

کیت اندازه‌گیری CA 15-3 در سرم انسان
CA 15-3 ELISA kit 96t
Cat. NO: 4224-96 / Rev: B2 (1402/10/04)

مقدمه:

مارکر CA 15-3 به‌عنوان اولین فاکتور پیش‌آگهی دهنده در خصوص سرطان پستان در نظر گرفته می‌شود. این مارکر محصول پروتئینی ژن MUC1 می‌باشد. امروزه بیشترین کاربرد بالینی اندازه‌گیری این تومور مارکر، پیگیری درمان در بیماران با سرطان پستان پیشرفته می‌باشد که با سایر روش‌های کلینیکی و رادیولوژی قابل بررسی نیستند. در کمتر از ۵۰٪ بیماران که سرطان پستان به صورت کانونی و محدود دارند، سطح CA 15-3 بالا می‌باشد و در ۸۰٪ بیماران با سرطان پستان متاستاتیک افزایش نشان می‌دهد. حیطة کاربرد این کیت اندازه‌گیری کمی سطح CA 15-3 در نمونه سرم انسان به روش الایزا است.

اصول آزمایش:

این آزمایش براساس الیازای ساندویچ ترتیبی طراحی شده است. با اضافه شدن آنتی‌بادی بیوتینیل و سرم حاوی آنتی‌ژن به چاهک، بی‌حرکت‌سازی کمپلکس‌های ایمنی توسط واکنش بین استرپتاویدین تثبیت شده در کف چاهک‌ها و آنتی‌بادی بیوتینیل ضد CA 15-3 صورت می‌گیرد. پس از شستشوی چاهک‌ها، با اضافه کردن آنتی‌بادی متصل به آنزیم HRP، کمپلکس‌های ساندویچ تشکیل می‌شوند. پس از به تعادل رسیدن واکنش و شستشوی مجدد چاهک‌ها، با افزودن محلول رنگزا (سوبسترای آنزیم HRP) و سپس محلول متوقف‌کننده، محصول نهایی تولید می‌شود که بیشترین جذب نوری را در طول موج ۴۵۰ نانومتر دارد. مقدار رنگ ایجاد شده و در نتیجه شدت جذب نوری با غلظت CA15-3 سرم، ارتباط مستقیم دارد. در نهایت غلظت CA 15-3 سرم به کمک منحنی استاندارد محاسبه می‌گردد.

محتویات کیت:

- ۱) میکرو پلیت ۹۶ تستی حاوی استرپتاویدین تثبیت شده.
- ۲) کالیبراتورها (CA 15-3 Cal A-F): شش ویال با غلظت‌های ۱، ۱۰، ۴۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ U/mL.

- ۳) کونژوگه آنزیمی (CA 15-3 Enzyme Conjugate): یک ویال ۱۱ میلی‌لیتری حاوی آنتی‌بادی متصل به آنزیم HRP در بافر.
 - ۴) کونژوگه بیوتینی (CA 15-3 Biotin Conjugate): یک ویال ۱۱ میلی‌لیتری حاوی آنتی‌بادی متصل به بیوتین در بافر.
 - ۵) رقیق‌کننده نمونه (Sample Diluent): یک ویال ۵۰ میلی‌لیتری.
 - ۶) محلول شستشو (Wash Solution-50X): یک ویال ۲۰ میلی‌لیتری.
 - ۷) محلول رنگزا (Substrate Solution): یک ویال ۱۲ میلی‌لیتری.
 - ۸) محلول متوقف‌کننده واکنش (Stop Solution): یک ویال ۱۲ میلی‌لیتری.
 - ۹) محلول کنترل سطح یک (Control Level 1): یک ویال ۰/۵ میلی‌لیتری.
 - ۱۰) محلول کنترل سطح دو (Control Level 2): یک ویال ۰/۵ میلی‌لیتری.
 - ۱۱) بر چسب 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 COA درج گردیده است.

مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نمی‌باشند:

- ۱) دستگاه خوانش گر 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. ناشتا بودن فرد به هنگام نمونه‌گیری در درستی نتایج به‌دست آمده تأثیرگذار خواهد بود. 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 ایکتريک، لیپمیک و همولیز استفاده نکنید.
 - ۲) در افرادی که دوز بالایی از بیوتین (>5 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 ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد و حداکثر تا یک ماه در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قابل نگهداری و استفاده هستند. از منجمد و ذوب کردن مکرر نمونه‌ها خودداری کنید.
 - ۴) **رقیق‌سازی نمونه:** حجم ۲۵ میکرولیتر از نمونه‌های بیمار را به ۰/۵ میلی‌لیتر محلول رقیق‌کننده نمونه CA 15-3 اضافه و به‌خوبی مخلوط کنید (نسبت رقیق‌سازی ۱:۲۰). این محلول به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲-۸ درجه سانتی‌گراد قابل نگهداری است.
- آماده‌سازی و نگهداری معرف‌ها:**
- آماده‌سازی و نگهداری محلول شستشو: حجم ۲۰ میلی‌لیتر از محلول شستشو (50X) را به ۹۸۰ 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 ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار دهید تا رسوب حل شود. در

صورت مشاهده کدورت در محلول شستشو، از مصرف آن خودداری کنید.

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، نمونه‌ها و کنترل‌ها 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 نمونه‌های رقیق‌شده، کنترل‌ها یا کالیبراتورها را در چاهک‌های مورد نظر بریزید. بهتر است که از هر نمونه، کنترل یا کالیبراتور به صورت دوتایی (دوپلیکیت) در چاهک‌ها ریخته شود.

۳) حجم ۱۰۰ میکرولیتر از محلول کونژوگه بیوتینی را به هر چاهک اضافه کنید و پلیت را به مدت ۳۰ ثانیه روی سطح میز به‌آرامی تکان دهید.

۴) چاهک‌ها را با برچسب مخصوص پلیت ببوشانید و به مدت 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 اقدام کنید.






۶) حجم ۱۰۰ میکرولیتر از محلول کونژوگه آنزیمی به هر چاهک اضافه کنید. از تکان دادن پلیت در این مرحله خودداری کنید.

۷) چاهک‌ها را با برچسب مخصوص پلیت ببوشانید و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.

۸) چاهک‌ها را مطابق بند ۵ شستشو دهید.

¹ <http://www.idealdiag.com/Training.aspx>

علائم استفاده شده در پرچسب کالاها

EC REP	Authorized representative in the European community
	Manufacturer
	Use-by date
LOT	Batch code
IVD	In vitro diagnostic medical device
CE	European conformity
REF	Catalogue number
	Contains sufficient for tests
	Temperature limit
	Date of manufacture

۴ بررسی اختصاصیت (Specificity)

داخل موارد ذکر شده در جدول زیر در غلظت‌های مختلف با کیت سنجش CA 15-3 مورد ارزیابی قرار گرفت و نتایج آن به شرح ذیل می‌باشد:

Hormone	Interference
CA 15-3	1.00
CA 125	0.001
CA 19-9	0.001
PSA	0.026
AFP	ND*
CEA	ND
HCG	ND
RF	0.001
Bilirubin	ND
Hemolysis	ND
lipids	-0.009

*ND: Not Detectable

۵ بررسی حساسیت (Sensitivity)

حساسیت کیت بر اساس Limit of Detection (LOD) و Limit of Blank (LOB) با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد و برابر با ۰/۲ 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)

۶ 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 قرار داده شد و ارزیابی نتایج به صورت هر سه ماه یک بار می‌باشد.
 مطالعات مختلف بررسی پایداری نشان می‌دهد که کیت مورد نظر به مدت ۲۲ ماه پایدار است. معیار پذیرش در این آزمایش‌ها تغییر نتایج کمتر از ۲۰ درصد است.

مقادیر مورد انتظار برای تست الایزای CA 15-3

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

Healthy Females	≤ 37 U/ml
-----------------	-----------

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 نوبت‌کاری (۲۰ بار تکرار برای هر نمونه) بررسی شد. معیار پذیرش در این آزمایش CV < 10% است.

Serum sample	1	2	3
No. of Repeats	20	20	20
Mean CA15-3 (U/ml)	12.4	27.5	63.8
SD (U/ml)	0.61	1.24	2.5
CV (%)	4.9	4.5	3.9

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

دقت بین‌دور با ارزیابی تجدیدپذیری نتایج حاصل از سه نمونه سرم با غلظت‌های متفاوت در ۴ نوبت‌کاری (۵ بار تکرار برای هر نمونه) در هر نوبت‌کاری انجام شد. معیار پذیرش در این آزمایش CV < 10% است.

Serum sample	1	2	3
No. of Repeats	20	20	20
Mean CA15-3 (U/ml)	16.7	35.6	51.6
SD (U/ml)	0.84	1.94	2.4
CV (%)	5	5.4	4.6

۳) بررسی درستی-آزمون بازیابی (Recovery)

در این آزمایش به‌ازاء هر آزمون، دو نمونه سرم به‌نسبت مساوی با یکدیگر ترکیب و به‌عنوان یک نمونه غلظت CA 15-3 در آن اندازه‌گیری شد. معیار پذیرش در این آزمایش Bias < 15.8% نسبت به نتیجه مورد انتظار است.

NO.	Sample U/mL	Added U/mL	Exp. U/mL	Obs. U/mL	% Rec.
1	15	54	34.5	34	98.5
2	83	12	47.5	48.3	101.7
3	32	102	67	67.5	100.7

۹) حجم ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رنگزا درون تمام چاهک‌ها بریزید و پلیت را به‌مدت ۲۰ 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 به دست آمد، می‌توانید زمان انکوباسیون را به‌مدت ۱۰ دقیقه افزایش دهید.

۱۰) حجم ۵۰ میکرولیتر از محلول متوقف‌کننده واکنش به کلیه چاهک‌ها اضافه کنید و پلیت را به‌مدت ۲۰ ثانیه به‌آرامی تکان دهید.

۱۱) 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 رفرنس ۶۲۰ تا ۶۳۰ نانومتر استفاده کنید).

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

Calibrators	Well Number	OD	Mean OD	Conc. (U/mL)
Cal. A	A1	0.041	0.042	2
	B1	0.043		
Cal. B	C1	0.196	0.198	10
	D1	0.200		
Cal. C	E1	0.519	0.543	40
	F1	0.567		
Cal. D	G1	1.030	1.064	100
	H1	1.098		
Cal. E	A2	1.746	1.777	200
	B2	1.808		
Cal. F	C2	2.404	2.438	400
	D2	2.472		

