

**کیت اندازه گیری Combi Cancer CEA**  
**Combi Cancer CEA ELISA Kit 96t**  
**Cat. NO: 1524-96**  
**Brochure Rev: 15 (1399/08/11)**

**مقدمه:**

آنتی‌ژن Carcinoembryonic یا CEA یک گلیکوپروتئین ۲۰۰ کیلو دالتونی سطح سلولی است. در سال ۱۹۶۹ گزارشی منتشر شد مبنی بر اینکه CEA پلاسما در ۳۵ مورد از ۳۶ بیمار مبتلا به آدنوکارسینومای کولون بالا رفته و پس از انجام جراحی‌های موفقیت‌آمیز پایین آمده است. اگرچه CEA معمولاً با سرطان کولورکتال (CRC) مرتبط است ولی مقادیر بالای آن در بسیاری از سرطان‌ها نظیر ریه، معده، پانکراس، پستان، تخمدان و سایر اندام‌ها نیز گزارش شده است. همچنین در برخی از بیماری‌های خوش‌خیم نظیر التهاب دستگاه گوارش و ریه و سرطان خوش‌خیم کبد و در افراد سیگاری نیز سطح CEA افزایش می‌یابد. افزایش مقادیر CEA سرم با مرحله و فاز گسترش بیماری، درجه تمایز تومور و مکان متاستاز در ارتباط است.

**اصول آزمایش:**

در این روش، تثبیت و بی‌حرکت سازی کمپلکس‌های ایمنی در سطح چاهک‌ها توسط واکنش بین استرپتاویدین (Streptavidin) کوت شده در کف پلیت و آنتی‌بادی مونوکلونال ضد CEA بیوتینیل شده صورت می‌گیرد. با مخلوط شدن آنتی‌بادی مونوکلونال بیوتینیل شده، آنتی‌بادی متصل به آنزیم HRP و سرم حاوی آنتی‌ژن، واکنش بین آنتی‌ژن و آنتی‌بادی‌ها بدون هیچ رقابتی صورت می‌گیرد و کمپلکس ساندویچ محلولی تشکیل می‌شود.

به موازات واکنش فوق، کمپلکس ایمنی ساندویچ به دلیل تمایل بسیار بالای بین استرپتاویدین و بیوتین، به سطح پلیت متصل می‌شود. میزان تشکیل کمپلکس‌های ایمنی و فعالیت آنزیم، با غلظت CEA سرم ارتباط مستقیم دارد. پس از تخلیه چاهک‌ها و شستشوی اجزاء متصل نشده، سوسیترای آنزیم HRP (محلون رنگزا) درون آنها ریخته می‌شود و محصول آبی رنگی تولید می‌شود که با افزودن محلون متوقف کننده به رنگ زرد تغییر رنگ می‌دهد این محصول در طول موج ۴۵۰ نانومتر بیشترین میزان جذب را دارد. شدت رنگ ایجاد شده و در نتیجه مقدار جذب با غلظت CEA سرم ارتباط مستقیم دارد. در نهایت غلظت CEA سرم به کمک منحنی استاندارد (نمودار کالیبراتورها) محاسبه می‌گردد.

**محتویات کیت:**

۱. میکرو پلیت Coat شده با استرپتاویدین ۹۶ تستی. بسته‌بندی شده در کیسه آلومینیومی همراه با رطوبت‌گیر.
  ۲. کالیبراتورهای CEA در مقادیر ۰، ۵، ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۲۵۰ ng/ml تهیه شده در سرم انسان. کالیبراتورهای موجود در این کیت مطابق با استاندارد بین‌المللی WHO کد ST1 ۳۳/۶۰۱ کالیبره شده است.
  ۳. کوژوگه CEA: ۱ ویال ۸ میلی‌لیتری که حاوی آنتی‌بادی‌های متصل به بیوتین و متصل به آنزیم HRP در بافر است.
  ۴. محلون شستشو (۵۰ X): ۱ ویال ۲۰ میلی‌لیتری.
  ۵. محلون رنگزا A: ۱ ویال ۶/۵ میلی‌لیتری.
  ۶. محلون رنگزا B: ۱ ویال ۶/۵ میلی‌لیتری.
  ۷. محلون متوقف کننده واکنش: ۱ ویال ۱۲ میلی‌لیتری.
  ۸. محلون کنترل: ۱ ویال ۰/۵ میلی‌لیتری.
  ۹. برجسب مخصوص پلیت ۱ ورق.
- توجه: کلیه محلون‌ها در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شوند. محلون متوقف کننده در دمای اتاق نیز قابل نگهداری است.

**احتیاط در استفاده از کیت:**

۱. محتویات این کیت برای استفاده در همین کیت تعبیه گردیده لذا از استفاده مشترک با سایر کیت‌ها و یا شماره‌های ساخت دیگر جدا خودداری نمایید.
۲. کلیه محلون‌ها تا زمان انقضاء کیت پایدار هستند. از محلون‌هایی که تاریخ انقضاء آنها گذشته است، استفاده ننمایید.
۳. توجه فرمایید محلون‌ها در مجاورت نور و گرما قرار نگیرند.
۴. محتویات کیت منبع انسانی دارد. مواد مورد استفاده برای تولید این کیت از نظر منفی بودن HBsAg، HIV 1/2 و HCV تست شده‌اند. در هر حال هیچ روشی به طور کامل قادر به مشخص کردن منفی بودن موارد فوق نیست. بنابراین لازم است بالقوه آلوده در نظر گرفته شود و کار با آنها باید طبق دستورالعمل‌های ایمنی انجام شود.
۵. استفاده از دستکش و عینک در هنگام کار الزامی است.
۶. در هنگام کار با کیت دقت فرمایید که محتویات به صورت یا سایر نقاط بدن نباشد و از تماس با دهان و سایر مخاط جدا خودداری گردد.

**جمع‌آوری و آماده‌سازی نمونه:**

۱. گرفتن خون باید با استفاده از تکنیک استاندارد خون‌گیری سیاهرگی انجام شده و به سرعت سرم از سلول‌ها جدا گردد.
- توجه: از انجام تست بر روی نمونه‌های لیمپیک همراه با کدورت و همولیز خودداری نمایند. نمونه‌های پلاسما جهت انجام این تست مناسب نمی‌باشند.
۲. درب ظروف نمونه باید کاملاً بسته باشد و تا ۵ روز می‌توان آنها را در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد و برای مدت طولانی‌تر حداکثر ۱ ماه در دمای ۲۰ - درجه سانتی‌گراد نگهداری کرد.

**آماده‌سازی معرف‌ها:**

محلون شستشو: کل محتویات ویال محلون شستشو (۵۰ X) را با ۹۸۰ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط کنید.

محلون رنگزا: ۱ میلی‌لیتر از محلون رنگزا A را با ۱ میلی‌لیتر از محلون رنگزا B مخلوط نمایید. محلون فوق پس از ۱۰ دقیقه قابل استفاده و برای ۲ ردیف کافی می‌باشد.

توجه: در صورت مشاهده رنگ آبی در محلون رنگزا و یا کدورت و رشد باکتری، از این محلون استفاده نشود.

**روش انجام آزمایش:**

قبل از شروع آزمایش اطمینان حاصل کنید که کلیه کالیبراتورها، معرف‌ها و نمونه‌ها به دمای اتاق (۲۵-۲۰ درجه سانتی‌گراد) رسیده‌اند. کلیه کالیبراتورها را با سر و ته کردن به آرامی مخلوط نمایید.

۱. تعداد چاهک‌های مورد نیاز برای انجام آزمایش را برداشته و بقیه چاهک‌ها را همراه رطوبت‌گیر در کیسه آلومینیومی قرار داده درب آن را بسته و در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهدارید.
۲. ۲۵ میکرولیتر از کالیبراتورها، نمونه‌ها و محلون کنترل در چاهک‌های مورد نظر بریزید. بهتر است که از هر نمونه یا کالیبراتور به صورت (Duplicate) در چاهک‌ها ریخته شود.
- توجه: حتماً چاهک اول به عنوان بلانک در نظر گرفته شود. در این چاهک نمونه و یا کالیبراتور ریخته نشود. بقیه مراحل با سایر چاهک‌ها یکسان می‌باشد.
۳. ۱۰۰ میکرولیتر از محلون آنزیم کوژوگه (Enzyme Conjugate) به همه چاهک‌ها اضافه کنید و پلیت را به مدت ۳۰ ثانیه روی سطح میز به آرامی تکان دهید.
۴. چاهک‌ها را با جسب مخصوص پلیت بیوشانید و به مدت ۶۰ دقیقه (±۱۰ دقیقه) در دمای اتاق انکوبه نمایید.

**Hook effect**

در بررسی اثر هوک CEA تا غلظت 60000 ng/ml بررسی گردید که اثر هوک مشاهده نشد.

**Sensitivity**

بر اساس جمع معدل جذب نوری استاندارد صفر و سه برابر انحراف معیار حداقل غلظت قابل تشخیص در این کیت 1/1 ng/ml می‌باشد.

**Recovery**

در این تست دو نمونه سرم به نسبت مساوی با یکدیگر ترکیب شد و به عنوان یک نمونه، غلظت CEA در آن اندازه‌گیری شد.

NO.	Sample (ng/ml)	Added (ng/ml)	Exp. (ng/ml)	Obs. (ng/ml)	Rec. (%)
1	4.9	8.1	6.5	6.4	98.5
2	7.3	17.6	12.45	12.13	98.6
3	11.9	26.7	19.3	20.1	104.1
4	25.3	46.2	35.75	37.5	104.9

**Linearity**

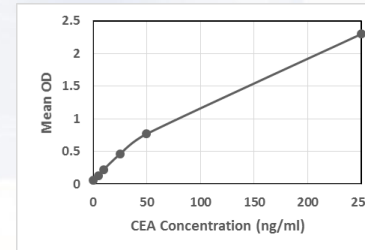
در این تست غلظت CEA در رقت‌های مختلف نمونه سرم برای تعیین خطی بودن کیت اندازه‌گیری شد.

NO.	Sample	Recovery %			
		1/2	1/4	1/8	1/16
1	18.9	97.1	99.5	97.3	98
2	23.5	98.8	99.4	101.4	97.7
3	36.3	103.6	95.3	98.2	99.5
4	47.3	99.5	101.5	97.8	99.1

**Specificity**

اختصاصیت این آزمایش با کمک اضافه کردن غلظت‌های مختلفی از مواد مداخله‌گر به سرم، مورد سنجش قرار گرفت. واکنش متقاطع با اندازه‌گیری نسبت بین دوز ماده مداخله‌گر به دوز CEA مورد نیاز برای ایجاد همان مقدار جذب مورد سنجش قرار گرفت.

Analyte	Cross Reactivity	Concentration
Acetylsalicylic Acid	1	100µg/ml
Ascorbic Acid	<0.0001	100µg/ml
Caffeine	<0.0001	100µg/ml
AFP	<0.0001	10µg/ml
PSA	<0.0001	1.0µg/ml
CA-125	<0.0001	10.000 U/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



**مقادیر مورد انتظار برای تست الیزای CEA**

<b>Expected Value</b>
<b>Non Smokers &lt; 5 ng/ml</b>
<b>Smokers &lt; 10 ng/ml</b>

**پارامترهای کنترل کیفی**

**Intra - Assay**

دقت داخلی با ارزیابی تکرارپذیری سه نمونه سرم در یک نوبت تست انجام گردید.

Serum sample	1	2	3
No.of Repeats	20	20	20
Mean CEA (ng/ml)	4.36	8.9	15.2
S.D (ng/ml)	0.24	0.41	0.72
C.V (%)	5.5	4.6	4.7

**Inter - Assay**

ارزیابی دقت بین‌تستی با سه نمونه متفاوت سرم در 3 نوبت هر نوبت 5 بار انجام پذیرفت.

Serum sample	1	2	3
No.of Repeats	15	15	15
Mean CEA (ng/ml)	3.5	9.8	18.3
S.D. (ng/ml)	0.24	0.73	0.92
C.V (%)	6.8	7.4	5

5. محتویات چاهک‌ها را تخلیه کنید. سپس چاهک‌ها را 5 مرتبه و هر مرتبه با 300 میکرولیتر محلول شستشو بشویید. اگر شستشو به صورت دستی انجام می‌شود در انتهای شستشو به آرامی پلست را بر روی دستمال رطوبت‌گیر بزنید.

6. 100 میکرولیتر از محلول رنگزا درون تمام چاهک‌ها بریزید و پلست را به مدت 15 دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه کنید. از تکان دادن پلست در این مرحله خودداری کنید.

توجه: اگر بالاترین میزان جذب کالیبراتور کمتر از 2 به دست آمد، می‌توانید زمان انکوباسیون محلول رنگزا را به مدت 10 دقیقه افزایش دهید.

8. 50 میکرولیتر محلول متوقف‌کننده واکنش به کلیه چاهک‌ها اضافه کنید و پلست را به مدت 20 ثانیه به آرامی تکان دهید تا تمام رنگ آبی آن به زرد تبدیل شود.

9. مقدار جذب را برای هر چاهک در طول موج 450 نانومتر با استفاده از متد Point to Point حداکثر تا 15 دقیقه بعد از متوقف کردن واکنش بخوانید. از طول موج فرانس 620 تا 630 نانومتر استفاده کنید. میزان جذب و نمودار کالیبراتورهای این کیت به عنوان نمونه در زیر آورده شده است.

Calibrators	Well Number	Abs	Mean Abs	Value (ng/ml)
Cal A	A1	0.056	0.053	0
	B1	0.050		
Cal B	C1	0.138	0.132	5
	D1	0.127		
Cal C	E1	0.214	0.223	10
	F1	0.233		
Cal D	G1	0.450	0.458	25
	H1	0.466		
Cal E	A2	0.748	0.770	50
	B2	0.792		
Cal F	C2	2.276	2.302	250
	D2	2.328		