

## 華宇-腫瘤標記 DR-70 酵素免疫分析診斷試劑

### (體外診斷試劑)

#### 測定人體血清中 DR-70 抗原的檢測試劑 (REF: DR2101)

##### 效能：

DR-70 檢測試劑可用於測定病人血清中腫瘤標記 (DR-70) 的濃度。DR-70 檢測試劑可作為癌症的輔助檢測，不可單獨作為癌症篩檢、診斷或是預後的決定。

##### 介紹：

已有臨床試驗評估發現，利用 DR-70 檢測肺癌，可正確辨識出 66% 的所有肺癌及 91.8% 正常對照組。此檢測辨識小細胞或非小細胞肺癌之能力相當，且檢測結果不受檢測者喝酒、抽煙、性別或罹患慢性阻塞性肺疾病影響【1】。此外 DR-70 之檢測值也被發現與癌症期數相關。爾後的臨床研究中，針對 136 位癌症病人與 277 位健康人，以 DR-70 免疫分析進行 13 種癌症檢測。在 95% 的特異性下，其對於肺癌、胃癌、乳癌、直腸癌之敏感度分別為 87.8%，92.6%，65.2% 及 66.7%，整體而言 DR-70 對癌症的特異性及敏感度分別為 95.0% 及 83.8%。陽性預測值 (Positive predictive values) 與陰性預測值 (Negative predictive values) 分別為 89.1% 及 92.3%【2】。綜上，有證據顯示，當體內有惡性組織存在時，血清內 DR-70 的量會增加，帶有良性腫瘤病人則未進行評估。

##### 檢測原理：

DR-70 是利用可移動八連排組合成 96 微孔型之酵素連結免疫分析法。其微孔中塗上經親和性純化的兔子抗 DR-70 多株抗體。固定在微孔上的抗體會捕捉在稀釋血清(1:200)內的 DR-70，經清洗步驟後，加入與辣根過氧化氫酶 (horseradish peroxidase) 共軛的抗 DR-70 抗體於微孔中，如有抗原 (DR-70) 存在，則此抗 DR-70 過氧化氫酶複合物將與被捕捉的腫瘤標記及固定抗體形成免疫三明治。

二次清洗後，將酵素基質 (TMB) 加入微孔中，再使用 0.1N 的鹽酸終止反應後，用盤式分析儀取波長 450 nm 之數值，其所形成的顏色強度與血清中 DR-70 的總量成正比。檢測值可利用本套組提供之校正試劑做出的標準曲線求內插得知。

##### DR-70 測試套組成份：

- 塗佈 DR-70 抗體的微孔 (96 孔)
- 酵素抗體共軛劑：1 瓶 (12 mL)
- 低控制組：1 瓶 (500  $\mu$ L)
- 高控制組：1 瓶 (500  $\mu$ L)
- DR-70 校正試劑：5 瓶 (每瓶含 500  $\mu$ L，其濃度分別為 0, 0.625, 2.5, 5.0 和 10.0  $\mu$ g/mL)
- 5 倍濃縮的稀釋緩衝液：1 瓶 (40 mL)
- 20 倍濃縮的清洗緩衝液：1 瓶 (50 mL)
- TMB 基質：1 瓶 (12 mL)
- 停止液：1 瓶 (12 mL)
- 稀釋/轉換盤 (未經塗佈之 96 微孔盤)

##### 警告與注意事項：

DR-70 分析試劑內含人類血液成份。經檢測對 B 型肝炎表面抗原 (hepatitis B surface antigen) 與人類免疫缺陷病毒抗原 (HIV-1 p24 core antigen) 呈陰性反應。因目前沒有一個已知的檢測可保證從人類血液取得的產品不具傳染力，因此，處理所有人類血液衍生物時必須視為他們含有傳染物質，處理這些試劑及人類樣本時須建立好的實驗室工作程序。

- 不可用嘴吸取液體。
- 測試時須全程穿著防護衣、拋棄式手套及護目鏡。
- 所有溢生物，必須迅速擦拭乾淨，任何遭血清污染的表面也必須使用適當的消毒劑消毒，如體積百分濃度為 10% 的次氯酸鈉 (sodium hypochlorite)。
- 此試劑含有 50  $\mu$ g/mL 的 gentamicin 及 2.5  $\mu$ g/mL 的 amphotericin B 作為防腐劑，必須小心操作及處理。
- 不可使用過期試劑。
- 殘餘試劑必須拋棄，不可混在一起再使用。
- TMB 基質在儲存或使用期間應避免暴露在強光下。

##### 保存方法：

本試劑套組儲存條件為 2-8°C，若儲存及處理時皆按規定執行，則試劑可保持穩定至保存期限(有效期間 12 個月)。

##### 設備需求：

試劑套組內的每項試劑含量足夠以手動進行分析，或是在自動設備上以八連排或 96 微孔盤形式進行。如果測試採用手動方式，則須下列儀器：

- 可吸取 100  $\mu$ L 的八爪微量吸管 (micropipettor)
- 可吸取 10  $\mu$ L 的微量吸管 (micropipettor)
- 可吸取 100-1000  $\mu$ L 的可調式微量吸管 (micropipettor)
- 試管震盪器 (vortex mixer)
- 盤式清洗器 (plate washer) (非必須)
- 可動態讀取 450 nm 波長的盤式分析儀 (plate reader)
- 可操作盤式分析儀、進行資料處理和列印的電腦。(非必須)

- 盤式密封蓋 (plate sealers) (非必須)
- 溶液槽 (solution basins)

##### 試劑製備：

###### 稀釋緩衝液

將 5 倍濃縮稀釋緩衝液加入 160 mL 之去離子水或蒸餾水稀釋。

###### 校正組與控制組

控制組及校正組在測試前須先用稀釋緩衝液以 1:200 比率稀釋之，處理程序如下：

將欲裝兩個控制組及五個校正組的每一隻 12x75 mm 玻璃管貼上標籤，分別加入 2 mL 之稀釋緩衝液，以試管震盪器搖勻控制組及校正組後，取 10  $\mu$ L 放入對應之管中。

###### 清洗緩衝液

將 20 倍濃縮清洗緩衝液加入 950 mL 之去離子水或蒸餾水稀釋。

##### 檢體收集：

收集的血液須在室溫下凝結約 30 分鐘，並使用標準的臨床離心機分離血清。血清轉移至儲存瓶中，並保存在 4°C。若樣本在收集超過 24 小時才檢測，則必須將其冷藏在 -20°C。

最好在病人早上未進食前抽取血液，將血脂濃度降至最低。

- 不可使用血漿。血液檢體必須收集在血清分離管中。DR-70 檢測只接受血清檢體。
- 不可檢測極度溶血或高血脂的檢體。
- 血清溶解後，必須徹底混合以確保測試結果的一致性。
- 運送期間，檢體之包裝與標示必須依照聯邦及國際規定辦理。

##### 檢體製備：

只使用血清檢體，並依下列方式將血清檢體以 1:200 稀釋：

- 標示每個裝血清檢體之 12x75 mm 玻璃管。
- 取 2 mL 之稀釋緩衝液注入每一管中。
- 以試管震盪器搖勻血清樣本，然後取 10  $\mu$ L 放入相對應管中。

##### 注意事項：

- 所有檢體及校正組必須進行二重複。
- 所有試劑及血清在測試前須先回溫 (22-28°C)。
- 不使用過期試劑。
- 取出試驗所需數量之八連排，並置於微量盤架上。
- 八連排必須放在裝有乾燥劑的密封袋中，並儲存在 2-8°C。
- 不可將不同批號套組的試劑混合使用。

##### 檢測準備：

以試管震盪器搖勻每一支已被稀釋之控制組(高、低)、校正組及病人血清的試管，分別取 200  $\mu$ L 注入稀釋盤的兩個孔中，如此每一樣本將有二重複(兩相鄰孔)，例如，取稀釋的校正組 A (稀釋比率為 1:200) 200  $\mu$ L 注入稀釋盤中的 A1 及 B1 孔中，稀釋的校正組 B 200  $\mu$ L 注入 C1 及 D1 孔中，稀釋的校正組 C 200  $\mu$ L 注入 E1 及 F1 孔中，稀釋的校正組 D 200  $\mu$ L 注入 G1 及 H1，稀釋的校正組 E 200  $\mu$ L 注入 A2 及 B2 孔中，再以相同方式處理兩個控制組(高、低)及每一個血清檢體。

##### 手動方式：

1. 使用 8 爪微量吸管，從稀釋盤中每一孔取 100  $\mu$ L 稀釋血清，注入塗有 DR-70 抗體的盤中。
2. 在室溫下 (22-28°C) 靜置反應 30 分鐘。
3. 每孔用 300  $\mu$ L 的清洗緩衝液清洗六次後，將盤子倒置在乾淨的吸水紙上吸乾。
4. 使用 8 爪微量吸管，取 100  $\mu$ L 的抗體酵素共軛劑，加入每一孔中，在室溫下 (22-28°C) 靜置反應 30 分鐘。
5. 依上述步驟 3 清洗。
6. 使用 8 爪微量吸管，取 100  $\mu$ L TMB 基質試劑注入每一孔中。
7. 用錫箔紙將盤覆蓋，在室溫下 (22-28°C) 避光反應 15 分鐘。
8. 使用 8 爪微量吸管，取 100  $\mu$ L 停止液注入每一孔中，終止反應。
9. 讀取波長 450 nm 之測試結果。

##### 自動方式：

1. 將校正液、控制液、及血清從稀釋轉移盤移至塗佈 DR-70 抗體的盤中。註：每孔轉移 100  $\mu$ L 至 DR-70 抗體盤，如同稀釋轉移盤上的順序。
2. 在室溫下 (22-28°C) 靜置反應 30 分鐘。
3. 每孔用 300  $\mu$ L 的清洗緩衝液清洗六次，將過多液體吸出至完全乾燥。
4. 取 100  $\mu$ L 的抗體酵素共軛劑，加入每一孔中，在室溫下 (22-28°C) 靜置反應 30 分鐘。
5. 依上述步驟 3 清洗。
6. 取 100  $\mu$ L TMB 基質試劑注入每孔中。
7. 在室溫下 (22-28°C) 避光靜置反應 15 分鐘。
8. 加入 100  $\mu$ L 停止液於每孔中，使反應停止。
9. 讀取波長 450 nm 之測試結果。

##### 計算：

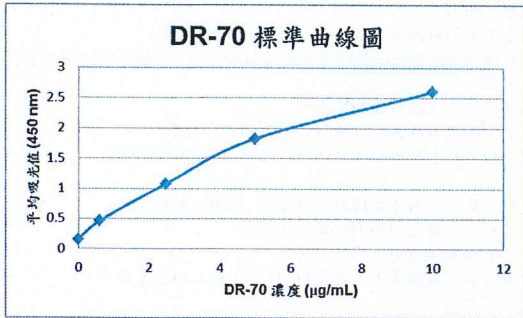
- 以校正組濃度 ( $\mu$ g/mL) 為 X 軸，吸光值為 Y 軸，繪出標準曲線。將待測檢體平均吸光值以內插法帶入標準曲線求出檢測值。

- 假如使用資料處理軟體，可使用線性曲線、二次或四次參數演算法去定義標準曲線，再利用任何可執行內插的軟體帶入標準曲線求出檢測值。
- 假如血清濃度值大於 10 µg/mL，則此樣本應以稀釋緩衝液再稀釋後，重新測試。其測試結果必須回乘稀釋倍數。

**實例：**

**典型 DR-70 標準曲線圖**

校正品	值 (µg/mL)	編號	吸光值	平均值	標準偏差	% 變異係數
A	0.000	A1	0.166	0.158	0.011	7.2
		B1	0.150			
B	0.625	C1	0.472	0.465	0.01	2.1
		D1	0.458			
C	2.5	E1	1.080	1.079	0.002	0.2
		F1	1.077			
D	5.0	G1	1.823	1.830	0.01	0.5
		H1	1.837			
E	10.0	A2	2.631	2.607	0.033	1.3
		B2	2.584			



**品質管制：**

DR-70 控制值必須落在下列的濃度範圍內：

- 低濃度範圍：0.14-0.51 µg/mL
- 高濃度範圍：1.4-5.2 µg/mL

當控制值超出指定範圍時，則此測試結果被視為無效，必須重測。

**說明：**

基於族群研究上，建議每個實驗室建立自己的正常與不正常範圍。依據 Rucker 等人的研究，在二個實驗室分別對健康對照組和大腸直腸癌檢體作研究，在 site 1 和 site 2 顯示出臨界值設定於 1 µg/mL 可以得到最佳特異性和敏感性組合(見表一)。因此建立的臨界值為 1 µg/mL，超過 1 µg/mL 則被視為陽性。【3】

	Site 1 人數	Site 2 人數
健康對照組	100	100
大腸直腸癌	30	44

FDP cutoff µg/mL	Site 1		Site 2	
	%特異性	%敏感度	%特異性	%敏感度
0.4	57	100	-	-
0.5	74	93	33	93
0.6	83	87	49	89
0.7	93	80	62	84
0.8	95	73	74	80
0.9	97	70	78	73
1.0	99	70	88	71
1.1	99	63	91	64
1.2	100	63	92	60
1.3	100	50	94	60
1.4	100	43	95	58
1.5	100	43	96	53

**性能特色：**

**準確度**

使用 3 組不同批號試劑，每天兩次測試，每次皆採取二重複，持續 5 天。此研究提供不同批號的試劑的差異分析。DR-70 分析在臨床用途上有令人滿意的準確度，且檢測濃度具有臨床意義。

檢體	平均濃度(µg/mL)	平均變異度(%)
1	0.63	20.43
2	0.85	18.74
3	4.67	13.20
4	0.43	8.56
5	3.70	4.66

**回收率**

將正常人血清加入已知濃度的陽性癌症血清，其濃度計算如下表。

檢體	起始濃度 (µg/mL)	添加濃度 (µg/mL)	觀察值 (µg/mL)	回收率 (%)
1	0.434	1.214	1.587	94.98
		2.074	2.357	92.72
		2.662	2.958	94.82
2	0.402	1.214	1.488	89.46
		2.074	2.276	90.36
		2.662	2.953	95.83
3	0.372	1.214	1.474	90.77
		2.074	2.245	90.31
		2.662	2.823	92.07

**分析靈敏度**

分析靈敏度為 20 個零校正液重複檢測之平均吸光值加 2 倍標準差所得之濃度或是 16 個非零校正液 (0.625 µg/mL) 重複檢測之平均吸光值所得之濃度。靈敏度之極限為 0.5 µg/mL，在 95% 信賴區間以上，其零校正液檢測濃度 (平均值+2SD) 平均值為 0.06 µg/mL。

**干擾**

加血紅素至 5 mg/mL、血脂 10 mg/mL、膽紅素 6 mg/mL、一般的化療及非處方藥均不會干擾到 DR-70 檢測。

**高劑量勾狀效應**

DR-70 濃度高到 200 µg/mL 亦未發現高劑量勾狀效應。DR-70 校正液的最高濃度為 10 µg/mL。

**限制：**

1. 急性感染、自體免疫及外傷會造成偽陽性。
2. 溶血的樣本會使檢測值升高。故溶血會造成偽陽性。
3. 高血脂樣本會抑制測試結果。故高血脂樣本會造成偽陰性。
4. 凝結的蛋白質會使測試結果升高，故只能使用血清，不可使用血漿。

**參考文獻：**

1. Fields, A., S. Popperna, N. Jha, S. Marcushamer, C. McNamee, J. Hanson, J. Samson, J. Kulyk, J. Whittingham and A. Shaw: Serum Levels of Circulating Extracellular Matrix Complex (CEMC) in Lung Cancer Patients: Potential use as a Tumor Marker. 12<sup>th</sup> International Conference on Human Tumor Markers, June 11-14, New York, New York, 1995
2. Dongfang Wu, Xin Zhou, Guoliang Yang, Yuntao Xie, Mingbai Hu, Zhangqi Wu, Gang Yang, Minxiang Lu: Clinical Performance of the AMDL DR-70 Immunoassay Kit for Cancer Detection, Journal of Immunoassay, 19(1), 63-72 (1998)
3. Rucker P., Antonio SM., Braden B.: Elevated Fibrinogen-Fibrin Degradation Product (FDP) in Serum of Colorectal Cancer Patients, Analytical Letters, 37(14), 2965-2976 (2004)

文件編號：20150108

藥商名稱：華宇藥品股份有限公司

藥商地址：台北市中山區中山北路二段 115 巷 43 號 8 樓

製造廠名稱：華宇藥品股份有限公司委託世基生物醫學股份有限公司台北廠製造

製造廠地址：台北市內湖區舊宗路 2 段 171 巷 17 號 4 樓

衛部醫器製字第 004477 號