ایده آل تشخیص آتیه

کیت اندازه‌گیری HE4 در سرم انسان
Human Epididymis Protein 4 (HE4) ELISA Kit
Cat. No: 8524-96 / Rev: B1 (1404/09/08)

مقدمه:

پروتئین ترشحی اپی‌دیدیم انسانی (HE4) متعلق به خانواده پروتئینی WAP four-disulfide core (WFDC) است که بیان افزایش یافتهٔ آن در انواع مختلف سرطان اپی‌تلیال تخمدان شامل سرطان سروز، سرطان آندومتریوئید و سرطان سلول شفاف مشاهده شده است. اندازه‌گیری سطح سرمی HE4 به‌منظور نظارت بر روند درمان و بهبود سرطان تخمدان و تشخیص عود یا پیشرفت بیماری در افرادی که سابقه افزایش این بیومارکر را داشته‌اند، کاربرد دارد. حیطه کاربرد این کیت، اندازه‌گیری کمی غلظت HE4 در سرم انسان به روش الایزا است.

اصول آزمایش:

این آزمایش براساس الایزای ساندویچ طراحی شده است. با اضافه شدن آنتی‌بادی بیوتینیله و سرم حاوی آنتی‌ژن به چاهک، بی‌حرکت‌سازی کمپلکس‌های ایمنی توسط واکنش بین **استرپتاویدین** تثبیت شده در کف چاهک‌ها و آنتی‌بادی بیوتینیله ضد HE4 صورت می‌گیرد. پس از شستشوی چاهک‌ها، آنتی‌بادی متصل به آنزیم HRP اضافه شده و 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 طول‌موج 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 می‌گردد.

محتویات کیت:

۱) میکروپلیت ۹۶ تستی حاوی استرپتاویدین تثبیت شده.
۲) کالیبراتورها (HE4 Cal A – F): شش ویال در غلظت‌های ۰، ۲۵، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰ و ۸۰۰ pmol/L تهیه شده از سرم انسان.
۳) محلول کونژوگه آنزیمی (HE4 Enzyme Conjugate): یک ویال ۱۱ میلی‌لیتری حاوی آنتی‌بادی متصل به آنزیم HRP در بافر.
۴) محلول کونژوگه بیوتینی (HE4 Biotin Conjugate): یک ویال ۱۱ میلی‌لیتری حاوی آنتی‌بادی متصل به بیوتین در بافر.
۵) محلول شستشو (Wash Solution-50X): یک ویال ۲۰ میلی‌لیتری.
۶) محلول رنگزا A (Substrate Solution A): یک ویال ۶/۵ میلی‌لیتری.
۷) محلول رنگزا B (Substrate Solution B): یک ویال ۶/۵ 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) برچسب مخصوص پلیت: یک ورق.
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 شده است.

مواد و وسایل مورد نیاز تأمین نشده در کیت:

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 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 این کیت با منشاء انسانی از نظر منفی بودن HIV1/2، HBsAg 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 توجه به احتمال آلودگی و بیماری‌زایی محتویات کیت، تمام مراحل آزمایش باید مطابق با دستورالعمل‌های 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، 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 نمونه سرم تازه (حداکثر ۸ ساعت پس از جداسازی 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 گردد. حتی الامکان از نمونه‌های ایکتریک، لیپمیک و همولیز استفاده نشود.
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 حداکثر تا ۸ ساعت در دمای اتاق و ۲ روز در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد و حداکثر تا ۳ 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 نمایید.
۲) آماده‌سازی 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.

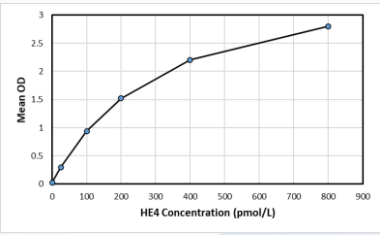
روش انجام آزمایش:

قبل از شروع آزمایش مطمئن شوید که تمام اجزاء کیت و نمونه‌ها به دمای اتاق (۲۲ تا ۲۸ درجه سانتی‌گراد) رسیده‌اند. کالیبراتورها، نمونه‌ها و کنترل‌ها را با ۵ بار سر و ته کردن به آرامی یکنواخت کنید.
۱) تعداد چاهک‌های مورد نیاز برای انجام آزمایش 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 نمایید.
۲) حجم ۲۰ میکرولیتر از کالیبراتورها، نمونه‌ها و کنترل‌ها در چاهک‌های مورد نظر بریزید. بهتر است که از هر نمونه یا کالیبراتور به‌صورت دوتایی (دوپلیکیت) در چاهک‌ها ریخته شود.
۳) حجم ۱۰۰ میکرولیتر محلول کونژوگه بیوتینی به همه چاهک‌ها اضافه کنید و پلیت را به مدت ۳۰ ثانیه روی سطح میز به آرامی تکان دهید.
۴) چاهک‌ها را با برچسب مخصوص پلیت بپوشانید و به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.
۵) محتویات پلیت را با وارونه کردن یا آسپیراسیون تخلیه کنید. سپس چاهک‌ها را ۵ مرتبه و هر مرتبه با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشو آماده مصرف (بخش آماده سازی معرف‌ها را مطالعه بفرمایید) بشویید. اگر شستشو به‌صورت دستی انجام می‌شود در انتهای شستشو به‌آرامی پلیت را بر روی دستمال رطوبت‌گیر بزنید. به‌منظور انجام شستشوی مناسب و استاندارد چاهک‌ها، مطابق با فیلم قرار داده شده در وب‌سایت شرکت[1] اقدام نمایید.
۶) حجم ۱۰۰ میکرولیتر محلول کونژوگه آنزیمی به همه چاهک‌ها اضافه کنید. از تکان دادن پلیت در این مرحله خودداری کنید.
۷) چاهک‌ها را با برچسب مخصوص پلیت بپوشانید و به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه کنید.
۸) چاهک‌ها را مطابق با بند ۵ شستشو دهید.
۹) حجم ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رنگزای آماده مصرف (بخش آماده‌سازی معرف‌ها را مطالعه بفرمایید) درون تمام چاهک‌ها بریزید و پلیت را به‌مدت 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 به‌مدت ۱۵ دقیقه افزایش دهید.
۱۰) حجم ۱۰۰ میکرولیتر محلول متوقف‌کننده واکنش به تمام چاهک‌ها اضافه کنید و پلیت را به‌مدت ۲۰ ثانیه به‌آرامی تکان دهید تا تمام رنگ آبی آن به زرد تبدیل شود.
۱۱) شدت جذب هر چاهک را در طول‌موج ۴۵۰ نانومتر با استفاده از متد Point to Point حداکثر تا ۱۵ دقیقه بعد از متوقف کردن واکنش اندازه‌گیری کنید (از طول‌موج فرانس ۶۲۰ تا ۶۳۰ نانومتر استفاده کنید). میزان جذب و نمودار کالیبراتورهای این کیت به‌عنوان 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		

[1] http://www.idealdiag.com/Training.aspx

ISO13485 KGS



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
UP TO 120 (pmol/L)

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

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 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، 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 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 ۱۰۰±۱۰ درصد و برای ماده اضافه شده حداکثر تا ۲۵ درصد است.

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:

$$\text{درصد تداخل} = \frac{\text{میانگین غلظت قبل از افزودن آنالیت مداخله گر - میانگین غلظت بعد از افزودن آنالیت مداخله گر}}{\text{غلظت آنالیت مداخله‌گر}} \times ۱۰۰$$

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.

$$LOD = LOB + 1.645\ SD_s$$
$$LOB = Mean_b + 1.645\ SD_b$$

(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.

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.

علائم استفاده شده در برچسب کالاها

	Manufacturer
	Use-by date
LOT	Batch code
IVD	In vitro diagnostic medical device
REF	Catalogue number
Σ	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.

دفتر مرکزی: تهران - بزرگراه آبشناسان - سردارجنگل شمالی - خیابان پنج تن - بلوار قدس - کوچه دوم شرقی - پلاک ۸
کارخانه: کرج - کمالشهر، شهرک صنعتی بهارستان، انتهای گلستان دوم غربی، پلاک ۱۱ تلفن: ۲۳-۲۱۸۵۵۱۹۵۱۹.