

# MONOKIT

کیت اندازه‌گیری CEA در سرم انسان  
**CEA ELISA Kit 96t**  
Cat. No: 1034-96 / Rev: A1 (1402/09/25)

## 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 الایزا ساندویچ طراحی شده است. بی‌حرکت‌سازی کمپلکس‌های ایمنی 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 متوقف‌کننده، محصول نهایی تولید می‌شود که بیشترین جذب نوری را در طول موج 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 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 برگه 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 کیت‌ها و یا شماره‌های ساخت دیگر جداً خودداری نمایید.
- ۲) کلیه محلول‌ها تا زمان انقضای کیت پایدار هستند. از محلول‌هایی که تاریخ انقضای 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 جداً جلوگیری نمایید.
- ۶) نمونه بیماران، کنترل‌ها، چاهک‌ها و سرسمپلرهای 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 ( $>5 \text{ mg/day}$ ) 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 نمایید.
- 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، کنترل‌ها و نمونه‌ها را با ۵ بار سر و ته کردن به آرامی یکنواخت نمایید
- 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 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 ببوشانید و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.
  - ۵) محتویات چاهک‌ها را با وارونه کردن یا اسپیراسیون تخلیه کنید. سپس چاهک‌ها را ۳ مرتبه و هر مرتبه با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشوی 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 بریزید. به‌منظور انجام شستشوی مناسب و استاندارد چاهک‌ها، مطابق با فیلم قرار داده شده در وب‌سایت شرکت اقدام نمایید.
  - ۶) حجم ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رنگزا آماده شده (بخش آماده‌سازی معرف‌ها را مطالعه فرمایید) 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.
  - 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 رفرانس ۶۲۰ تا ۶۳۰ نانومتر استفاده کنید). میزان جذب و نمودار کالیبراتورهای این کیت به‌عنوان نمونه در زیر آورده شده است.

<sup>1</sup> <http://www.samantajhiz.com/Support.aspx>

علائم استفاده شده در برچسب کالاها

<b>EC REP</b>	Authorized representative in the European community
	Manufacturer
	Use-by date
<b>LOT</b>	Batch code
<b>IVD</b>	In vitro diagnostic medical device
<b>CE</b>	European conformity
<b>OBL</b>	Own brand Labeling
	Contains sufficient for tests
	Temperature limit
	Date of manufacture

References:

- McPherson R, Pincus M. Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. Elsevier Health Sciences; 2021.
- Pagana KD. Mosby's manual of diagnostic and laboratory tests. Elsevier Health Sciences; 2013.
- 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.

۶) بررسی اثر هوک (Hook Effect)

در این آزمایش CEA تا غلظت 6000 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 1/1 ng/mL تعیین گردید.

$$\text{LOD} = \text{LOB} + 1.645 \text{ SD}_s$$

$$\text{LOB} = \text{Mean}_b + 1.645 \text{ SD}_b$$

(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 به صورت هر سه ماه یک بار می‌باشد.  
 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.

۲) بررسی دقت-آزمون دقت بین دور (Between-Run)

دقت بین دور با ارزیابی تجدیدپذیری نتایج حاصل از سه نمونه سرم با غلظت‌های متفاوت در ۴ نوبت کاری (۵ بار تکرار برای هر نمونه در هر نوبت کاری) 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)	4.13	28.41	58.50
SD (ng/mL)	0.23	1.39	2.62
CV (%)	5.6	4.9	4.5

۳) بررسی درستی-آزمون بازیابی (Recovery)

در این آزمایش به ازاء هر آزمون، دو نمونه سرم به نسبت مساوی با یکدیگر ترکیب شد و به عنوان یک نمونه، غلظت CEA در آن اندازه‌گیری شد. 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	5.42	27.30	16.36	16.94	103.5
2	8.31	32.6	20.45	19.83	96.9
3	16.84	46.40	31.62	30.98	98.0

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.

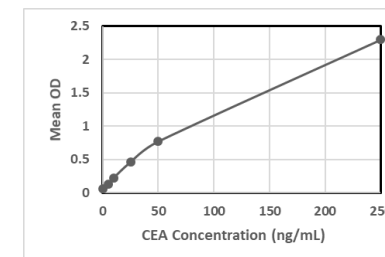
No.	Sample (ng/mL)	% Bias			
		1/2	1/4	1/8	1/16
1	24.51	-0.9	-1.0	3.4	-2.4
2	31.70	0.1	-2.6	-3.0	-3.0
3	42.33	3.8	-1.8	-0.8	-3.5

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، مورد سنجش قرار گرفت. واکنش متقاطع با اندازه‌گیری نسبت بین دوز ماده اضافه شده به دوز CEA مورد نیاز برای ایجاد همان مقدار جذب مورد سنجش قرار گرفت. معیار پذیرش واکنش متقاطع (بسته به نوع آنالیت و ماده اضافه شده) برای آنالیت در محدوده  $10 \pm 10\%$  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

Calibrator	Well Number	OD	Mean OD	Conc. (ng/mL)
Cal. A	A1	0.046	0.049	0
	B1	0.052		
Cal. B	C1	0.139	0.148	5
	D1	0.157		
Cal. C	E1	0.215	0.230	10
	F1	0.245		
Cal. D	G1	0.471	0.488	25
	H1	0.505		
Cal. E	A2	0.755	0.802	50
	B2	0.849		
Cal. F	C2	2.336	2.410	250
	D2	2.484		



مقادیر مورد انتظار برای تست ایزای 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 درون دور (Within-Run)

دقت درون دور با ارزیابی تکرارپذیری نتایج حاصل از سه نمونه سرم با غلظت‌های متفاوت در یک نوبت کاری (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)	5.46	14.30	32.41
SD (ng/mL)	0.29	0.66	1.51
CV (%)	5.3	4.6	4.6

www.samantajhiz.com

تهران- بزرگراه آشناسان- سردار جنگل شمالی- خیابان

پنج تن- بلوار قدس- کوچه دوم شرقی- پلاک ۸

تلفن: ۰۲۱۸۵۵۱۸۰۰۰