

MONOKIT

کیت اندازه گیری CA 19-9 در سرم انسان
CA 19-9 ELISA test kit 96t
Cat. No: 4034-96 / B0 (1402/10/04)

مقدمه:

CA19-9 یک تومور مارکر با ساختار گلیکوپروتئینی بوده که بر روی غشای برخی از سلول‌های سرطانی دیده می‌شود و در تشخیص، ارزیابی پاسخ بیمار به درمان و مراقبت بیماران مبتلا به سرطان پانکراس و کبد کاربرد دارد. افزایش سطح سرمی CA19-9 در کارسینوما پانکراس، وجود توده در پانکراس و انسداد مجاری صفراوی مشاهده می‌شود که می‌تواند در تشخیص افتراقی آن‌ها از پانکراتیت‌های خوش‌خیم کمک کند. اندازه‌گیری سطح CA19-9 در مراقبت پس از درمان افرادی که سرطان پانکراس یا هیپاتوبیلیاری داشته‌اند نیز مؤثر است. حیطة کاربرد این کیت اندازه‌گیری سطح CA19-9 در نمونه‌های سرمی انسان به روش الایزا می‌باشد.

اصول آزمایش:

این آزمایش براساس الایزای غیر مستقیم طراحی شده است. در این آزمایش، نمونه‌ها، کالیبراتورها و کنترل‌ها به چاهک‌های کوت شده با آنتی بادی ضد CA19-9 اضافه می‌شوند. در زمان انکوباسیون اول، آنتی‌ژن‌های CA19-9 موجود در نمونه‌های سرم، کالیبراتور و کنترل مثبت در کف چاهک‌ها تثبیت می‌گردند. پس از شستشو و حذف اجزاء متصل نشده، با اضافه شدن کوژوگه آنزیمی (حاوی آنتی‌بادی ضد ایمونوگلوبولین انسانی متصل به آنزیم HRP) کمپلکس‌های ایمنی تشکیل می‌شوند. افزودن محلول رنگزا (سوبسترای آنزیم HRP) و سپس محلول متوقف کننده محصول نهایی را تولید می‌کند که بیشترین جذب نوری را در طول موج ۴۵۰ نانومتر دارد. شدت جذب نوری هر چاهک با غلظت آنتی‌ژن‌های CA19-9 موجود در آن ارتباط مستقیم دارد. در نهایت غلظت CA19-9 در هر نمونه توسط منحنی استاندارد محاسبه می‌شود.

محتویات کیت:

- ۱) میکرو پلیت ۹۶ تستی حاوی آنتی بادی ضد CA19-9 تثبیت شده.
 - ۲) کالیبراتورها (CA 19-9 Cal A-F): شش ویال با غلظت‌های ۰.۰۱، ۰.۰۵، ۱.۰۰، ۲۵۰ و ۵۰۰ U/ml.
 - ۳) کوژوگه آنزیمی (CA 19-9 Enzyme Conjugate): یک ویال ۱۱ میلی‌لیتری حاوی آنتی‌بادی متصل به آنزیم HRP در بافر.
 - ۴) محلول شستشو (Wash Solution-50X): یک ویال ۲۰ 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): یک ویال ۰/۵ میلی‌لیتری.
 - ۹) محلول کنترل سطح دو (Control Level 2): یک 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 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 نمایید.
- ۲) کلیه محلول‌ها تا زمان انقضاء کیت پایدار هستند. از محلول‌هایی که تاریخ انقضاء آن‌ها گذشته است استفاده نشود.
- 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 جلوگیری نمایید.

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 گردد. حتی الامکان از نمونه‌های ایکتریک، لیپمیک و همولیز استفاده نکنید.
- ۲) درب ظرف نمونه‌ها باید کاملاً بسته باشد. نمونه‌ها به‌مدت ۸ ساعت در دمای اتاق و حداکثر تا ۷ روز در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد و حداکثر تا سه 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 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 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 رنگزای A و B را با حجم‌های مساوی (۱:۱) مخلوط کنید (به‌عنوان مثال، برای تهیه ۲ میلی‌لیتر محلول آماده مصرف، ۱ میلی‌لیتر از محلول رنگزای A را به ۱ میلی‌لیتر از محلول رنگزای 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 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) پلیت را به مدت ۳۰ ثانیه به‌آرامی تکان دهید.
- ۴) چاهک‌ها را با برچسب مخصوص پلیت ببوشانید و به‌مدت ۳۰ 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 به آرامی پلیت را بر روی دستمال رطوبت‌گیر بزنید. به‌منظور انجام شستشوی مناسب و استاندارد چاهک‌ها، مطابق با فیلم قرار داده شده در وب‌سایت شرکت اقدام کنید.

- ۶) حجم ۱۰۰ میکرولیتر از کوژوگه آنزیمی به هر چاهک اضافه نمایید. از تکان دادن پلیت در این مرحله خودداری کنید.
- ۷) چاهک‌ها را با برچسب مخصوص پلیت ببوشانید و به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.









- ۸) چاهک‌ها را مطابق بند ۵ شستشو دهید.
 - ۹) 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 نمایید.
- توجه:** اگر بالاترین میزان جذب کالیبراتور کمتر از ۲ به‌دست آمد، می‌توانید زمان انکوباسیون محلول رنگزا را به‌مدت ۱۰ دقیقه افزایش دهید.

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

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

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

ویژگی این آزمایش به کمک اضافه کردن غلظت‌های مختلفی از مواد مندرج در جدول زیر به نمونه‌های سرم، ارزیابی شده است. واکنش متقاطع با اندازه‌گیری نسبت بین مقدار ماده اضافه شده به مقدار CA 19-9 مورد نیاز برای ایجاد همان مقدار جذب، بررسی شده است. معیار پذیرش واکنش متقاطع (بسته به نوع آنالیت و ماده اضافه شده) برای آنالیت در محدوده 100 ± 10 درصد و برای ماده اضافه شده حداکثر تا ۲۵ درصد است.

Analyte	Cross Reactivity (%)
CA 19-9	100
CA 125	0.001
CA 15-3	ND*
PSA	ND
AFP	ND
CEA	ND
HCG	ND
RF	ND

*ND: Not Detectable

(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 به‌مدت ۱۸ ماه 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 نوبت‌کاری (۵ بار تکرار برای هر نمونه در هر نوبت‌کاری) انجام شد. معیار پذیرش در این آزمایش $CV < 16\%$ است.

Serum Sample	1	2	3
No. of Repeats	20	20	20
Mean CA19-9 (U/mL)	9.2	41.6	83
SD (U/mL)	0.57	2.46	4.82
CV (%)	6.2	5.9	5.8

(۳) بررسی درستی-آزمون بازیابی (Recovery)

در این آزمایش به ازاء هر آزمون، دو نمونه سرم به‌نسبت مساوی با یکدیگر ترکیب گردیده و به‌عنوان یک نمونه غلظت CA 19-9 در آن اندازه‌گیری شد. معیار پذیرش در این آزمایش $Bias < 32.87\%$ است.

No.	Sample (U/mL)	Added (U/mL)	Exp. (U/mL)	Obs. (U/mL)	% Rec.
1	14	72	43	44.6	103.7
2	69.18	31	50.1	50.1	100
3	31	18	24.5	24.2	98.7

(۴) درستی-آزمون خطی بودن (Linearity)

در این تست، غلظت CA 19-9 در رقت‌های مختلف نمونه سرم برای تعیین خطی بودن کیت اندازه‌گیری شد. معیار پذیرش در این آزمایش $Bias < 32.78\%$ است.

No.	Sample (U/mL)	% Bias			
		1/2	1/4	1/8	1/16
1	38.1	1.1	-1.5	2.5	1.6
2	54.6	1.8	-2.3	-3.2	1.1
3	97.2	-2.9	3.4	3.8	-2.6

(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 $2/0 \text{ U/mL}$ تعیین گردید.

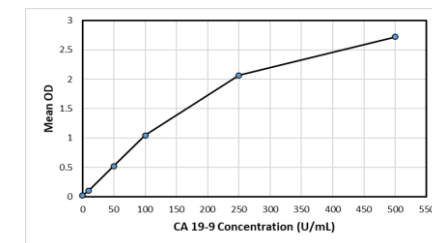
$$LOD = LOB + 1.645 SD_s$$

$$LOB = Mean_b + 1.645 SD_b$$

(s: Diluted sample & b: Blank)

(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 طول‌موج فرانس 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	0.023	0.025	0
	B1	0.027		
Cal. B	C1	0.102	0.106	10
	D1	0.110		
Cal. C	E1	0.517	0.523	50
	F1	0.529		
Cal. D	G1	1.032	1.044	100
	H1	1.056		
Cal. E	A2	2.047	2.066	250
	B2	2.085		
Cal. F	C2	2.694	2.723	500
	D2	2.752		



مقادیر مورد انتظار برای تست ایزای CA 19-9

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

افراد سالم و زنان غیر باردار	$\leq 37 \text{ U/mL}$
------------------------------	------------------------

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 $CV < 16\%$ است.

Serum Sample	1	2	3
No. of Repeats	20	20	20
Mean CA19-9 (U/mL)	18.4	39.6	97.5
SD (U/mL)	0.99	1.84	4.23
CV (%)	5.4	4.6	4.3