

MONOKIT

کیت اندازه‌گیری CA-125 در سرم انسان
CA-125 ELISA Kit 96t
Cat. NO: 4134-96 / Rev: C0 (1402/09/28)

مقدمه:

CA-125 یک مارکر بسیار دقیق برای تومورهای اپی‌تلیال غیرموسینی تخمدان است که در بیش از ۸۰٪ از زنان مبتلا به سرطان تخمدان افزایش می‌یابد. این تومور مارکر ویژگی و حساسیت بالایی برای سرطان تخمدان داشته و اندازه‌گیری آن، اهمیت بالینی بسیار زیادی دارد. اندازه‌گیری این تومور مارکر در سرم، جهت ارزیابی پاسخ بیمار به درمان نیز کاربرد دارد. همچنین سطح CA-125 جهت پیش‌بینی نتایج مثبت در تکرار مجدد لاپاراتومی تشخیصی کاربرد دارد. افت ناگهانی CA-125 بعد از دو مرحله شیمی‌درمانی، یک روش پیش‌بینی دقیق در مورد پاسخ کامل به شیمی‌درمانی می‌باشد. حیطة کاربرد این کیت اندازه‌گیری غلظت CA-125 در نمونه‌های سرم انسان می‌باشد.

اصول آزمایش:

اساس این آزمایش الایزای ساندویچ می‌باشد. در این روش بی‌حرکت‌سازی در کف چاهک‌های پلیت توسط واکنش بین استرپتاویدین تثبیت شده در کف چاهک و آنتی‌بادی مونوکلونال ضد CA-125 بیوتینیل شده صورت می‌گیرد. با مخلوط شدن آنتی‌بادی بیوتینیل، آنتی‌بادی متصل به آنزیم HRP و سرم حاوی آنتی‌ژن، واکنش بین آنتی‌ژن سرم و آنتی‌بادی‌ها بدون هیچ رقابتی صورت می‌گیرد و کمپلکس ساندویچ ایجاد شده به دلیل تمایل بسیار بالای بین استرپتاویدین و بیوتین، به کف چاهک متصل می‌شود. پس از شستشوی چاهک‌ها، با اضافه کردن محلول رنگزا (سوبسترای آنزیم HRP) و سپس محلول متوقف‌کننده، محصول نهایی تولید می‌شود که در طول موج ۴۵۰ نانومتر بیشترین میزان جذب نوری را دارد. شدت رنگ ایجاد شده و در نتیجه مقدار جذب با غلظت CA-125 سرم ارتباط مستقیم دارد. در نهایت غلظت CA-125 سرم به کمک منحنی استاندارد محاسبه می‌گردد.

محتویات کیت:

- ۱) میکرو پلیت ۹۶ تستی حاوی استرپتاویدین تثبیت شده.
- ۲) کالیبراتورها (CA-125 Cal A-F): شش ویال با غلظت‌های ۰، ۱۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ uL/mL تهیه شده از سرم انسان.
- ۳) کونژوگه آنزیمی (CA-125 Enzyme Conjugate): یک ویال ۱۱ میلی‌لیتری حاوی آنتی‌بادی‌های متصل به بیوتین و آنتی‌بادی متصل به آنزیم HRP.
- ۴) محلول شستشو (Wash Solution-20X): یک ویال ۵۰ میلی‌لیتری.
- ۵) محلول رنگزا A (Substrate Solution A): یک ویال ۶/۵ میلی‌لیتری.
- ۶) محلول رنگزا B (Substrate Solution B): یک ویال ۶/۵ میلی‌لیتری.
- ۷) محلول متوقف‌کننده واکنش (Stop Solution): یک ویال ۱۲ میلی‌لیتری.
- ۸) محلول کنترل سطح یک (Control Level 1): ویال ۰/۵ میلی‌لیتری.
- ۹) محلول کنترل سطح دو (Control Level 2): ویال ۰/۵ میلی‌لیتری.
- ۱۰) برچسب مخصوص پلیت.

توجه ۱: کلیه محلول‌ها در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شوند. محلول متوقف‌کننده در دمای اتاق نیز قابل نگهداری است. توجه ۲: مقادیر کنترل‌ها در برگه COA درج شده است.

مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نمی‌باشند:

- ۱) دستگاه خوانش‌گر پلیت دارای فیلتر ۴۵۰ و ۶۳۰ نانومتر (فیلتر مرجع).
- ۲) سمپلر کالیبره.
- ۳) آب مقطر دیونیزه.

احتیاط در استفاده از کیت:

- ۱) محتویات این کیت برای استفاده در همین کیت تعبیه گردیده است؛ لذا از استفاده مشترک با سایر کیت‌ها و یا شماره‌های ساخت دیگر جداً خودداری کنید.
- ۲) کلیه محلول‌ها تا زمان انقضاء کیت پایدار هستند. از محلول‌هایی که تاریخ انقضاء آن‌ها گذشته است استفاده نکنید.
- ۳) توجه فرمایید محلول‌ها در معرض نور مستقیم قرار نگیرند.
- ۴) محتویات کیت با منشاء انسانی از نظر منفی بودن HBS Ag، HIV1/2 و HCV بررسی شده‌اند؛ ولی تشخیص قطعی در مورد منفی بودن تمام عوامل عفونی بیماری‌زا با استفاده از روش‌های متداول آزمایشگاهی امکان‌پذیر نیست. بنابراین، با در نظر گرفتن احتمال آلودگی و بیماری‌زایی محتویات کیت، تمام مراحل آزمایش باید مطابق با دستورالعمل‌های ایمنی انجام شود.

۵) استفاده از دستکش و عینک در هنگام کار الزامی است. در هنگام کار با کیت دقت فرمایید که محتویات آن بر روی صورت یا سایر نقاط بدن ریخته نشود. از تماس مواد با دهان و سایر مخاط جداً جلوگیری کنید.

۶) نمونه بیماران، کنترل‌ها، چاهک‌ها و سر سمپلرهای استفاده شده باید به‌عنوان پسماندهای عفونی در نظر گرفته شوند و مطابق با الزامات دفع پسماندهای عفونی امحاء گردند.

جمع‌آوری، آماده‌سازی و نگهداری نمونه:

- ۱) برای این آزمایش از نمونه‌های سرم استفاده کنید. نمونه خون با استفاده از تکنیک استاندارد خون‌گیری سیاهرگی تهیه شود و سرم بعد از لخته شدن کامل خون (۳۰ تا ۶۰ دقیقه) از سلول‌های خونی جدا شود. حتی الامکان از نمونه‌های ایکتریک، لیپمیک و همولیز استفاده نکنید.
- ۲) در افرادی که دوز بالایی از بیوتین ($>5 \text{ mg/day}$) را دریافت می‌کنند، نمونه‌گیری باید حداقل ۸ ساعت پس از دریافت آخرین دوز بیوتین انجام شود.
- ۳) درب ظرف نمونه‌ها باید کاملاً بسته باشد. نمونه‌ها تا ۵ روز در دمای اتاق و دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد و حداکثر تا شش ماه در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قابل نگهداری و استفاده هستند. از منجمد و ذوب کردن مکرر نمونه‌ها خودداری کنید.

آماده‌سازی و نگهداری معرف‌ها:

- ۱) آماده‌سازی و نگهداری محلول شستشو: حجم ۵۰ میلی‌لیتر از محلول شستشو (20X) را به ۹۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر دیونیزه اضافه و پس از آماده‌سازی در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری کنید. در صورت مشاهده رسوب در محلول شستشو، آن را در بن‌ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار دهید تا رسوب حل شود. در صورت مشاهده کدورت در محلول شستشو، از مصرف آن خودداری کنید.
- ۲) آماده‌سازی محلول رنگزا: محلول‌های رنگزا A و B را با حجم‌های مساوی (۱:۱) مخلوط کنید (به‌عنوان مثال، برای تهیه ۲ میلی‌لیتر محلول آماده مصرف، ۱ میلی‌لیتر از محلول رنگزا A را به ۱ میلی‌لیتر از محلول رنگزا B اضافه کنید) و به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه کنید. در صورت مشاهده رنگ آبی و یا کدورت در محلول رنگزا، از مصرف آن خودداری فرمایید.

روش انجام آزمایش:

قبل از شروع آزمایش مطمئن شوید که تمام اجزاء کیت، کنترل‌ها و نمونه‌ها به دمای اتاق (۲۲ تا ۲۸ درجه سانتی‌گراد) رسیده‌اند. کالیبراتورها، کنترل‌ها و نمونه‌ها را با ۵ بار سر و ته کردن به‌آرامی یکنواخت کنید.

- ۱) تعداد چاهک‌های مورد نیاز برای انجام تست را بردارید و بقیه چاهک‌ها را همراه رطوبت‌گیر در کیسه آلومینیومی قرار دهید، درب آن را بسته و در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری کنید.
- ۲) حجم ۲۵ میکرولیتر از کالیبراتورها، کنترل‌ها و یا نمونه‌ها در چاهک‌های موردنظر بریزید. بهتر است که از هر نمونه، کنترل یا کالیبراتور به صورت دوتایی (دوپلیکیت) در چاهک‌ها ریخته شود.
- ۳) حجم ۱۰۰ میکرولیتر از کونژوگه آنزیمی به هر چاهک اضافه نمایید و پلیت را به مدت ۳۰ ثانیه به‌آرامی تکان دهید.

۴) چاهک‌ها را با برچسب مخصوص پلیت بپوشانید و به‌مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.

۵) محتویات پلیت را با وارونه کردن یا اسپیراسیون تخلیه کنید و چاهک‌ها را ۳ مرتبه و هر مرتبه با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشو آماده شده (بخش آماده‌سازی معرف‌ها را مطالعه فرمایید) بشویید. اگر شستشو به‌صورت دستی انجام می‌شود در انتهای شستشو به‌آرامی پلیت را بر روی دستمال رطوبت‌گیر بریزید. به‌منظور انجام شستشوی مناسب و استاندارد چاهک‌ها، مطابق با فیلم قرار داده شده در وب‌سایت شرکت^۱ اقدام کنید.









۶) حجم ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رنگزای آماده مصرف (بخش آماده‌سازی معرف‌ها را مطالعه فرمایید) درون تمام چاهک‌ها بریزید و پلیت را به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه کنید. از تکان دادن پلیت در این مرحله خودداری کنید.

توجه: اگر بالاترین میزان جذب کالیبراتور کمتر از ۲ به‌دست آمد، می‌توانید زمان انکوباسیون محلول رنگزا را به مدت ۱۰ دقیقه افزایش دهید.

- ۷) حجم ۵۰ میکرولیتر از محلول متوقف‌کننده واکنش به کلیه چاهک‌ها اضافه کنید و پلیت را به مدت ۲۰ ثانیه به‌آرامی تکان دهید.
- ۸) مقدار جذب را برای هر چاهک در طول موج ۴۵۰ نانومتر با استفاده از متد Point to Point حداکثر تا ۱۵ دقیقه بعد از متوقف کردن واکنش بخوانید (از طول موج فرانس ۶۲۰ تا ۶۳۰ نانومتر استفاده کنید).

¹ <http://www.samantajhiz.com/Support.aspx>

علائم استفاده شده در پرچسب کالاها

	Manufacturer
	Use-by date
	Batch code
	In vitro diagnostic medical device
	Own brand Labeling
	Contains sufficient for tests
	Temperature limit
	Date of manufacture

References:

1. McPherson R, Pincus M. Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. Elsevier Health Sciences; 2021.
2. Pagana KD. Mosby's manual of diagnostic and laboratory tests. Elsevier Health Sciences; 2013.
3. Tietz. Reference information for the clinical laboratory. Hn Textbook of clinical chemistry. Burtis, CA, Ashwood, RA, WB, Saunders. Philadelphia; 1999.

در صورت بروز هرگونه مشکل خواهشمند است با شماره‌های مندرج بر روی جعبه (بخش پشتیبانی) تماس بگیرید.

۶) بررسی حساسیت (Sensitivity)

حساسیت کیت بر اساس (LOD) Limit of Detection و (LOB) Limit of Blank با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد و برابر با 0.5 U/mL تعیین گردید.

$$\text{LOD} = \text{LOB} + 1.645 \text{ SD}_s$$

$$\text{LOB} = \text{Mean}_b + 1.645 \text{ SD}_b$$

(s: Diluted sample & b: Blank)

۷) بررسی پایداری (Stability)

Accelerated Stability Test: بررسی پایداری کیت به مدت ۴ هفته در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد.
In Use Stability Test: بررسی پایداری کیت پس از باز کردن درب محلول‌ها، به مدت ۸ هفته در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد.

Shelf Stability Test: بررسی پایداری ۸ عدد کیت به مدت ۲ سال در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و ارزیابی نتایج به صورت هر سه ماه یک بار می‌باشد.

مطالعات مختلف بررسی پایداری نشان می‌دهد که کیت مورد نظر در زمان‌های مشخص شده پایدار است. معیار پذیرش در آزمایش‌های مربوط به تعیین پایداری، تغییر نتایج کمتر از ۲۰ درصد است.

۲) بررسی دقت-آزمون دقت بین‌دور (Between-Run)

دقت بین‌دور با ارزیابی تجدیدپذیری نتایج حاصل از سه نمونه سرم با غلظت‌های متفاوت در ۴ نوبت کاری (۵ بار تکرار برای هر نمونه در هر نوبت کاری) انجام شد. معیار پذیرش در این آزمایش $CV < 15\%$ است.

Serum sample	1	2	3
No. of Repeats	20	20	20
Mean CA-125 (U/mL)	27.4	75	126
S.D (U/mL)	1.71	4.2	6.4
C.V (%)	6.2	5.6	5.0

۳) بررسی درستی-آزمون بازیابی (Recovery)

در این آزمایش به ازاء هر آزمون، دو نمونه سرم به نسبت مساوی با یکدیگر ترکیب و به‌عنوان یک نمونه غلظت CA-125 در آن اندازه‌گیری شد. معیار پذیرش در این آزمایش $\text{Bias} < 10\%$ نسبت به نتیجه مورد انتظار است.

NO.	Sample U/mL	Added U/mL	Exp. U/mL	Obs. U/mL	% Rec.
1	7.3	28.6	17.95	18.41	102.5
2	18.4	53	35.7	37.2	104.2
3	45.4	117.2	81.3	78.5	96.5

۴) بررسی درستی-آزمون خطی بودن (Linearity)

در این تست، غلظت CA-125 در رقت‌های مختلف نمونه سرم برای تعیین خطی بودن کیت اندازه‌گیری شد. معیار پذیرش در این آزمایش $\text{Bias} < 10\%$ است.

NO.	Sample (U/mL)	1/2	1/4	1/8	1/16
		% Bias			
1	12.6	1.6	1.9	-2.6	1.8
2	35.8	-2.2	1.6	3.2	-1.1
3	71.3	-3.1	-2.2	1.8	-1.6

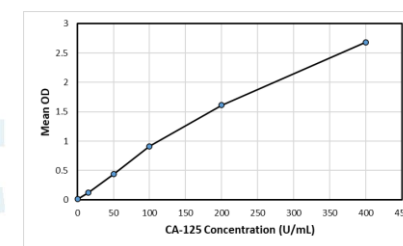
۵) بررسی تداخلات (Interference)

درصد تداخلات رایج در سنجش CA-125 مورد ارزیابی قرار گرفت و نتایج آن به شرح ذیل می‌باشد:

Substance	Amount Added	Recovery
Bilirubin	1m mol/L	98-103%
Hemoglobin	1m mol/L	100-106%
Triglyceride	10m mol/L	96-110%
RF	1000 kIU/L	97-107%
Biotin	25 µg/L	99-103%

جذب نوری و منحنی استاندارد این کیت به عنوان نمونه در زیر آورده شده است.

Calibrators	Well Number	OD	Mean OD	Conc. (U/mL)
Cal. A	A1	0.011	0.012	0
	B1	0.013		
Cal. B	C1	0.122	0.124	15
	D1	0.126		
Cal. C	E1	0.430	0.438	50
	F1	0.446		
Cal. D	G1	0.906	0.914	100
	H1	0.922		
Cal. E	A2	1.593	1.612	200
	B2	1.631		
Cal. F	C2	2.668	2.685	400
	D2	2.702		



مقادیر مورد انتظار برای تست الایزای CA-125

شرکت تولیدکننده کیت، مقادیر مورد انتظار برای این تست را به قرار زیر مشخص کرده است. اگرچه، این مقادیر برای آنالیت مورد نظر باید توسط آزمایشگاه تعیین گردد.

≤ 35 U/mL زنان سالم و غیر باردار

پارامترهای کنترل کیفی

۱) بررسی دقت-آزمون دقت درون‌دور (Within-Run)

دقت درون‌دور با ارزیابی تکرارپذیری نتایج حاصل از سه نمونه سرم با غلظت‌های متفاوت در یک نوبت کاری (۲۰ بار تکرار برای هر نمونه) بررسی شد. معیار پذیرش در این آزمایش $CV < 15\%$ است.

Serum sample	1	2	3
No. of Repeats	20	20	20
Mean CA-125 (U/mL)	12.6	31.8	91
S.D (U/mL)	0.66	1.52	4.1
C.V (%)	5.2	4.8	4.5