

کیت اندازه گیری HE4 در سرم انسان
Human Epididymis Protein 4 (HE4) ELISA Kit
Cat. No: 8524-96 / Rev: C1 (1405/06/17)

مقدمه:

پروتئین ترشخی اپی دیدیم انسانی (HE4) متعلق به خانواده پروتئینی WAP four-disulfide core (WFDC) است که بیان افزایش یافته آن در انواع مختلف سرطان اپی تلیال تخمدان شامل سرطان سروز، سرطان آندومتریوئید و سرطان سلول شفاف مشاهده شده است. اندازه گیری سطح سرمی HE4 به منظور نظارت بر روند درمان و بهبود سرطان تخمدان و تشخیص عود یا پیشرفت بیماری در افرادی که سابقه افزایش این بیومارکر را داشته اند، کاربرد دارد. حیطة کاربرد این کیت، اندازه گیری کمی غلظت HE4 در سرم انسان به روش الایزا است.

اصول آزمایش:

این آزمایش براساس الایزای ساندویچ طراحی شده است. با اضافه شدن آنتی بادی بیوتینیل و سرم حاوی آنتی ژن به چاهک، بی حرکت سازی کمپلکس های ایمنی توسط واکنش بین استرپتاویدین تثبیت شده در کف چاهک ها و آنتی بادی بیوتینیل ضد HE4 صورت می گیرد. پس از شستشوی چاهک ها، آنتی بادی متصل به آنزیم HRP اضافه شده و کمپلکس های ساندویچ تشکیل می شوند. پس از به تعادل رسیدن واکنش و شستشوی مجدد چاهک ها، با افزودن محلول رنگزا (سوبسترای آنزیم HRP) و سپس محلول متوقف کننده، محصول نهایی تولید می شود که بیشترین جذب نوری را در طول موج ۴۵۰ نانومتر دارد. مقدار رنگ ایجاد شده و در نتیجه شدت جذب نوری با غلظت HE4 سرم، ارتباط مستقیم دارد. در نهایت غلظت HE4 سرم به کمک منحنی استاندارد محاسبه می گردد.

محتویات کیت:

- ۱) میکروپلیت ۹۶ تستی حاوی استرپتاویدین تثبیت شده.
- ۲) کالیبراتورها (HE4 Cal A – F): شش ویال در غلظت های ۰،۱۰۰، ۰،۲۰۰، ۰،۴۰۰ و ۸۰۰ pmol/L تهیه شده از سرم انسان.
- ۳) محلول کونژوگه آنزیمی (HE4 Enzyme Conjugate): یک ویال ۱۱ میلی لیتری حاوی آنتی بادی متصل به آنزیم HRP در بافر.
- ۴) محلول کونژوگه بیوتینی (HE4 Biotin Conjugate): یک ویال ۱۱ میلی لیتری حاوی آنتی بادی متصل به بیوتین در بافر.
- ۵) محلول شستشو (Wash Solution-50X): یک ویال ۲۰ میلی لیتری.
- ۶) محلول رنگزا A (Substrate Solution A): یک ویال ۶/۵ میلی لیتری.
- ۷) محلول رنگزا B (Substrate Solution B): یک ویال ۶/۵ میلی لیتری.

- ۸) محلول متوقف کننده واکنش (Stop Solution): یک ویال ۱۲ میلی لیتری.
- ۹) محلول کنترل سطح یک (Control Level 1): یک ویال ۰/۵ میلی لیتری.
- ۱۰) محلول کنترل سطح دو (Control Level 2): یک ویال ۰/۵ میلی لیتری.
- ۱۱) برچسب مخصوص پلیت: یک ورق.
- 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 تأمین نشده در کیت:

- 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 نمایید.
- ۲) کلیه محلول ها تا زمان انقضاء کیت پایدار هستند. از محلول هایی که تاریخ انقضاء آن ها گذشته است استفاده نشود.
- ۳) توجه فرمایید محلول ها در معرض نور مستقیم قرار نگیرند.
- ۴) محتویات این کیت با منشاء انسانی از نظر منفی بودن HIV1/2، HBsAg و HCV بررسی شده اند؛ ولی تشخیص قطعی در مورد منفی بودن تمام عوامل عفونی بیماری زا با استفاده از روش های متداول آزمایشگاهی امکان پذیر نیست. بنابراین با توجه به احتمال آلودگی و بیماری زایی محتویات کیت، تمام مراحل آزمایش باید مطابق با دستورالعمل های ایمنی انجام شوند.
- 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 و از تماس مواد با دهان و سایر مخاط جلوگیری نمایید.
- 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 سرم تازه (حداکثر ۸ ساعت پس از جداسازی 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 گردد. حتی الامکان از نمونه های ایکتریک، لیپمیک و همولیز استفاده نشود.
- 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.
- درب ظرف نمونه ها باید کاملاً بسته باشد. نمونه ها حداکثر تا ۸ ساعت در دمای اتاق و ۲ روز در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد و حداکثر تا ۳ 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 ۲۰ میلی لیتر از محلول شستشو (50X) را به ۹۸۰ 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 نمایید.
- 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 و نمونه ها به دمای اتاق (۲۲ تا ۲۸ درجه سانتی گراد) رسیده اند. کالیبراتورها، نمونه ها و کنترل ها را ۵ بار سر و ته کردن به آرامی یکنواخت کنید
- ۱) تعداد چاهک های مورد نیاز برای انجام آزمایش 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 نمایید.
- ۲) حجم ۲۰ میکرولیتر از کالیبراتورها، نمونه ها و کنترل ها در چاهک های مورد نظر بریزید. بهتر است که از هر نمونه یا کالیبراتور به صورت دوتایی (دوپلیکیت) در چاهک ها ریخته شود.
- ۳) حجم ۱۰۰ میکرولیتر محلول کونژوگه بیوتینی به همه چاهک ها اضافه کنید و پلیت را به مدت ۳۰ ثانیه روی سطح میز به آرامی تکان دهید.
- ۴) چاهک ها را با برچسب مخصوص پلیت ببوشانید و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.
- ۵) محتویات پلیت را با وارونه کردن یا اسپیراسیون تخلیه کنید. سپس چاهک ها را ۵ مرتبه و هر مرتبه با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشو آماده

- مصرف (بخش آماده سازی معرف ها را مطالعه فرمایید) بشوید. 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 نمایید.
- ۶) حجم ۱۰۰ میکرولیتر محلول کونژوگه آنزیمی به همه چاهک ها اضافه کنید. از تکان دادن پلیت در این مرحله خودداری کنید.
- ۷) چاهک ها را با برچسب مخصوص پلیت ببوشانید و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه کنید.
- ۸) چاهک ها را مطابق با بند ۵ شستشو دهید.
- ۹) حجم ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رنگزای 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.
- توجه: اگر بالاترین میزان جذب نوری کالیبراتور کمتر از ۲ به دست آمد، زمان انکوباسیون محلول رنگزا را به مدت ۱۵ دقیقه افزایش دهید.
- ۱۰) حجم ۱۰۰ میکرولیتر محلول متوقف کننده واکنش به تمام چاهک ها اضافه کنید و پلیت را به مدت ۲۰ ثانیه به آرامی تکان دهید تا تمام رنگ آبی آن به زرد تبدیل شود.
- ۱۱) شدت جذب هر چاهک را در طول موج ۴۵۰ نانومتر با استفاده از متد Point to Point حداکثر تا ۱۵ دقیقه بعد از متوقف کردن واکنش اندازه گیری کنید (از طول موج فرانس ۶۲۰ تا ۶۳۰ نانومتر استفاده کنید).
- میزان جذب و نمودار کالیبراتورهای این کیت به عنوان نمونه در زیر ارائه شده است.

Calibrator	Well Number	OD	Mean OD	Conc. (pmol/L)
Cal. A	A1	0.021	0.029	0
	B1	0.037		
Cal. B	C1	0.296	0.301	25
	D1	0.306		
Cal. C	E1	0.949	0.940	100
	F1	0.931		
Cal. D	G1	1.495	1.525	200
	H1	1.555		
Cal. E	A2	2.183	2.203	400
	B2	2.223		
Cal. F	C2	2.789	2.800	800
	D2	2.811		

مطالعات مختلف بررسی پایداری نشان می‌دهد که کیت مورد نظر به مدت ۱۵ ماه پایدار است. معیار پذیرش در آزمایش‌های مربوط به تعیین پایداری، تغییر نتایج کمتر از ۲۰ درصد است.

علامت استفاده شده در پرچسب کالاها

	Manufacturer
	Use-by date
	Batch code
	In vitro diagnostic medical device
	Catalogue number
	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.

توجه: چنانچه از دستگاه‌های الایزا پروسسور استفاده می‌کنید، می‌توانید تنظیمات دستگاه خود را از شرکت دریافت نمایید.

Analyte	Cross Reactivity
CA-125	ND*
CA19-9	ND
CA15-3	ND

*ND: Not Detectable

۶) بررسی تداخلات (Interference)

بر اساس فرمول زیر، درصد تداخلات رایج در سنجش HE4 مورد ارزیابی قرار گرفت:

$$\text{درصد تداخل} = \frac{\text{میانگین غلظت قبل از افزودن آنالیت مداخله گر} - \text{میانگین غلظت بعد از افزودن آنالیت مداخله گر}}{\text{میانگین غلظت قبل از افزودن آنالیت مداخله گر}} \times 100$$

بر اساس نتایج به‌دست‌آمده هموگلوبین تا ۱۰۰۰، بیلی‌روبین تا ۲۰ و تری‌گلیسرید تا ۳۰۰۰ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر تأثیری بر نتیجه سنجش ندارد.

۷) بررسی درستی - مقایسه روش‌ها (Comparison of Methods)

جهت بررسی درستی نتایج این کیت، میزان HE4 در ۱۰۰ نمونه سرم با مقادیر پایین، نرمال و بالا اندازه‌گیری شد و نتایج آن با کیت مرجع مقایسه و ضریب همبستگی بین نتایج به‌دست‌آمده از دو کیت، بر اساس روش پیرسون، ۰/۹۹۹ محاسبه گردید. معیار پذیرش برای این آزمایش به صورت زیر تعریف شده است:

$$0.9 \leq \text{Pearson Correlation Coefficient} \leq 1.0$$

۸) 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 ۰/۶۱۲ pmol/L تعیین گردید.

$$\begin{aligned} \text{LOD} &= \text{LOB} + 1.645 \text{ SD}_b \\ \text{LOB} &= \text{Mean}_b + 1.645 \text{ SD}_b \end{aligned}$$

(s: Diluted sample & b: Blank)

۹) 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.

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 No. of Repeats	1	2	3
Mean HE4 (pmol/L)	38.26	125.80	330.69
SD (pmol/L)	1.76	6.05	13.63
CV (%)	4.6	4.8	4.1

۳) بررسی درستی - آزمون بازیابی (Recovery)

در این تست به ازاء هر آزمون، دو نمونه سرم به نسبت مساوی با یکدیگر ترکیب شده و به‌عنوان یک نمونه، غلظت HE4 در آن سنجش شد. معیار پذیرش در این آزمایش، $\text{Bias} < 10\%$ نسبت به نتیجه مورد انتظار است.

No.	Sample (pmol/L)	Added (pmol/L)	Exp. (pmol/L)	Obs. (pmol/L)	% Rec.
1	39.25	104.50	71.88	69.26	96.4
2	300.56	39.25	169.91	166.66	98.1
3	104.50	300.56	202.53	208.43	102.9

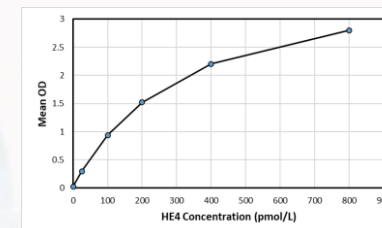
۴) بررسی درستی - آزمون خطی بودن (Linearity)

در این تست غلظت HE4 در رقت‌های مختلف نمونه سرم جهت تعیین خطی بودن کیت، اندازه‌گیری شد. معیار پذیرش در این آزمایش $\text{Bias} < 10\%$ است.

No.	Sample (pmol/L)	1/2	1/4	1/8	1/16
		% Bias			
1	385.42	-2.7	1.4	3.7	2.8
2	252.48	-3.5	-2.2	3.4	3.8
3	119.19	-4.9	2.6	-3.8	-4.6

۵) بررسی ویژگی - آزمون واکنش متقاطع (Cross Reactivity)

واکنش متقاطع ترکیبات مشابه با HE4 توسط اضافه کردن غلظت‌های مختلفی از این ترکیبات به سرم و اندازه‌گیری نسبت بین مقدار ماده مداخله‌گر به مقدار HE4 مورد نیاز برای ایجاد همان مقدار جذب، سنجش شد. نتایج این بررسی نشان می‌دهد که این ترکیبات با آنتی‌بادی HE4 واکنش متقاطع ندارند. معیار پذیرش واکنش متقاطع (بسته به نوع آنالیت و ماده اضافه شده) برای آنالیت در محدوده 10 ± 100 درصد و برای ماده اضافه شده حداکثر تا ۲۵ درصد است.



مقادیر مورد انتظار برای تست الایزای HE4

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

Normal Range (pmol/L)	
Healthy Premenopausal Women	Up to 70
Healthy Postmenopausal Women	Up to 140

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 HE4 (pmol/L)	41.77	136.86	352.93
SD (pmol/L)	1.81	6.04	14.09
CV (%)	4.3	4.4	4.0