

کیت اندازه گیری CA-125 در سرم انسان
CA-125 ELISA Kit 96t
 Cat. NO: 4124-96 / Rev: E2 (1405/06/17)

مقدمه:

CA-125 یک مارکر بسیار دقیق برای تومورهای اپی تلیال غیرموسینی تخمدان است که در بیش از ۸۰٪ از زنان مبتلا به سرطان تخمدان افزایش می یابد. این تومورمارکر ویژگی و حساسیت بالایی برای سرطان تخمدان داشته و اندازه گیری آن، اهمیت بالینی بسیار زیادی دارد. اندازه گیری این تومور مارکر در سرم، جهت ارزیابی پاسخ بیمار به درمان نیز کاربرد دارد. همچنین سطح CA-125 جهت پیش بینی نتایج مثبت در تکرار مجدد لاپاراتومی تشخیصی کاربرد دارد. افت ناگهانی CA-125 بعد از دو مرحله شیمی درمانی، یک روش پیش بینی دقیق در مورد پاسخ کامل به شیمی درمانی می باشد. حیطة کاربرد این کیت اندازه گیری غلظت CA-125 در نمونه های سرم انسان می باشد.

اصول آزمایش:

اساس این آزمایش الایزای ساندویچ می باشد. در این روش بی حرکت سازی در کف چاهک های پلیت توسط واکنش بین استرپتاویدین تثبیت شده در کف چاهک و آنتی بادی مونوکلونال ضد CA-125 بیوتینیل شده صورت می گیرد. با مخلوط شدن آنتی بادی بیوتینیل، آنتی بادی متصل به آنزیم HRP و سرم حاوی آنتی ژن، واکنش بین آنتی ژن سرم و آنتی بادی ها بدون هیچ رقابتی صورت می گیرد و کمپلکس ساندویچ ایجاد شده به دلیل تمایل بسیار بالای بین استرپتاویدین و بیوتین، به کف چاهک متصل می شود. پس از شستشوی چاهک ها، با اضافه کردن محلول رنگزا (سوبسترای آنزیم HRP) و سپس محلول متوقف کننده، محصول نهایی تولید می شود 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 می گردد.

محتویات کیت:

- ۱) میکرو پلیت ۹۶ تستی حاوی استرپتاویدین تثبیت شده.
- ۲) کالیبراتورها (CA-125 Cal A-F): شش ویال با غلظت های ۰، ۱۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ U/mL، تهیه شده از سرم انسان.
- ۳) کونژوگه آنزیمی (CA-125 Enzyme Conjugate): یک ویال ۱۱ میلی لیتری حاوی آنتی بادی های متصل به بیوتین و آنتی بادی متصل به آنزیم HRP.
- ۴) محلول شستشو (Wash Solution-20X): یک ویال ۵۰ میلی لیتری.
- ۵) محلول رنگزا A (Substrate Solution A): یک ویال ۶/۵ میلی لیتری.
- ۶) محلول رنگزا B (Substrate Solution B): یک ویال ۶/۵ میلی لیتری.
- ۷) محلول متوقف کننده واکنش (Stop Solution): یک ویال ۱۲ میلی لیتری.
- ۸) محلول کنترل سطح یک (Control Level 1): ویال ۰/۵ میلی لیتری.
- ۹) محلول کنترل سطح دو (Control Level 2): ویال ۰/۵ میلی لیتری.
- ۱۰) برچسب مخصوص پلیت.
- توجه ۱: کلیه محلول ها در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد نگهداری شوند.
- محلول متوقف کننده در دمای اتاق نیز قابل نگهداری است.
- توجه ۲: مقادیر کنترل ها در COA درج شده است.

مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نمی باشند:

- 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 کیت ها و یا شماره های ساخت دیگر جداً خودداری کنید.
- ۲) کلیه محلول ها تا زمان انقضاء کیت پایدار هستند. از محلول هایی که تاریخ انقضاء آن ها گذشته است استفاده نکنید.
- ۳) توجه فرمایید محلول ها در معرض نور مستقیم قرار نگیرند.
- ۴) محتویات کیت با منشاء انسانی از نظر منفی بودن HIV1/2، HBs Ag و HCV بررسی شده اند؛ ولی تشخیص قطعی در مورد منفی بودن تمام

عوامل عفونی بیماری را با استفاده از روش های متداول آزمایشگاهی امکان پذیر نیست. بنابراین، با در نظر گرفتن احتمال آلودگی و بیماری زایی محتویات کیت، تمام مراحل آزمایش باید مطابق با دستورالعمل های 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، کنترل ها، چاهک ها و سر سمپلرهای استفاده شده باید به عنوان پسماندهای عفونی در نظر گرفته شوند و مطابق با الزامات دفع پسماندهای عفونی امحاء گردند.

جمع آوری، آماده سازی و نگهداری نمونه:

۱) برای این آزمایش از نمونه های سرم استفاده کنید. نمونه خون با استفاده از تکنیک استاندارد خون گیری سیاهرگی تهیه شود و سرم بعد از لخته شدن کامل خون (۳۰ تا ۶۰ دقیقه) از سلول های خونی جدا شود. حتی الامکان از نمونه های ایکتریک، لیپمیک و همولیز استفاده نکنید.

۲) در افرادی که دوز بالایی از بیوتین ($>5 \text{ mg/day}$) را دریافت می کنند، نمونه گیری باید حداقل ۸ ساعت پس از دریافت آخرین دوز بیوتین انجام شود.

۳) درب ظرف نمونه ها باید کاملاً بسته باشد. نمونه ها تا ۵ روز در دمای اتاق و دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد و حداکثر تا شش ماه در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد قابل نگهداری و استفاده هستند. از منجمد و ذوب کردن مکرر نمونه ها خودداری کنید.

آماده سازی و نگهداری معرف ها:

۱) آماده سازی و نگهداری محلول شستشو: حجم ۵۰ میلی لیتر از محلول شستشو (20X) را به ۹۵۰ میلی لیتر آب مقطر دیونیزه اضافه و پس از آماده سازی در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد نگهداری کنید. در صورت مشاهده رسوب در محلول شستشو، آن را در بن ماری ۳۷ درجه سانتی گراد قرار دهید تا رسوب حل شود. در صورت مشاهده کدورت در محلول شستشو، از مصرف آن خودداری کنید.

۲) آماده سازی محلول رنگزا: قبل از شروع استفاده از کیت، کل حجم محلول رنگزا B (ویال روشن) را داخل محلول رنگزا A (ویال تیره) خالی نمایید و برای انجام تست تا پایان مصرف کیت استفاده نمایید. 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، کنترل ها و نمونه ها به دمای اتاق (۲۲ تا ۲۸ درجه سانتی گراد) رسیده اند. کالیبراتورها، کنترل ها و نمونه ها را با ۵ بار سر و ته کردن به آرامی یکنواخت کنید.

۱) تعداد چاهک های مورد نیاز برای انجام تست را بردارید و بقیه چاهک ها را همراه رطوبت گیر در کیسه آلومینیومی قرار دهید، درب آن را بسته و در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد نگهداری کنید.

۲) حجم ۲۵ میکرولیتر از کالیبراتورها، کنترل ها و یا نمونه ها در چاهک های مورد نظر بریزید. بهتر است که از هر نمونه، کنترل یا کالیبراتور به صورت دوتایی (دوپلیکیت) در چاهک ها ریخته شود.

۳) حجم ۱۰۰ میکرولیتر از کونژوگه آنزیمی به هر چاهک اضافه نمایید و پلیت را به مدت ۳۰ ثانیه به آرامی تکان دهید.

۴) چاهک ها 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 چاهک ها را ۳ مرتبه و هر مرتبه با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشو آماده شده (بخش آماده سازی معرف ها را مطالعه فرمایید) بشویید. اگر شستشو به صورت دستی انجام می شود در انتهای شستشو به آرامی پلیت را بر روی دستمال رطوبت گیر بزنید. به منظور انجام شستشوی مناسب و استاندارد چاهک ها، مطابق با فیلم قرار داده شده در وبسایت شرکت اقدام کنید.

۶) حجم ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رنگزا آماده مصرف (بخش آماده سازی معرف ها را مطالعه فرمایید) درون تمام چاهک ها بریزید و پلیت را به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه کنید. از تکان دادن پلیت در این مرحله خودداری کنید.

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

علائم استفاده شده در پرچسب کالاها

EC	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 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 Bias < 10% است.

NO.	Sample (U/mL)	1/2	1/4	1/8	1/16
		% Bias			
1	22.2	1.3	-3.2	-1.8	4.2
2	45.8	2.5	4.9	1.6	-1.1
3	63.3	3.2	-1.4	2.8	-4.9

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%

۶ 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 U/mL ۰/۵ تعیین گردید.

$$LOD = LOB + 1.645 SD_s$$

$$LOB = Mean_b + 1.645 SD_b$$

(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 به‌صورت هر سه ماه یک بار می‌باشد. مطالعات مختلف بررسی پایداری نشان می‌دهد که کیت مورد نظر در زمان‌های مشخص‌شده پایدار است. معیار پذیرش در آزمایش‌های مربوط به تعیین پایداری، تغییر نتایج کمتر از ۲۰ درصد است.

ROMA Value	Value (%)
Premenopausal Women	
Low risk of finding epithelial ovarian cancer	< 11.4
High risk of finding epithelial ovarian cancer	≥ 11.4
Postmenopausal Women	
Low risk of finding epithelial ovarian cancer	< 29.9
High risk of finding epithelial ovarian cancer	≥ 29.9

توجه: جهت محاسبه ROMA Factor به سایت

<https://www.ikit.ir> مراجعه نمایید.

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 CA-125 (U/mL)	4.8	18.2	47.3
S.D (U/mL)	0.27	0.89	1.94
C.V (%)	5.6	4.9	4.1

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 CA-125 (U/mL)	7.31	21.58	47.62
S.D (U/mL)	0.41	1.12	2.43
C.V (%)	5.6	5.2	5.1

۳) بررسی درستی-آزمون بازیابی (Recovery)

در این آزمایش به‌ازاء 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 Bias < 10% نسبت به نتیجه مورد انتظار است.

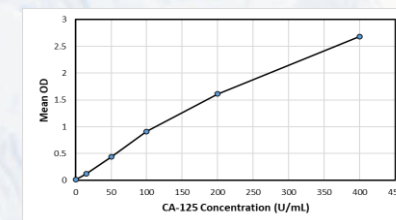
NO.	Sample U/mL	Added U/mL	Exp. U/mL	Obs. U/mL	% Rec.
1	5.8	65.2	35.5	34.1	96
2	13.4	48.5	31	32.4	104.5
3	39.7	121.4	80.5	79.3	98.5

توجه: اگر بالاترین میزان جذب کالیبراتور کمتر از ۲ به‌دست آمد، می‌توانید زمان انکوباسیون محلول رنگزا را به‌مدت ۱۵ دقیقه افزایش دهید.

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

۸) مقدار جذب را برای هر چاهک در طول موج ۴۵۰ نانومتر با استفاده از امتداد Point to Point حداکثر تا ۱۵ دقیقه بعد از متوقف کردن واکنش بخوانید (از طول موج رفرانس 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	0.010	0.012	0
	B1	0.014		
Cal. B	C1	0.121	0.124	15
	D1	0.127		
Cal. C	E1	0.430	0.438	50
	F1	0.446		
Cal. D	G1	0.902	0.914	100
	H1	0.926		
Cal. E	A2	1.605	1.612	200
	B2	1.619		
Cal. F	C2	2.673	2.685	400
	D2	2.697		



مقادیر مورد انتظار برای تست الایزای CA-125

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.

≤ 35 U/mL	زنان سالم و غیر باردار
-----------	------------------------

References:

- McPherson R, Pincus M. Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. Elsevier Health Sciences; 2021.
- Pagana KD. Mosby's manual of diagnostic and laboratory tests. Elsevier Health Sciences; 2013.
- 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.
توجه: چنانچه از دستگاه‌های الایزا پروسسور استفاده می‌کنید، می‌توانید تنظیمات دستگاه خود را از شرکت دریافت نمایید.