

کیت اندازه گیری CEA در سرم انسان
CEA ELISA Kit 96t
Cat. No: 1024-96 / Rev: C4 (1405/07/11)

مقدمه:

کارسینو امبریونیک آنتی ژن (CEA) یک گلیکوپروتئین با جرم مولکولی تقریبی ۲۰۰ کیلو دالتون است که در سطح سلول ها بیان می شود. افزایش سطح CEA در سرم با انواع مختلفی از بدخیمی ها شامل آدنوکارسینوما ی کولون، سرطان ریه، سرطان معده و سرطان پستان در ارتباط است. بر این اساس، اندازه گیری سطح CEA در سرم افراد در بررسی شدت گسترش سرطان، درجه تمایز تومور و مکان متاستاز اهمیت دارد. علاوه بر این، در التهاب دستگاه گوارش و ریه، تومورهای خوش خیم کبدی و در افراد مصرف کننده دخانیات نیز سطح CEA افزایش می یابد. حیطه کاربرد این کیت اندازه گیری کمی غلظت CEA در نمونه سرم انسان به روش الایزا است.

اصول آزمایش:

این آزمایش بر اساس الایزای ساندویچ طراحی شده است. بی حرکت سازی کمپلکس های ایمنی در کف چاهک ها توسط واکنش بین استرپتاویدین تثبیت شده در کف چاهک و آنتی بادی بیوتینیل مونوکلونال ضد CEA صورت می گیرد. با مخلوط شدن آنتی بادی بیوتینیل، آنتی بادی متصل به آنزیم HRP و سرم حاوی آنتی ژن، واکنش بین آنتی ژن و آنتی بادی ها بدون هیچ رقابتی صورت می گیرد و کمپلکس ساندویچ به کف چاهک متصل می شود. میزان تشکیل کمپلکس های ایمنی و فعالیت آنزیم، با غلظت CEA سرم ارتباط مستقیم دارد. پس از تخلیه چاهک ها و حذف اجزاء متصل نشده، 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. در نهایت غلظت CEA سرم به کمک منحنی استاندارد محاسبه می گردد.

محتویات کیت:

- ۱) میکروپلیت ۹۶ تستی حاوی استرپتاویدین تثبیت شده
- ۲) کالیبراتور (CEA Cal A-F): شش ویال با غلظت های ۰، ۵، ۱۰، ۲۵، ۷۵ و ۲۵۰ ng/mL، تهیه شده از سرم انسان.

- ۳) کوئزوگه آنزیمی (CEA Enzyme Conjugate): یک ویال ۱۱ میلی لیتری حاوی آنتی بادی متصل به بیوتین و آنتی بادی متصل به آنزیم HRP در بافر.
- ۴) محلول شستشو (Wash solution-50X): یک ویال ۲۰ 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 (Stop Solution): یک ویال ۱۲ میلی لیتری.
- ۸) محلول کنترل (CEA Control): ویال (های) ۰/۵ میلی لیتری.
- ۹) پرچسب 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 و 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) نمونه مناسب برای این آزمایش سرم است. نمونه خون با استفاده از تکنیک استاندارد خون گیری سیه رگی تهیه شود و سرم بعد از لخته شدن کامل خون (۳۰ تا ۶۰ دقیقه) از سلول های خونی جدا گردد. ناشتا بودن فرد به هنگام نمونه گیری در درستی نتایج به دست آمده تأثیرگذار خواهد بود. حتی الامکان از نمونه های ایکتریک، لیپمیک و همولیز استفاده نشود.
- 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. تا ۵ روز می توان نمونه ها را در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد و حداکثر تا ۱ ماه در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری کرد. از منجمد و ذوب کردن مکرر نمونه ها خودداری نمایید.

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 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 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 آزمایش را بردارید و بقیه چاهک ها را به 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 ۲۵ میکرولیتر از کالیبراتورها، نمونه ها یا کنترل 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 محلول کوئزوگه آنزیمی CEA 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 پرچسب مخصوص پلیت بپوشانید و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.

۵) محتویات چاهک ها را با وارونه کردن یا اسپیراسیون تخلیه کنید. سپس چاهک ها را ۳ مرتبه و هر مرتبه با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشوی 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 نمایید.

۶) حجم ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رنگزای آماده شده (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 کالیبراتور کمتر از ۲ به دست آمد، می توانید زمان انکوباسیون محلول رنگزا را به مدت ۱۵ دقیقه افزایش دهید.

۷) حجم ۵۰ 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.

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

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

علامت استفاده شده در برجسب 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

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 پروسور استفاده می‌کنید، می‌توانید تنظیمات دستگاه خود را از شرکت دریافت نمایید.

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

ویژگی این آزمایش با اضافه کردن غلظت‌های مختلفی از مواد مندرج در جدول زیر به نمونه سرم، بررسی شد. واکنش متقاطع با اندازه‌گیری نسبت بین غلظت ماده اضافه شده به غلظت CEA مورد نیاز برای ایجاد همان مقدار جذب مورد ارزیابی گردید. 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.

Analyte	Cross Reactivity	Concentration
Acetylsalicylic Acid	1	100 µg/mL
Ascorbic Acid	<0.0001	100 µg/mL
Caffeine	<0.0001	100 µg/mL
AFP	<0.0001	10 µg/mL
PSA	<0.0001	1.0 µg/mL
CA-125	<0.0001	10.000 IU/mL
hCG	<0.0001	1000 IU/mL
hLH	<0.0001	10 IU/mL
hTSH	<0.0001	100 mIU/mL
hPRL	<0.0001	100 µg/mL

۶) بررسی اثر هوک (Hook Effect)

CEA تا غلظت ۶۰۰۰ ng/mL بررسی گردید و اثر هوک مشاهده نشد.

۷) 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 ۱/۱ ng/mL تعیین گردید.

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

(s: Diluted sample & b: Blank)

۸) 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 به صورت هر سه ماه یک بار می‌باشد.

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 $\text{CV} < 10\%$ است.

Serum Sample	1	2	3
No. of Repeats	20	20	20
Mean CEA (ng/mL)	4.36	8.90	14.21
SD (ng/mL)	0.24	0.41	0.62
CV (%)	5.5	4.6	4.4

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 $\text{CV} < 10\%$ است.

Serum Sample	1	2	3
No. of Repeats	20	20	20
Mean CEA (ng/mL)	3.52	9.83	18.30
SD (ng/mL)	0.24	0.53	0.92
CV (%)	6.8	5.4	5.0

۳) بررسی درستی - آزمون بازیابی (Recovery)

در این تست به ازاء هر آزمون، دو نمونه سرم به نسبت مساوی با یکدیگر ترکیب شد و به‌عنوان یک نمونه، غلظت CEA در آن اندازه‌گیری شد. معیار پذیرش در این آزمایش $\text{Bias} < 14.3\%$ نسبت به نتیجه مورد انتظار است.

No.	Sample (ng/mL)	Added (ng/mL)	Exp. (ng/mL)	Obs. (ng/mL)	% Rec.
1	4.92	8.10	6.51	6.46	99.2
2	7.35	17.61	12.48	12.13	97.2
3	11.92	26.70	19.31	20.15	104.3

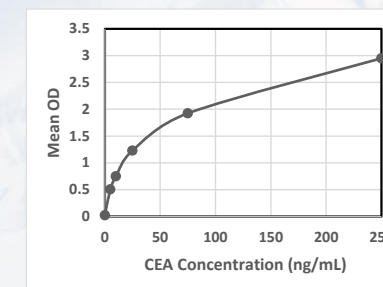
۴) بررسی درستی - آزمون خطی بودن (Linearity)

در این تست غلظت CEA در رقت‌های مختلف نمونه سرم برای تعیین خطی بودن کیت اندازه‌گیری شد. معیار پذیرش خطی بودن در این آزمایش $\text{Bias} < 14.3\%$ است.

No.	Sample (ng/mL)	1/2	1/4	1/8	1/16
1	18.90	-2.9	-0.5	-2.7	-2.0
2	23.52	-1.2	-0.6	1.4	-2.3
3	36.31	3.6	-3.5	-0.8	-0.5

۸) مقدار جذب نوری 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. میزان جذب و نمودار کالیبراتورهای این کیت به‌عنوان نمونه در زیر آورده شده است.

Calibrator	Well Number	OD	Mean OD	Conc. (ng/mL)
Cal. A	A1	0.022	0.025	0
	B1	0.028		
Cal. B	C1	0.505	0.510	5
	D1	0.515		
Cal. C	E1	0.738	0.750	10
	F1	0.762		
Cal. D	G1	1.223	1.231	25
	H1	1.239		
Cal. E	A2	1.903	1.925	75
	B2	1.947		
Cal. F	C2	2.924	2.950	250
	D2	2.976		



مقادیر مورد انتظار برای تست الایزای CEA

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 (ng/mL)
Non-smokers < 5
Smokers < 10