к СА19.9 человека с другими аналитами приведена в таблице:

Аналит	Перекрестная реакция, %
КЭА	<0.1
СА15.3	<0.1
СА125	<0.1

#### 3.2. Воспроизводимость.

Коэффициент вариации результатов определения содержания СА19.9 в одном и том же образце сыворотки (плазмы) крови с использованием Набора «СА19.9-ИФА» не превышает 8,0%.

#### 3.3. Линейность.

Зависимость концентрации СА19.9 в образцах сыворотки (плазмы) крови при разведении их сывороткой (плазмой) крови, не содержащей СА19.9, имеет линейный характер в диапазоне концентраций 12–240 Ед/мл и составляет  $\pm 10,0\%$ .

#### 3.4. Точность.

Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» – соответствие измеренной концентрации СА19.9 предписанной, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы 60 Ед/мл. Процент «открытия» составляет 90–110%.

#### 3.5. Чувствительность.

Минимальная достоверно определяемая Набором «СА19.9-ИФА» концентрация СА19.9 в сыворотке (плазме) крови не превышает 2 Ед/мл.

## 4. СОСТАВ НАБОРА

Код компонента	Символ	Наименование	Кол-во	Ед.	Описание
1 P223Z	SORB MTP	<b>Планшет</b> 96-луночный полистироловый, стрипированный, готов к использованию	1	шт.	-
2 C223Z	CAL 1-5	<b>Калибровочные пробы</b> на основе фосфатного буфера (рН 7.2-7.4), содержащие известные количества СА19.9 – <b>0; 12; 60; 120; 240 Ед/мл</b> , готовы к использованию (калибровочная проба 0 Ед/мл – 6 мл, остальные – по 0.8 мл каждая)	5	шт.	прозрачные жидкости красного цвета (калибровочная проба 0 – прозрачная бесцветная жидкость)
3 Q223Z	CONTROL	<b>Контрольная сыворотка</b> на основе сыворотки крови человека с известным содержанием СА19.9, готова к использованию (0.8 мл)	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
4 T223Z	CONJ HRP	<b>Конъюгат</b> , готов к использованию (11 мл)	1	шт.	прозрачная жидкость красного цвета
5 S011Z	DIL	<b>ИФА-Буфер</b> , готов к использованию (11 мл)	1	шт.	прозрачная жидкость синего цвета
6 R055Z	SUBS TMB	<b>Раствор субстрата тетраметилбензидина (ТМБ)</b> , готов к использованию (11 мл)	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
7 S008Z	BUF WASH 21X	<b>Концентрат отмывочного раствора</b> , 21х-кратный (22 мл)	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
8 R050Z	STOP	<b>Стоп-реагент</b> , готов к использованию (11 мл)	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
9 N003	-	Бумага для заклеивания планшета	2	шт.	-
10 K223I	-	Инструкция по применению Набора реагентов «СА19.9-ИФА»	1	шт.	-
11 K223Q	-	Паспорт контроля качества Набора реагентов «СА19.9-ИФА»	1	шт.	-

## 5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

**5.1.** Потенциальный риск применения Набора – класс 1 (ГОСТ Р 51609-2000).

**5.2.** Все компоненты Набора, за исключением стоп-реагента (5,0% раствор серной кислоты), в используемых концентрациях являются нетоксичными.

Раствор серной кислоты обладает раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. При попадании на кожу и слизистые пораженный участок следует промыть большим количеством проточной воды.

**5.3.** При работе с Набором следует соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

**5.4.** При работе с Набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированный материал, способный длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

## 6. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

- фотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность содержимого лунок планшета при длине волны 450 нм;
- термостат, поддерживающий температуру  $+37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ;
- дозаторы со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы в диапазоне 25–250 мкл;
- цилиндр мерный вместимостью 500 мл;
- вода дистиллированная;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- бумага фильтровальная.

## 7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

**7.1.** Перед проведением анализа компоненты Набора и исследуемые образцы сыворотки (плазмы) крови следует выдержать при комнатной температуре ( $+18...+25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) не менее 30 мин.

### **7.2. Приготовление планшета.**

Вскрыть пакет с планшетом и установить на рамку необходимое количество стрипов. Оставшиеся неиспользованными стрипы, чтобы предотвратить воздействие на них влаги, тщательно заклеить бумагой для заклеивания планшета и хранить при температуре  $+2...+8\text{ }^{\circ}\text{C}$  в течение всего срока годности Набора.

### **7.3. Приготовление отмывочного раствора.**

Содержимое флакона с концентратом отмывочного раствора (22 мл), перенести в мерный цилиндр вместимостью 500 мл, добавить 440 мл дистиллированной воды и тщательно перемешать. В случае дробного использования Набора следует отобрать необходимое количество концентрата отмывочного раствора и развести дистиллированной водой в 21 раз (1 мл концентрата отмывочного раствора + 20 мл дистиллированной воды).

## 8. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

**8.1.** Набор реагентов «СА19.9-ИФА» должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности, указанного на упаковке Набора.

Допускается хранение (транспортировка) Набора при температуре до +25 °С не более 5 суток. Не допускается замораживание целого набора.

**Допускается однократное замораживание (-20 °С) калибровочных проб и контрольной сыворотки в аликвотах.**

**8.2.** Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 42 исследуемых образцов, 5 калибровочных проб и 1 пробы контрольной сыворотки (всего 96 определений).

**8.3.** В случае дробного использования Набора компоненты следует хранить следующим образом:

- оставшиеся неиспользованными стрипы необходимо тщательно заклеить бумагой для заклеивания планшета и хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора;
- ИФА-Буфер, конъюгат, субстрат, стоп-реагент после вскрытия флаконов следует хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора;
- калибровочные пробы и контрольную сыворотку после вскрытия флаконов следует хранить при температуре +2...+8 °С не более 2 месяцев;
- оставшийся неиспользованным концентрат отмывочного раствора следует хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора;
- приготовленный отмывочный раствор следует хранить при комнатной температуре (+18...+25 °С) не более 5 суток или при температуре +2...+8 °С не более 30 суток;

Примечание. После использования реагента немедленно закрывайте крышку флакона. Закрывайте каждый флакон своей крышкой.

**8.4.** Для проведения анализа не следует использовать гемолизированную, мутную сыворотку (плазму) крови, а также сыворотку (плазму) крови, содержащую азид натрия. Если анализ производится не в день взятия крови, сыворотку (плазму) следует хранить при температуре -20 °С. Повторное замораживание-оттаивание образцов сыворотки (плазмы) крови не допускается.

**8.5.** Исключается использование для анализа образцов сыворотки (плазмы) крови людей, получавших в целях диагностики или терапии препараты, в состав которых входят мышинные антитела.

**8.6.** При использовании Набора для проведения нескольких независимых серий анализов следует иметь в виду, что для каждого независимого определения необходимо построение нового калибровочного графика; кроме этого, рекомендуется определение концентрации СА19.9 в контрольной сыворотке.

**8.7.** Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение Инструкции по применению Набора.

## 9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

1	Поместите в рамку необходимое количество стрипов – исследуемые образцы в 2 повторах и 12 лунок для калибровочных проб и контрольной сыворотки.
2	Если предполагаемая концентрация SA19.9 в исследуемом образце превышает 240 Ед/мл, его следует дополнительно развести, используя калибровочную пробу 0. Использование других буферов и реагентов для разбавления образцов может исказить результаты определения! Примечание. Для получения надежных результатов рекомендуется использовать несколько последовательных разведений исследуемого образца сыворотки (плазмы) крови.
3	<b>Внесите во все лунки планшета по 50 мкл ИФА-Буфера.</b>
4	<b>Внесите в соответствующие лунки в дубликатах по 50 мкл калибровочной пробы и контрольной сыворотки. В остальные лунки внесите в дубликатах по 50 мкл исследуемых образцов сыворотки (плазмы) крови.</b> Внесение калибровочных проб, контрольной сыворотки и исследуемых образцов необходимо произвести в течение 5–10 минут.
5	Аккуратно перемешайте содержимое планшета круговыми движениями по горизонтальной поверхности, закройте планшет бумагой для заклеивания планшета. <b>Инкубируйте планшет в течение 30 минут при температуре +37 °C.</b>
6	По окончании инкубации удалите содержимое лунок аспирацией (например, с помощью водоструйного насоса) или декантированием и <b>отмойте лунки 3 раза.</b> При каждой отмывке добавьте во все лунки по 250 мкл отмывочного раствора (см. п. 7.3), встряхните планшет круговыми движениями по горизонтальной поверхности с последующей аспирацией или декантированием. Задержка при отмывке (замачивание лунок) не требуется. При каждом декантировании необходимо тщательно удалять остатки жидкости из лунок.
7	<b>Внесите во все лунки по 100 мкл конъюгата.</b>
8	Заклейте планшет бумагой для заклеивания планшета и <b>инкубируйте его в течение 30 минут при температуре +37 °C.</b>
9	По окончании инкубации удалите содержимое лунок и <b>отмойте лунки 5 раз.</b>
10	<b>Внесите во все лунки по 100 мкл раствора субстрата тетраметилбензидина.</b> Внесение раствора субстрата тетраметилбензидина в лунки необходимо произвести в течение 2–3 мин. <b>Инкубируйте планшет в темноте при комнатной температуре (+18...+25 °C) в течение 10–20 минут</b> в зависимости от степени развития синего окрашивания.
11	<b>Внесите во все лунки</b> с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор субстрата тетраметилбензидина, <b>по 100 мкл стоп-реагента</b> , при этом содержимое лунок окрашивается в ярко-желтый цвет.

Продолжение таблицы на стр. 8

12	<b>Измерьте величину оптической плотности (ОП) содержимого лунок планшета</b> на фотометре вертикального сканирования <b>при длине волны 450 нм</b> . Измерение ОП содержимого лунок планшета необходимо произвести в течение 15 мин после внесения стоп-реактента. Бланк фотометра выставляйте по калибровочной пробе С1.
13	Постройте в линейных координатах калибровочный график: ось абсцисс (x) – концентрация СА19.9 в калибровочных пробах (Ед/мл), ось ординат (y) – оптическая плотность калибровочных проб (ОП 450 нм). Для алгоритма обчета (аппроксимации) калибровочного графика используйте интервальный (кусочно-линейный, «от точки к точке») метод.
14	Определите по калибровочному графику содержание СА19.9 в исследуемых образцах. Если исследуемый образец предразводили (см. п.2), умножьте полученный результат на фактор разведения.

### 10. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ И НОРМЫ

**10.1.** Основываясь на результатах исследований, проведенных ООО «ХЕМА», рекомендуем пользоваться нормами, приведенными ниже. Вместе с тем, в соответствии с правилами GLP (Хорошей лабораторной практики), каждая лаборатория должна сама определить параметры нормы, характерные для обследуемой популяции.

**Примечание.** Значения концентрации СА19.9 в исследуемых образцах, находящиеся ниже границы чувствительности Набора (2 Ед/мл), а также превышающие значение верхней калибровочной пробы (240 Ед/мл) следует приводить в следующей форме: в исследуемом образце X концентрация СА19.9 ниже 2 Ед/мл или выше 240 Ед/мл.

Исследуемая группа	Единицы, Ед/мл	
	Нижний предел	Верхний предел
Здоровые доноры	-	35



## 11. ЛИТЕРАТУРА

1. Glenn, J., Steinberg, W.M., Kurtzman, S.H., et al. Evaluation of the utility of a radioimmunoassay for serum CA 19-9 level in patients before and after treatment of carcinoma of the pancreas. J. Clin. Oncol. 1988; 6:462...+8.
2. Hayakawa, T., Kondo, T., Shibata, T. et al. Sensitive serum markers for detecting pancreatic cancer. Cancer 1988; 61:1827-31.
3. Koprowski, H., Herly, M., Steplewski, Z., et al. Specific antigen in serum of patients with colon carcinoma. Science 1981; 212:53-5.
4. Malesci, A., Tommasini, M.A., Bonato, C. et al. Determination of CA19-9 antigen in serum and pancreatic juice for differential diagnosis of pancreatic adenocarcinoma from chronic pancreatitis. Gastroenterology 1987; 92:60-7.
5. Safi, F, Roscher, R., Bittner, R., et al. High sensitivity and specificity of CA 19-9 for pancreatic carcinoma in comparison to chronic pancreatitis. Serological and immunohistochemical findings. Pancreas 1987; 2:398-403.
6. Steinberg, W. The clinical utility of CA 19-9 tumor associated antigen. American J. of Gastroenterology 1990; 85:350-355.
7. Steinberg, W.M., Gelfand, R., Anderson, K.K., et al. Comparison of the sensitivity and specificity of the CA 19-9 and carcinoembryonic antigen assays in detecting cancer of the pancreas. Gastroenterology 1986; 90:343-9.
8. Takasaki, H., Uchida, E., Tempero, M.A., et al. Correlative study on expression of CA 19-9 and DUPan-2 in tumor tissue and in serum of pancreatic cancer patients. Cancer Res. 1988; 48:1435-8.
9. Tatsuta, M., Yamamura, H., Iishi H., et al. Values of CA19-9 in the serum, pure pancreatic juice and aspirated pancreatic material in the diagnosis of malignant pancreatic tumor. Cancer 1985; 56:2669-73.
10. Wang, T.H. Lin, J.W., Chen, D.S., et al. Noninvasive diagnosis of advanced pancreatic cancer by realtime ultrasonography, carcinoembryonic antigen, and carbohydrate antigen 19-9. Pancreas 1986; 1:219-23.
11. Strom BL, Maislin G, West SL, et al. Serum CEA and CA19-9: potential future diagnostic or screening tests for gallbladder cancer? Int. J. Cancer 1990; 45:821.

По вопросам, касающимся качества Набора **«СА19.9-ИФА»**, следует обращаться в ООО «ХЕМА» по адресу:  
105043, Москва, а/я 58,  
тел./факс: (495) 737-39-36, 737-00-40, 510-57-07 (многоканальный)  
электронная почта: info@xema.ru; rqc@xema.ru  
интернет: www.xema.ru; www.xema-medica.com  
Руководитель службы клиентского сервиса ООО «ХЕМА»,  
к. б. н. Д. С. Кострикин

*Instruction for use***A SOLID-PHASE ENZYME IMMUNOASSAY  
FOR THE QUANTITATIVE DETERMINATION OF CA19.9  
IN HUMAN BLOOD SERUM OR PLASMA****1. INTENDED USE**

A solid-phase enzyme immunoassay for the quantitative determination of CA19.9 in blood serum or plasma.

This kit is designed for measurement of CA19.9 in blood serum or plasma. For possibility of use with other sample types, please, refer to Application Notes (on request). The kit contains reagents sufficient for 96 determinations and allows to analyze 42 unknown samples in duplicates.

**2. SUMMARY AND EXPLANATION**

CA19.9 or sialyl-Lewisa is an antigen (an epitope) associated with tumours of the gastrointestinal tract, such as pancreatic, liver, stomach and colorectal carcinoma. Quantitative determination of CA19.9 in serum and plasma is helpful in monitoring of patients where such tumours have been diagnosed, especially together with determination of carcinoembryonic antigen (CEA, XEMA Cat# K224). Increasing levels of CA 19.9 may indicate a progression of disease or poor therapeutic response while decreasing values point to the efficacy of treatment. However, the CA19.9 values obtained should always be interpreted in the context of the results obtained by other clinical procedures.

Determination of CA19.9 is not suitable for early diagnosis of malignancies because elevated CA19.9 values may also be found in patients with pancreatitis, cystic fibrosis as well as liver cirrhosis and other severe hepatic diseases, especially accompanied by cholestasis as the antigen is excreted with bile. Some individuals lack the enzyme responsible for synthesis of sialyl-Lewisa antigen and therefore cannot respond by antigen elevation even to progressive tumour growth.

### 3. PRINCIPLE OF THE TEST

This test is based on two-site sandwich enzyme immunoassay principle. Tested specimen is placed into the microwells coated by specific murine monoclonal to human CA19.9-antibodies. Antigen from the specimen is captured by the antibodies coated onto the microwell surface. Unbound material is removed by washing procedure. Second antibodies – murine monoclonal to human CA19.9, labelled with peroxidase enzyme, are then added into the microwells. After subsequent washing procedure, the remaining enzymatic activity bound to the microwell surface is detected and quantified by addition of chromogen-substrate mixture, stop solution and photometry at 450 nm. Optical density in the microwell is directly related to the quantity of the measured analyte in the specimen.

### 4. WARNINGS AND PRECAUTIONS

**4.1.** For professional use only.

**4.2.** This kit is intended for in vitro diagnostic use only.

**4.3. INFECTION HAZARD:** There is no available test methods that can absolutely assure that Hepatitis B and C viruses, HIV-1/2, or other infectious agents are not present in the reagents of this kit. All human products, including patient samples, should be considered potentially infectious. Handling and disposal should be in accordance with the procedures defined by an appropriate national biohazard safety guidelines or regulations.

**4.4.** Avoid contact with stop solution containing 5,0%  $H_2SO_4$ . It may cause skin irritation and burns.

**4.5.** Wear disposable latex gloves when handling specimens and reagents. Microbial contamination of reagents may give false results.

**4.6.** Do not use the kit beyond the expiration date.

**4.7.** All indicated volumes have to be performed according to the protocol. Optimal test results are only obtained when using calibrated pipettes and microplate readers.

**4.8.** Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics in areas where specimens or kit reagents are handled.

**4.9.** Chemicals and prepared or used reagents have to be treated as hazardous waste according to the national biohazard safety guidelines or regulations.

**4.10.** Do not mix reagents from different lots.

**4.11.** Replace caps on reagents immediately. Do not swap caps.

**4.12.** Do not pipette reagents by mouth.

**4.13.** Specimens must not contain any AZIDE compounds – they inhibit activity of peroxidase.

**4.14.** Safety Data Sheet for this product is available upon request directly from XEMA Co., Ltd.

**4.15.** The Safety Data Sheet fit the requirements of EU Guideline 91/155 EC.

## 5.1.1. Contents of the Kit

## 5. KIT COMPONENTS

Symbol	Description	Qty	Units	Colour code	Stability of opened/diluted components
1	CA19.9 EIA strips, 8x12 wells polystyrene microwells coated with murine monoclonal to human CA19.9	1	pcs		until exp.date
2	Calibrator set, 0.8 ml each, zero calibrator C1 – 6 ml. The set contains 5 calibrators: 0; 12; 60; 120; 240 U/ml human CA19.9 diluted in phosphate buffered of preselected horses serum, casein solution, preservative – 0,1% phenol; also contains red dye	5	pcs	red (C1 – colourless)	2 months
3	Control serum (0.8 ml) dilution of preselected human serum, with high content of CA19.9 with casein solution; preservative – 0,1% phenol, colourless	1	pcs	colourless	2 months
4	Conjugate, 11 ml aqueous solution of murine monoclonal to human CA19.9 coupled with horseradish peroxidase diluted on phosphate buffered solution with casein from bovine milk and detergent (Tween-20), contains 0,1% phenol as preservative and red dye	1	pcs	red	until exp.date
5	EIA buffer, 11 ml phosphate buffered saline with casein from bovine milk and detergent (Tween-20), contains 0,1% phenol as preservative; contains blue dye	1	pcs	blue	until exp.date
6	Substrate solution, 11 ml ready-to-use single-component tetramethylbenzidine (TMB) solution.	1	pcs	colourless	until exp.date
7	BUF WASH 21X Washing solution concentrate 21x, 22 ml aqueous solution of sodium chloride and detergent (Tween 20), contains proClin300 as a preservative	1	pcs	colourless	Concentrate – until exp.date Diluted washing solution – 1 month at 2...+8 °C or 5 days at RT
8	STOP 11 ml 5,0% vol/vol solution of sulphuric acid	1	pcs	colourless	until exp.date
9	N003 Plate sealing tape	2	pcs		N/A
10	K2231 Instruction CA19.9 EIA	1	pcs		N/A
11	K223Q QC data sheet CA19.9 EIA	1	pcs		N/A

**5.2. Equipment and material required but not provided**

- Distilled or deionized water;
- Automatic or semiautomatic multichannel micropipettes, 100–250 µl, is useful but not essential;
- Calibrated micropipettes with variable volume, range volume 25–250 µl;
- Dry thermostat for +37 °C ±0.1 °C;
- Calibrated microplate photometer with 450 nm wavelength and OD measuring range 0–3.0

**5.3. Storage and stability of the Kit**

Store the whole kit at +2...+8 °C upon receipt until the expiration date.

After opening the pouch keep unused microtiter wells TIGHTLY SEALED BY ADHESIVE TAPE (INCLUDED) to minimize exposure to moisture.

**6. SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE**

This kit is intended for use with serum or plasma (ACD- or heparinized). Grossly hemolytic, lipemic, or turbid samples should be avoided.

Specimens may be stored for up to 48 hours at +2...+8 °C before testing. For a longer storage, the specimens should be frozen at -20 °C or lower. Repeated freezing/thawing should be avoided.

**7. TEST PROCEDURE****7.1. Reagent Preparation**

- All reagents (including unsealed microstrips) should be allowed to reach room temperature (+18...+25 °C) before use.
- All reagents should be mixed by gentle inversion or vortexing prior to use. Avoid foam formation.
- It is recommended to spin down shortly the tubes with calibrators on low speed centrifuge.
- Prepare washing solution from the concentrate BUF WASH 21X by 21 dilutions in distilled water.

**7.2. Procedural Note:**

It is recommended that pipetting of all calibrators and samples should be completed within 3 minutes.

**7.3. Assay flowchart**

See the example of calibration graphic in Quality Control data sheet.

**7.4.** Assay procedure

1	Put the desired number of microstrips into the frame; allocate 12 wells for the calibrators CAL 1–5 and control samples CONTROL and two wells for each unknown sample. DO NOT REMOVE ADHESIVE SEALING TAPE FROM UNUSED STRIPS.
2	If suggested analyte concentration in the sample exceeds the highest calibrator, additionally dilute this sample accordingly, using zero calibrator. Use of other buffers or reagents for sample dilution may lead to incorrect measurement.
3	Pipet 50 µl of EIA buffer into each well.
4	Pipet 50 µl of calibrators CAL 1–5, control samples CONTROL and unknown samples into the wells. Cover the wells by plate adhesive tape (included into the kit).
5	Incubate 30 minutes at 37 °C .
6	Prepare washing solution by 21x dilution of washing solution concentrate BUF WASH 21X by distilled water. Minimal quantity of washing solution should be 250 µl per well. Wash strips 3 times
7	Dispense 100 µl of CONJ HRP into the wells. Cover the wells by plate adhesive tape.
8	Incubate 30 minutes at 37 °C .
9	Wash the strips 5 times.
10	Dispense 100 µl of SUBS TMB into the wells
11	Incubate 10-20 minutes at +18...+25 °C
12	Dispense 100 µl of STOP into the wells.
13	Measure OD (optical density) at 450 nm.
14	Set photometer blank on first calibrator
15	Apply point-by-point method for data reduction.

**7.5.** Handling notes

Calibrators and control sample(s) – only one freezing/thawing cycle is allowed

## 8. QUALITY CONTROL

It is recommended to use control samples according to state and federal regulations. The use of control samples is advised to assure the day to day validity of results.

The test must be performed exactly as per the manufacturer's instructions for use. Moreover the user must strictly adhere to the rules of GLP (Good Laboratory Practice) or other applicable federal, state, and local standards and/or laws. This is especially relevant for the use of control reagents. It is important to always include, within the test procedure, a sufficient number of controls for validating the accuracy and precision of the test.

The test results are valid only if all controls are within the specified ranges and if all other test parameters are also within the given assay specifications.

## 9. CALCULATION OF RESULTS

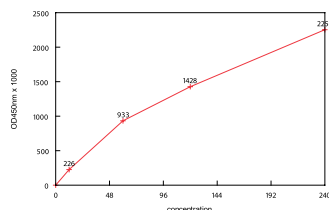
**9.1.** Calculate the mean absorbance values (OD450) for each pair of calibrators and samples.

**9.2.** Plot a calibration curve on graph paper: OD versus CA19.9 concentration.

**9.3.** Determine the corresponding concentration of CA19.9 in unknown samples from the calibration curve. Manual or computerized data reduction is applicable on this stage. Point-by-point or linear data reduction is recommended due to non-linear shape of curve.

**9.4.** Below is presented a typical example of a standard curve with the XEMA Co. Not for calculations!

Calibrators	Value	Absorbance Units (450 nm)
CAL 1	0 U/ml	0.05
CAL 2	12 U/ml	0.27
CAL 3	60 U/ml	0.98
CAL 4	120 U/ml	1.48
CAL 5	240 U/ml	2.30



## 10. EXPECTED VALUES

Therapeutical consequences should not be based on results of IVD methods alone – all available clinical and laboratory findings should be used by a physician to elaborate therapeutically measures. Each laboratory should establish its own normal range for CA19.9. Based on data obtained by XEMA, the following normal range is recommended (see below). NOTE: the patients that have received murine monoclonal antibodies for radioimaging or immunotherapy develop high titered anti-mouse antibodies (HAMA). The presence of these antibodies may cause false results in the present assay. Sera from HAMA positive patients should be treated with depleting adsorbents before assaying.

Sex, age	Units, U/ml	
	Lower limit	Upper limit
Healthy donors	-	35

## 11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

### 11.1. Analytical specificity / Cross reactivity

Analyte	Cross-reactivity, % wt/wt
CEA	<0.1
CA15.3	<0.1
CA125	<0.1

**11.2.** Analytical sensitivity. Sensitivity of the assay was assessed as being 2 U/ml.

**11.3.** Linearity. Linearity was checked by assaying dilution series of 5 samples with different CA19.9 concentrations. Linearity percentages obtained ranged within 90 to 110%.

**11.4.** Recovery. Recovery was estimated by assaying 5 mixed samples with known CA19.9 concentrations. The recovery percentages ranged from 90 to 110%.

## 12. LITERATURE

1. Glenn, J., Steinberg, W.M., Kurtzman, S.H., et al. Evaluation of the utility of a radioimmunoassay for serum CA 19-9 level in patients before and after treatment of carcinoma of the pancreas. *J. Clin. Oncol.* 1988; 6:462...+8.
2. Hayakawa, T., Kondo, T., Shibata, T. et al. Sensitive serum markers for detecting pancreatic cancer. *Cancer* 1988; 61:1827-31.
3. Koprowski, H., Herly, M., Steplewski, Z., et al. Specific antigen in serum of patients with colon carcinoma. *Science* 1981; 212:53-5.
4. Malesci, A., Tommasini, M.A., Bonato, C. et al. Determination of CA19-9 antigen in serum and pancreatic juice for differential diagnosis of pancreatic adenocarcinoma from chronic pancreatitis. *Gastroenterology* 1987; 92:60-7.
5. Safi, F, Roscher, R., Bittner, R., et al. High sensitivity and specificity of CA 19-9 for pancreatic carcinoma in comparison to chronic pancreatitis. Serological and immunohistochemical findings. *Pancreas* 1987; 2:398-403.
6. Steinberg, W. The clinical utility of CA 19-9 tumor associated antigen. *American J. of Gastroenterology* 1990; 85:350-355.
7. Steinberg, W.M., Gelfand, R., Anderson, K.K., et al. Comparison of the sensitivity and specificity of the CA 19-9 and carcinoembryonic antigen assays in detecting cancer of the pancreas. *Gastroenterology* 1986; 90:343-9.
8. Takasaki, H., Uchida, E., Tempero, M.A., et al. Correlative study on expression of CA 19-9 and DUPan-2 in tumor tissue and in serum of pancreatic cancer patients. *Cancer Res.* 1988; 48:1435-8.
9. Tatsuta, M., Yamamura, H., Iishi H., et al. Values of CA19-9 in the serum, pure pancreatic juice and aspirated pancreatic material in the diagnosis of malignant pancreatic tumor. *Cancer* 1985; 56:2669-73.
10. Wang, T.H. Lin, J.W., Chen, D.S., et al. Noninvasive diagnosis of advanced pancreatic cancer by realtime ultrasonography, carcinoembryonic antigen, and carbohydrate antigen 19-9. *Pancreas* 1986; 1:219-23.
11. Strom BL, Maislin G, West SL, et al. Serum CEA and CA19-9: potential future diagnostic or screening tests for gallbladder cancer? *Int. J. Cancer* 1990; 45:821.