

# НАБІР РЕАГЕНТІВ ОНКОМАРКЕР CA 72-4 ELISA

## TM-CA 72-4 ELISA

Кат. №: EIA-5071

Дата випуску інструкції: 2015/03  
Версія 8.0



Основою при проведенні аналізу є оригінал інструкції англійською мовою, вкладеної в набір. Номер і дата версії оригіналу і перекладу інструкції повинні збігатися.

### 1 ВСТУП

#### 1.1 Найменування і призначення

Набір **DRG TM-CA 72-4 ELISA** - це ферментний імуноаналіз для кількісного *in vitro* визначення CA 72-4 (TAG-72) у сироватці та плазмі.

#### 1.2 Короткий опис та пояснення

CA 72-4 (Раковий антиген 72-4) спочатку був описаний як детермінант антигену, відомий як В 72,3, мишаче моноклональне антитіло, підняте проти мембранного екстракту метастазів карциноми молочної залози (1). CA 72-4 був ідентифікований як муциноподібний глікопротеїновий комплекс 1 МДа, названий TAG-72 (антиген 72, асоційований з пухлиною) (2). Молекулярна маса білка TAG-72 становить 48 кД. Підвищені рівні CA 72-4 у сироватці та плазмі свідчать про різні злоякісні захворювання, включаючи карциноми підшлункової залози, шлунку, жовчного міхура, товстої кишки, молочної залози, яєчників, шийки матки та ендометрію (3). Найвища діагностична чутливість виявляється при карциномах шлунково-кишкового тракту та яєчників. Хоча деякі захворювання, такі як ревматичні захворювання або кісти яєчників, також можуть призвести до підвищення рівня CA 72-4. Клінічні дослідження продемонстрували діагностичні особливості понад 95% щодо злоякісних захворювань шлунково-кишкового тракту та яєчників (4). Існує хороша кореляція між рівнями CA 72-4 та стадією та розміром пухлини (3). CA 72-4 є маркером вибору для терапевтичного моніторингу та подальшого догляду за хворими на рак шлунково-кишкового тракту. Відповідними другими маркерами є приблизно СА 19-9 або КЕА. Крім того, CA 72-4 використовувався як незалежний маркер для терапевтичного моніторингу та подальшого догляду за хворими на рак яєчників, зокрема у пацієнтів з негативним СА 125 (3, 5).

#### 2 ПРИНЦИП ТЕСТУ\*

Даний аналіз є імуоферментним аналізом (ІФА), заснованим на принципі сандвіча.

Мікротитрові лунки покриті моноклональним антитілом миші (Клон СС49) до антигенних сайтів на молекулі CA 72-4. Аліквота зразка пацієнта, яка містить ендогенний CA 72-4 інкубується в лунці з нанесеним ферментним кон'югатом, який є анти-CA 72-4 антитілом (Клон В72,3), кон'югованим з пероксидазою хрому. Після інкубації незв'язаний кон'югат вимивається. Кількість зв'язаної пероксидази пропорційна концентрації CA 72-4 у зразку. Після додавання розчину субстрату інтенсивність кольору, що розвивається, пропорційна концентрації CA 72-4 у зразку пацієнта.

\* Антитіла, які використовуються в даному аналізі запатентовані:

1. U.S. Patent No.5,512,443, issued April 4, 1996 entitled "Second generation monoclonal antibodies having binding specificity to TAG-72 and human carcinomas and methods for employing the same" (HHS Reference No. E-160-1987/0-US-18)
2. Canadian Patent No. 1339980, issued August 4, 1998 entitled "Second generation monoclonal antibodies having binding specificity to TAG-72 and human carcinomas and methods for employing the same" (HHS Reference No. E-160-1987/0-CA-04)
3. U.S. Patent No. 4,522,918, issued June 11, 1985 (now expired) entitled "Process for Producing Monoclonal (HHS Reference No. E-185-1981/0-US-01)

#### 3 ЗАСТЕРЕЖЕННЯ І ПОПЕРЕДЖЕННЯ

1. Тільки для діагностичного використання "*in-vitro*". Для використання тільки кваліфікованим персоналом.

2. Всі реагенти цього тестового набору, які містять людську сироватку або плазму, були протестовані та підтверджені, що є негативними на ВІЛ I/II, HBsAg та HCV за затвердженими FDA процедурами. Однак, усі реагенти слід розглядати як потенційну біологічну небезпеку під час використання та утилізації.
3. Перед початком аналізу повністю та уважно прочитати інструкцію. Використовувати дійсну версію інструкції. Впевніться, що все зрозуміло.
4. Мікропланшет складається з відривних смужок. Невикористані лунки зберігати при 2-8 °C запованими, та використовувати рамку, яка постачається.
5. Піпетування зрізів та реагентів проводити як можна швидше та з однаковими інтервалами для кожного кроку.
6. Використовувати пробірки тільки для одного реагенту. Це особливо відноситься до пробірок з субстратами. Використання резервуару для дозування розчину субстрату, який раніше був використаний для розчину кон'югату, може призвести до забарвлення розчину. Не виливайте реагенти назад у флакон, оскільки може відбутися забруднення.
7. Змішуйте вміст лунок мікропланшетів повністю, щоб забезпечити хороші результати тесту. Не використовуйте повторно лунки.
8. Не дозволяйте лункам висихати під час аналізу; додавати реагенти негайно після закінчення полоскання.
9. Дозволити реагентам досягти кімнатної температури (21-26 °C) до початку тесту. Температура може вплинути на значення оптичної щільності. Однак, на значення зразків пацієнтів це не впливає.
10. Не піпетуйте реагенти ротом і уникайте контакту реагентів і зразків з шкірою і слизовими.
11. Не їжте, не пийте і не куріть в приміщеннях, де використовуєте зразки чи реагенти.
12. Одягайте рукавички при роботі зі зразками і реагентами. Мікробіологічне забруднення реагентів чи зразків може дати помилкові результати.
13. Використання набору повинно проводитись згідно з вимогами по техніці безпеки.
14. Не використовуйте реагенти після закінчення терміну придатності.
15. Необхідно дотримуватись об'ємів, вказаних в інструкції. Оптимальні результати будуть отримані при використанні каліброваних піпеток та мікротитрових планшетних зчитувачів.
16. Не змішуйте реагенти різних серій і різних наборів, оскільки ці набори могли транспортуватись чи зберігатись при різних умовах.
17. Уникати контакту зі *Стоп-розчином*, що містить 0.5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Це може викликати подразнення шкіри та опіки.
18. Деякі реагенти містять Proclin 300, BND і/або MIT в якості консервантів. При попаданні в очі або на шкіру, негайно промийте водою.
19. Субстрат ТМВ має подразнюючу дію на шкіру та слизову. У разі можливого контакту промийте очі великою кількістю води, а шкіру великою кількістю води з милом. Вимийте забруднені предмети перед повторним використанням. При вдиханні виведіть людину на відкрите повітря.
20. Хімічні речовини і приготовлені чи використані реагенти повинні бути оброблені відповідно до вимог по техніці безпеки.
21. Щодо інформації відносно небезпечних речовин дивіться Паспорт Безпеки Матеріалів. Паспорт Безпеки Матеріалів доступний за запитом безпосередньо від компанії DRG.

#### 4 РЕАГЕНТИ

##### 4.1 Реагенти, які постачаються

1. **Мікротитраційні лунки:** 12 смужок по 8 лунок, покритих моноклональними анти-CA 72-4 антитілами.
2. **Стандарт (Стандарти 0-4):** 5 флаконів, 0,5 мл, готові до використання; Концентрації: 0-3-20-50-100 О/мл. Містить не-ртутний консервант.
3. **Контроль Низький та Високий:** 2 флакони, 0,5 мл кожен, ліофілізовані; див. «Підготовка реагентів»  
Значення контролю і діапазони дивіться на етикетці флакона або паспорті якості.  
Містить не-ртутний консервант.
4. **Ділюент зразка,** 1 флакон 3 мл, готовий до використання.  
Містить не-ртутний консервант.
5. **Ферментний кон'югат 10X концентрат,** 1 флакон, 1,4 мл, готовий до використання,  
Анти-CA72-4 антитіло, кон'юговане з пероксидазою хрому.  
Див. «Підготовка реагентів»

- Містить не-ртутний консервант.
6. **Кон'югатний ділюент**, 1 флакон, 14 мл, готовий до використання  
Містить не ртутний консервант.
  7. **Розчин субстрату**, 1 флакон, 14 мл, готовий до використання.  
Тетраметилбензидин (ТМБ)
  8. **Стоп-розчин**, 1 флакон, 14 мл, готовий до використання,  
Містить 0.5 М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,  
Уникайте контакту зі стоп-розчином. Це може привести до пошкоджень шкіри та опіків.
  9. **Промивний Розчин**, 1 флакон, 30 мл (40X концентрат).  
Див. «Приготування реагентів»

**Примітка:** Додатково *Нульовий Стандарт* для розведення зразків доступний за запитом.

#### 4.2 Матеріали, що не постачаються, але необхідні

- Мікротитровий відкалібрований зчитувач (450 нм±10 нм).
- Відкалібровані регульовані точні мікропіпетки.
- Промокальний папір.
- Дистильована або деіонізована вода.
- Таймер.
- Графічний папір або ПЗ для обробки даних.

#### 4.3 Умови зберігання

За умови зберігання реагентів закритими при температурі 2-8 °С їхня реактивність буде збережена до дати закінчення терміну придатності. Не використовуйте після закінчення цієї дати.  
Відкриті реагенти та мікротитрові лунки слід зберігати при температурі 2-8 °С. Після відкриття мішечка із фольги треба знову його герметично закрити. Відкриті набори зберігають активність протягом двох місяців за умови зберігання як вказано вище.

#### 4.4 Підготовка реагентів

Перед використанням доведіть всі реагенти та потрібну кількість стрипів до кімнатної температури.

#### Контроль

Розчиніть ліофілізований вміст з 0.5 мл дистильованої води і дайте настоятися мінімум 10 хвилин.

Перед використанням перемішайте контроль кілька разів.

**Примітка:** Розведені контролю слід розподілити і зберігати при температурі -20 °С.

#### Промивний розчин

Додайте деіонізовану воду до 40x концентрованого Промивного Розчину. Розведіть 30 мл концентрованого Промивного Розчину з 1170 мл дистильованої води до об'єму 1200 мл.

*Розведений Промивний Розчин стабільний впродовж 2 тижнів при КТ.*

#### Ферментний кон'югат

Розведіть концентрат Ферментного кон'югату у співвідношенні 1:10 Розчинником для кон'югатів.

*Стабільність приготованого Ферменту-Кон'югату: 1 тиждень при температурі від 2 °С до 8 °С в герметичній ємності.*

#### Приклад:

Якщо використовується уся пластина, розведіть 1.2 мл Ферментного кон'югату 10.8 мл Кон'югатного розчинника, щоб отримати загальний об'єм 12 мл.

Якщо одразу не використовувати всю пластину, приготуйте необхідну кількість Ферментного кон'югату, змішавши 100 мкл Ферментного кон'югату 10X конц. з 0.9 мл Кон'югатного розчинника на смужку (див. таблицю нижче):

К-сть смужок	Ферментний кон'югат 10X конц. (мкл)	Розчинник кон'югату (мл)
1	100	0.9
2	200	1.8
3	300	2.7
4	400	3.6
5	500	4.5
6	600	5.4
7	700	6.3
8	800	7.2
9	900	8.1

10	1000	9.0
11	1100	9.9
12	1200	10.8

#### 4.5 Утилізація набору

Утилізацію набору слід здійснювати відповідно до вимог місцевого регулювання. Спеціальна інформація щодо цих продуктів вказана в Паспорті Безпеки.

#### 4.6 Пошкоджені набори

При пошкодженні набору чи його компонентів необхідно повідомити в письмовій формі виробника впродовж одного тижня після отримання виробу. Сильно пошкоджені окремі компоненти не слід використовувати. Вони повинні зберігатись до вирішення проблеми. Після цього їх слід утилізувати відповідно до вимог місцевого регулювання.

#### 5 ЗАБІР І ПІДГОТОВКА ЗРАЗКІВ

У цьому дослідженні можна використовувати сироватку або плазму (ЕДТА, гепаринову або цитратну плазму).

Не використовувати гемолітичні, іктеричні чи ліпемічні зразки.

*Увага:* зразки, які містять азид натрію, не можна використовувати в аналізі.

#### 5.1 Забір зразків

##### Сироватка:

Проведіть забір крові шляхом венепункції (напр. Sarstedt Monovette для сироватки); дайте крові згорнутись і відділіть сироватку, центрифугуючи при кімнатній температурі. Не центрифугуйте до повного згортання крові. Пацієнтам, які проходять терапію антикоагулянтами, може знадобитись більше часу для згортання крові.

##### Плазма:

Цільну кров слід збирати в центрифужні пробірки, що містять антикоагулянти (наприклад, Sarstedt Monovette з відповідним препаратом для плазми) та центрифугувати відразу ж після збору.

#### 5.2 Підготовка та зберігання зразків

Зразки повинні бути закриті і в такому вигляді можуть зберігатись при 2-8 °С до 5 днів перед дослідженням.

Для довшого зберігання (до 12 місяців) зразки повинні бути заморожені до -20 °С. Після відтавання зразки необхідно кілька разів перевернути перед дослідженням.

#### 5.3 Розведення зразків

Якщо при початковому аналізі зразок показує значення вище за найвищий стандарт, зразки можуть бути розведені Розчинником для зразків і проаналізовані повторно як це описано у Процедурі аналізу.

Для вирахування концентрації необхідно брати до уваги коефіцієнт розведення.

##### Приклад:

- a) Розведення 1:10: 10 мкл сироватки + 90 мкл Розчинника для зразка (ретельно змішайте)
- b) Розведення 1:100: 10 мкл розведення a) 1:10 + 90 мкл Розчинника для зразка (ретельно змішайте).

#### 6 ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

##### 6.1 Загальні зауваження

- Доведіть всі реагенти до кімнатної температури перед початком дослідження. Всі реагенти змішуйте без піноутворення.
- Після початку дослідження всі кроки повинні виконуватись без затримки.
- Використовуйте нові насадки для піпеток перед кожним використанням, щоб уникнути перехресного забруднення.
- Абсорбція залежить від температури і часу інкубації. Тому, перед початком дослідження необхідно прослідкувати, щоб все було готово: ковпачки зняті, реагенти приготовлені, лунки закріплені на тримачі і таке інше. Це дозволить проводити всі кроки за однакові інтервали часу.
- За загальним правилом ферментативна реакція прямо пропорційна часу і температурі інкубації.

##### 6.2 Процедура аналізу

Кожна процедура повинна включати калібрувальну криву.

1. Закріпіть необхідну кількість мікротитраційних лунок у штативі.

- Додайте по **20 мкл** кожного **Стандарту, Контролю та зразків** у відповідні лунки кожен раз з новою насадкою.
- Додайте по **100 мкл** свіжо розведеного **Ферментного Кон'югату** в кожну лунку.  
Ретельно змішайте протягом 10 секунд. Важливо на цьому етапі добре перемішати.
- Інкубуйте **120 хвилин** при кімнатній температурі.
- Вилийте різко вміст лунок.
- Промийте лунки **5 разів** розведеним **Промивним Розчином** (400 мкл/лунку). Переверніть лунку на абсорбуючий папір для видалення залишків.  
**Важлива примітка:**  
Чутливість і точність цього аналізу залежать від правильного виконання процедури промивання!
- Додайте **100 мкл Розчину Субстрату** в кожну лунку.
- Інкубуйте **30 хвилин** при кімнатній температурі.
- Зупиніть ферментативну реакцію, додавши **100 мкл Стоп-Розчину** в кожну лунку.
- Визначте абсорбцію (ОШ) кожної лунки при **450±10** нм за допомогою мікротитрового зчитувача. Рекомендується проводити зчитування лунок **впродовж 10 хвилин** після додавання **Стоп-Розчину**.

### 6.3 Обчислення результатів

- Визначте значення середньої абсорбції для кожного набору стандартів, зразків і контролів.
- Ручний метод: за допомогою лінійно-графічного паперу побудуйте стандартну криву, відкладаючи середнє значення абсорбції для кожного стандарту на осі У, а концентрації - на осі Х.
- Використовуючи значення середньої абсорбції для кожного зразка, визначте відповідну концентрацію зі стандартної кривої.
- Автоматичний метод: результати в інструкції з використання автоматично за допомогою кривої 4 PL (4 Parameter Rodbard або 4 Parameter Marquardt є кращими методами.)
- Концентрація зразків може зчитуватись з стандартної кривої. Зразки з концентрацією вище, ніж концентрація найвищого стандарту необхідно розбавити або вважати як > 100 О/мл. При обчисленні концентрації цей фактор розбавлення необхідно враховувати.

#### 6.3.1 Приклад типової стандартної кривої

Наступні дані наведені тільки для демонстрації і **не можуть** використовуватися для отримання результатів під час аналізу.

Стандарти	Оптичні одиниці (450 нм)
Стандарт 0 (0 О/мл)	0.08
Стандарт 1 (3 О/мл)	0.19
Стандарт 2 (20 О/мл)	0.59
Стандарт 3 (50 О/мл)	1.16
Стандарт 4 (100 О/мл)	2.02

### 7 ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ НОРМИ

Рекомендується, щоб кожна лабораторія встановлювала власні нормальні і патологічні значення.

У дослідженні, проведеному на зразках нормальних здорових дорослих пацієнтів, використовуючи набір DRG TM-CA 72-4 ІФА, були отримані наступні дані.

Населення	К-сть	Медіана	Середнє	5 <sup>я</sup> -95 <sup>я</sup> процентиль
Здорові люди	65	0.72 О/мл	0.86 О/мл	0 О/мл – 2.68 О/мл

Результати добре узгоджуються з опублікованими cut-off від 4 до 6 О/мл (Довідка/Література 3-6).

Результати аналізу не можуть бути єдиною причиною для терапевтичного висновку. Результат повинен корелювати з іншими клінічними дослідженнями і діагностичними тестами.

### 8 КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Належна лабораторна практика вимагає, щоб контролю запускалися з кожною калібрувальною кривою. Для встановлення середніх значень та прийнятних діапазонів для забезпечення належної роботи слід аналізувати статистично значну кількість контролів. Рекомендується, використовувати контролю відповідно до державних і місцевих правил. Використання контролю дає можливість щоденної оцінки достовірності результатів. Використовуйте контролю як нормального рівня так і патологічного.

Контролі і відповідні результати QC лабораторії вказані в QC сертифікаті, що постачається з набором. Значення та діапазони, вказані в даному сертифікаті, відповідають лоту набору і повинні використовуватись для порівняння результатів.

Також, рекомендується використовувати національні і міжнародні програми оцінки якості для підтвердження достовірності результатів.

Використовуйте відповідний статистичний метод для аналізу величин контролю. Якщо результати аналізу не попадають у встановлені границі матеріалів контролю, результати є не достовірними.

В такому випадку, перевірте наступні дані: пристрої піпетування і вимірювання часу; фотометр; дати придатності реагентів, умови зберігання і інкубації, методи аспірації і промивання.

Якщо не знайдено помилки, зверніться до Вашого постачальника.

### 9 РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

#### 9.1 Динамічний діапазон аналізу

Діапазон аналізу знаходиться між 0.79 - 100 О/мл.

#### 9.2 Специфічність антитіл (перехресна реактивність)

Ніякої перехресної реактивності зі спорідненими білками не спостерігалось.

#### 9.3 Чутливість

Аналітична чутливість визначена шляхом додавання 2 стандартних відхилень до середнього значення 20 повторних аналізів *стандарту 0* і склала 0.79 О/мл.

#### 9.4 Відтворюваність

##### 9.4.1 Варіативність в аналізі

Зразок	К-сть	Середнє, О/мл	КВ, %
1	20	1.4	<b>2.2</b>
2	20	1.6	<b>1.6</b>
3	20	1.6	<b>2.4</b>

##### 9.4.2 Варіативність між аналізами

Зразок	К-сть	Середнє, О/мл	КВ, %
1	40	10.1	<b>4.4</b>
2	40	18.9	<b>4.8</b>
3	40	29.6	<b>4.2</b>

#### 9.5 Відновлення

Зразки були насичені шляхом додавання розчинів СА 72-4 з відомими концентраціями у співвідношенні 1:1.

Очікувані значення розраховували додаванням половини значень, визначених для нерозведених зразків, і половини значень відомих розчинів. Відновлення у % розраховується шляхом множення співвідношення виміряних та очікуваних величин на 100.

	Зразок 1	Зразок 2	Зразок 3
Концентрація (О/мл)	3.6	8.1	9.4
Середнє відновлення(%)	99.3	98.2	98.8
Діапазон відновлення (%)	Від	96.6	92.5
	до	102.1	105.8
		106.8	106.8

#### 9.6 Лінійність

	Зразок 1	Зразок 2	Зразок 3
Концентрація (О/мл)	51.0	94.0	10.0
Середнє відновлення(%)	91.2	108.5	97.8
Діапазон відновлення (%)	Від	86.3	106.4
	до	99.6	112.3
		112.0	112.0

### 10 ОБМЕЖЕННЯ ПРОЦЕДУРИ

Надійні та відтворювані результати будуть отримані коли процедура дослідження проводиться з повним розумінням цієї інструкції, з дотриманням вимог професійної лабораторної практики.

Будь-яке неправильне поводження зі зразками або зміна цього дослідження може вплинути на результати.

#### 10.1 Інтерферуючі речовини

Не впливають на результати гемоглобін (до 4 мг/мл), білірубін (до 0.5 мг/мл) і тригліцериди (до 7.5 мг/мл).

Набір містить реагенти для мінімізації інтерференції НАМА та гетерофільних антитіл. Проте, надзвичайно високі титри НАМА або гетерофільні антитіла можуть заважати результатам тестів.

## 10.2 Вплив лікарських засобів

На сьогодні не відомо жодних речовин (лікарських засобів), що впливають на вимірювання СА72-4 в зразку.

## 10.3 «Хук-ефект» високої дози

Не спостерігалось хук-ефекту в цьому дослідженні до 6.400 О/мл СА 72-4.

## 11 ПРАВОВІ АСПЕКТИ

### 11.1 Достовірність результатів

Дослідження необхідно проводити точно у відповідності з інструкцією виробника. Також користувачу необхідно слідувати правилам техніки безпеки, національним стандартам. Особливо це стосується використання контрольних реагентів.

Результати дослідження вважаються достовірними, якщо контролю знаходяться в указаних межах і якщо інші параметри дослідження також відповідають характеристикам процедури.

### 11.2 Терапевтичні висновки

Терапевтичні висновки не повинні базуватись на результатах одного дослідження і повинні враховувати всю клінічну картину пацієнта.

Тільки якщо лабораторні дані повністю збігаються з клінічною картиною, можна встановлювати терапевтичні висновки для пацієнта.

### 11.3 Відповідальність

Будь-які зміни дослідження чи зміна компонентів різних лотів може негативно відобразитись на результатах дослідження. Такі зміни та модифікації не можуть бути приводом для заміни набору.

Будь-які пошкодження набору при транспортуванні не відносяться до відповідальності виробника.



#### ВИРОБНИК

DRG Instrumente GmbH  
вул. Фраунберг 18, 35039  
м. Марбург, Німеччина  
Тел: +49(0)64 21/170 00  
Факс: +49(0)64 21/17 00 50  
[www.drq-diagnostics.de](http://www.drq-diagnostics.de)  
e-mail: [drq@drq-diagnostics.de](mailto:drq@drq-diagnostics.de)



#### УПОВНОВАЖЕНИЙ ПРЕДСТАВНИК

ТОВ «ДІАМЕБ ТРЕЙД»  
вул. Симона Петлюри, 25  
м. Івано-Франківськ, 76014  
тел.: +38 (0342) 775 122  
факс: +38 (0342) 775 123  
e-mail: [info@diameb.ua](mailto:info@diameb.ua)  
[www.diameb.ua](http://www.diameb.ua)

