ایده‌آل تشخیص آتیه

کیت اندازه‌گیری CEA در سرم انسان
CEA ELISA Kit 96t
Cat. No: 1024-96 / Rev: A3 (1402/09/22)

مقدمه:
کارسینو امبریونیک آنتی‌ژن (CEA) یک گلیکوپروتئین با جرم مولکولی تقریبی ۲۰۰ کیلودالتون است که در سطح سلول‌ها بیان می‌شود. افزایش سطح CEA در سرم با انواع مختلفی از بدخیمی‌ها شامل آدنوکارسینومای کولون، سرطان ریه، سرطان معده و سرطان پستان در ارتباط است. بر این اساس، اندازه‌گیری 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 خوش‌خیم کبدی و در افراد مصرف کننده دخانیات نیز سطح CEA افزایش می‌یابد. حیطه کاربرد این کیت اندازه‌گیری کمی غلظت CEA در نمونه سرم انسان به روش الایزا است.

اصول آزمایش:
این آزمایش بر اساس الایزای ساندویچ طراحی شده است. بی‌حرکت‌سازی کمپلکس‌های ایمنی در کف چاهک‌ها توسط واکنش بین **استرپتاویدین** تثبیت شده در کف چاهک و آنتی‌بادی بیوتینیله مونوکلونال ضد CEA صورت می‌گیرد. با مخلوط شدن آنتی‌بادی بیوتینیله، آنتی‌بادی متصل به آنزیم HRP و سرم حاوی آنتی‌ژن، واکنش بین آنتی‌ژن و آنتی‌بادی‌ها بدون هیچ رقابتی صورت می‌گیرد و کمپلکس ساندویچ به کف چاهک متصل می‌شود. میزان تشکیل کمپلکس‌های ایمنی و فعالیت آنزیم، با غلظت CEA سرم ارتباط مستقیم دارد. پس از تخلیه چاهک‌ها و حذف اجزاء متصل نشده، با افزودن محلول رنگزا (سوبسترای آنزیم HRP) و سپس محلول متوقف کننده، محصول نهایی تولید می‌شود که بیشترین جذب نوری را در طول‌موج ۴۵۰ نانومتر دارد. در نهایت غلظت CEA سرم به کمک منحنی استاندارد محاسبه می‌گردد.

محتویات کیت:
۱) میکروپلیت ۹۶ تستی حاوی استرپتاویدین تثبیت شده.
۲) کالیبراتور (CEA Cal A-F): شش ویال با غلظت‌های ۰، ۵، ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۲۵۰ ng/mL، تهیه شده از سرم انسان.
۳) کونژوگه آنزیمی (CEA Enzyme Conjugate): یک ویال ۱۱ میلی‌لیتری حاوی آنتی‌بادی متصل به بیوتین و 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 (Stop Solution): یک ویال ۱۲ میلی‌لیتری.
۸) محلول کنترل (CEA Control): ویال(های) ۰/۵ میلی‌لیتری.
۹) 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 کنترل(ها) 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 امکان پذیر 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 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، 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) نمونه مناسب برای این آزمایش سرم است. 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. ناشتا بودن فرد به هنگام نمونه‌گیری در درستی نتایج به‌دست آمده تأثیرگذار خواهد بود. 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. تا ۵ روز می‌توان نمونه‌ها را در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد و حداکثر تا ۱ ماه در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری کرد. از منجمد و ذوب کردن مکرر نمونه‌ها خودداری نمایید.

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 بن ماری 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 رنگزا A و B را با حجم‌های مساوی (۱:۱) مخلوط کنید (به‌عنوان مثال، برای تهیه ۲ میلی‌لیتر محلول آماده مصرف، ۱ میلی‌لیتر از محلول رنگزا A را به ۱ میلی‌لیتر از محلول رنگزا 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، کنترل ها و نمونه ها را با ۵ بار سر و ته کردن به‌آرامی یکنواخت کنید.
۱) تعداد چاهک‌های مورد نیاز برای انجام آزمایش را بردارید و بقیه چاهک‌ها را به‌همراه رطوبت‌گیر در کیسه آلومینیومی قرار دهید، درب آن را بسته و در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری نمایید.
۲) حجم ۲۵ میکرولیتر از کالیبراتورها، نمونه‌ها یا کنترل در چاهک‌های مورد نظر بریزید. بهتر است که از هر نمونه، کنترل یا کالیبراتور به‌صورت دوتایی (دوپلیکیت) در چاهک‌ها ریخته شود.
۳) حجم ۱۰۰ میکرولیتر از محلول کونژوگه آنزیمی CEA به همه چاهک‌ها اضافه کنید و پلیت را به‌مدت ۳۰ ثانیه روی سطح میز به آرامی تکان دهید.
۴) چاهک‌ها را با برچسب مخصوص پلیت بپوشانید و به‌مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.
۵) محتویات چاهک‌ها را با وارونه کردن یا آسپیراسیون تخلیه کنید. سپس چاهک‌ها را ۳ مرتبه و هر مرتبه با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشوی آماده شده (بخش آماده‌سازی 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 از محلول رنگزای آماده شده (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 کالیبراتور کمتر از ۲ به دست آمد، می‌توانید زمان انکوباسیون محلول رنگزا را به‌مدت ۱۰ دقیقه افزایش دهید.
۷) حجم ۵۰ میکرولیتر محلول متوقف‌کننده واکنش به تمام چاهک‌ها اضافه کنید و پلیت را به‌مدت ۲۰ ثانیه به آرامی تکان دهید تا تمام رنگ آبی آن به زرد تبدیل شود.

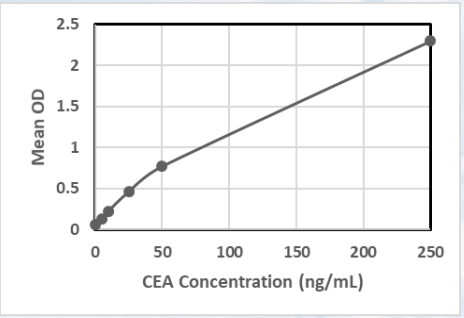
1. http://www.idealdiag.com/Training.aspx

ISO13485 KGS

ایده آل تشخیص آتیه

۸) مقدار جذب نوری را برای هر چاهک در طول‌موج ۴۵۰ نانومتر با استفاده از متد Point to Point حداکثر تا ۱۵ دقیقه بعد از متوقف کردن واکنش بخوانید. از طول‌موج رفرانس ۶۲۰ تا۶۳۰ 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	0.056	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		



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

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 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 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 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 Bias<14.3 % است.

No.	Sample (ng/mL)	1/2	1/4	1/8	1/16
		% Bias			
1	18.90	-2.9	-0.5	-2.7	-2.0
2	23.5 2	-1.2	-0.6	1.4	-2.3
3	36.31	3.6	-3.5	-0.8	-0.5

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 ۱۰۰±۱۰ 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 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

۶) بررسی اثر هوک (Hook Effect)

CEA تا غلظت ۶۰۰۰۰ 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.

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

(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 به‌صورت هر سه ماه یک بار می‌باشد.

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

علائم استفاده شده در برچسب 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
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.

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 ۱۳ تلفن: ۲۳-۲۱۸۵۵۱۹۵۱۹.