کیت ایمونو آنزیماتیک (EIA) پادتن علم (۹۶تستی)

کارسینو اِمبریونیک آنتی ژن (CEA)

موارد استفاده :

تعیین کمّی CEA در سرم یا پلاسما

I. مقدمه :

کارسینوامبریونیکآنتی ژن(CEA)، گلیکوپروتئین توموری با منشاء جنینی است که در سال ۱۹۶۵ توسط گلد و فریمن کشف شد[۱-۲]. ۴۵٪ تا ۵۵٪ این مولکول را کربوهیدرات تشکیل داده و وزن مولکولی آن 300kDa- 155kDa می باشد[۳]. CEA با دیگر مولکولها از جمله NCA (Non-specific Cross-reacting Antigen) شباهت ساختمانی زیادی داشته و جملگی از اعضای خانواده CEA ها به شمار می آیند. همچنین این آنتی ژن به دلیل تشابه ساختمانی با زنجیرهٔ سنگین IgG، جزئی از خانوادهٔ ایمونوگلبولین ها نیز محسوب می شود. CEA در طول دوران جنینی توسط سلولهای اپی تلیوم اندومتر و پس از تولد عمدتاً در سلولهای سرطانی با منشاء لولهٔ گوارشی تولید می شود[۴]. در سرطانهای غیر منشاء گوارشی از جمله سرطان ریه، معده، سینه، پانکراس، تخمدان و رحم نیز غلظتهای بالای CEA دیده می شود[۵-۷]. علاوه بر سرطانهای مذکور، در مواردی از قبیل سیروز کبدی، آنفیزم‌ریوی، پولیپ مقعد، بیماریهای خوش خیم سینه و کولیت زخمی هم میزان CEA در خون افزایش می یابد. غلظت CEA در سرم افرادی که مقادیر زیادی سیگار می کشند نیز بالاتر از میزان آن در سرم افراد غیرسیگاری است . در سرطان کولون و سرطانهای دیگری که با افزایش میزان CEA همراه هستند، سطح این آنتی ژن در خون شاخص خوبی برای بررسی نحوهٔ درمان و تغییر وضعیت بالینی بیماران می باشد. به عنوان مثال، افزایش سطح CEA پس از عمل جراحی، نشانگر عدم برداشت کامل غده یا متاستاتیک شدن آن است[۸-۱۰]. اندازه گیری میزان CEA به تنهایی جهت تشخیص سرطانهای عنوان شده کافی نبوده و بهتر است به همراه سایر روشهای تشخیص بکار برده شود.

II. اصول اندازه گیری :

کیت اندازه‌گیری کمّی CEA بر مبنای سنجش واکنش ایمونوآنزیماتیک بر روی فاز جامد طراحی شده است. در این سیستم از دو آنتی بادی مونوکلونال موش که شاخص‌های آنتی ژنیک متمایزی را بر روی مولکول CEA شناسائی می کنند، استفاده شده است. ابتدا به حفره‌های پلی استایرن پوشیده شده با آنتی بادی‌های مونوکلونال CEA، استانداردها، سرم کنترل‌ها و نمونه‌های بیماران افزوده می‌شود. در حین انکوباسیون اول، CEA موجود در نمونه‌ها به آنتی‌بادی‌های ضد CEA متصل شده و سپس بقیه مواد از طریق تخلیه و شستشو از سیستم خارج می‌شوند. پس از شستشو، آنتی‌بادی دوم ضد CEA که به آنزیم پراکسیداز (HRP) متصل شده است به حفره‌ها افزوده می‌شود.

بعد از دومین انکوباسیون و شستشو، افزودن سوبسترای TMB (۳و ۳'-۵و ۵' تترامتیل بنزیدین) سبب ایجاد رنگ آبی توسط آنزیم می شود. شدت رنگ ایجاد شده با میزان CEA موجود در نمونه‌ها نسبت مستقیم دارد. رنگزائی واکنش آنزیماتیک توسط محلول متوقف کننده خاتمه یافته و رنگ آبی ایجاد شده به رنگ زرد مبدل می‌شود. شدت رنگ به وسیله یک اسپکتروفتومتر مخصوص میکروپلیت در طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه‌گیری می‌شود. برای تعیین غلظت CEA نمونه‌ها ابتدا منحنی جذب نور استانداردها برحسب غلظت CEA آنها رسم شده و سپس میزان غلظت CEA نمونه ها از روی منحنی استاندارد تعیین می گردد.

III. محتویات کیت:

محلولهای موجود در این کیت جهت انجام ۹۶ تست بوده و تاریخ انقضای هر یک بر روی ویال آن درج شده است. دمای مناسب برای نگهداری کیت ۸-۲ درجه سانتی گراد می باشد.

۱. **پلیت:** پلیت ۹۶ حفره ای پوشش داده شده با آنتی بادی های منو کلونال ضد CEA موش.

۲. **استاندارد صفر :** ۱ ویال ۴ میلی لیتری. از استاندارد صفر برای رقیق کردن نمونه ها نیز استفاده شود.

۳. **استانداردها :** ۶ ویال ۱/۵ میلی لیتری محلول سرم دار حاوی CEA انسانی. در محلول استانداردها از تیمروزال به عنوان نگهدارنده استفاده شده است. غلظت های دقیق CEA استانداردها که توسط استاندارد بین المللی (IRP 1st 73/601) سازمان بهداشت جهانی کالیبر شده اند بر روی برچسب آنها درج شده است.

۴. **کنترل های سرمی :** ۲ ویال ۱/۵ میلی لیتری سرم حاوی CEA انسانی، PBS و تیمروزال .غلظت های دقیق CEA کنترل های سرمی بر روی برچسب کنترل ها درج شده است .

۵. **ردیاب آنزیمی :** یک ویال ۱۲ میلی لیتری آنتی بادی منوکلونال ضد CEA متصل به پراکسیداز (HRP) حاوی پروتئین و تیمروزال.

۶. **بافر رقیق کننده :** یک ویال ۶ میلی لیتری PBS، پروتئین و تیمروزال .

۷. **محلول شستشو غلیظ (20x) :** یک ویال ۲۵ میلی لیتری حاوی PBS-Tween20 و تیمروزال.

۸. **محلول رنگ زا :** یک ویال ۱۲ میلی لیتری حاوی TMB.

۹. **محلول متوقف کننده واکنش :** یک ویال ۱۲ میلی لیتری H_2SO_4 ۰/۲ نرمال.

IV. وسایل مورد نیاز (این وسایل همراه کیت عرضه نمی شوند):

۱. دستگاه اسپکتروفتومتر میکروپلیت با دامنه جذب نوری ۳-۰ در طول موج ۴۵۰ نانومتر با دیفرانسیل ۶۳۰ نانومتر.

۲. میکروپیپت قابل تنظیم بر روی ۵۰ و ۱۰۰ میکرولیتر و تیپ های یک بار مصرف.

۳. آب مقطر یا آب دیونیزه برای رقیق کردن محلول شستشو.

V. نحوه جمع آوری و آماده سازی نمونه ها:

نمونه مناسب جهت اندازه گیری CEA، سرم یا پلاسمای هپارینه بیمار می باشد . این نمونه ها به مدت یک تا دو هفته در دمای ۸-۲ درجه سانتی گراد قابل نگهداری است. برای نگهداری نمونه ها به مدت طولانی تر، سرم یا پلاسمای بیمار را در حجم های کم تقسیم نموده، در ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری نمائید. بهتر است از ذوب شدن و یخ زدن مکرر نمونه ها اجتناب شود. برای اندازه گیری CEA نمونه های منجمد شده، ابتدا نمونه را در حرارت اتاق ذوب نموده ، سپس با حرکت دست یکنواخت نمائید. برای یکنواخت کردن نمونه ها از Vortex نباید استفاده نمود. برای اندازه گیری دقیق نمونه هائی که میزان CEA آنها بیش از آخرین استاندارد است، ابتدا نمونه ها را با استاندارد صفر رقیق کرده، سپس اندازه گیری مجدد بعمل آورید. بدیهی است در محاسبه نتایج این نمونه ها، ضریب رقت منظور می شود.

VI. روش کار:

قبل از شروع کار دمای تمامی محلولها باید به دمای اتاق برسد.

محلول شستشوی غلیظ به نسبت یک به بیست با آب مقطر یا دیونیزه رقیق شود. (یک حجم محلول شستشوی غلیظ به ازاء ۱۹ حجم آب) محلول شستشوی رقیق را تا یک هفته در دمای ۸-۲ درجه سانتی‌گراد می‌توان نگهداری کرد.در صورت مشاهده کریستال در محلول غلیظ شستشو ، ویال را به مدت چند دقیقه در۳۷ درجه سانتیگراد قرار دهید تا محلول یکنواخت گردد.

۱. ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر از استانداردها، سرم کنترل ها و سرم بیماران را داخل حفره ها ریخته و به آن ۵۰ میکرولیتر از بافر رقیق کننده اضافه کنید. سپس با تکان دادن پلیت ، محتویات حفره ها را به مدت ۱۵ ثانیه مخلوط نمائید.

۲. پلیت را به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار دهید.

۳. حفره ها را ۴ مرتبه با ۳۰۰ میکرو لیتر محلول شستشو بشوئید.

۴. به هر حفره ۱۰۰ میکرولیتر از کونژوگه ضد CEA (HRP) افزوده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار دهید.

۵. حفره ها را ۴ مرتبه با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشو بشوئید.

۶. به هر حفره ۱۰۰ میکرو لیتر از سوبسترای TMB اضافه نمائید و به مدت ۱۰ ثانیه به آرامی تکان دهید.

۷. پلیت را به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و در محلی تاریک قرار دهید.

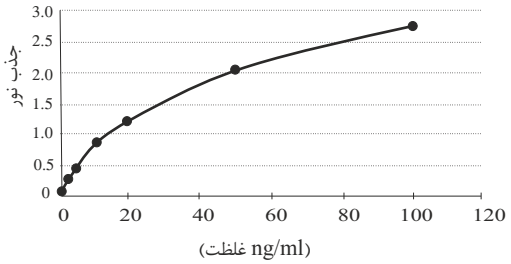
۸. ۱۰۰ میکرولیتر از محلول متوقف کننده واکنش را در هر حفره ریخته و به مدت ۱۰ ثانیه مخلوط کنید . میزان جذب نور حفره ها را در طول موج ۴۵۰ نانومتر (با دیفرانسیل ۶۳۰ نانومتر) حداکثر تا ۱۵ دقیقه بعد از افزودن محلول متوقف کننده، بخوانید.

VII. محاسبه نتایج :

پس از تعیین میزان جذب نوری استانداردها و نمونه ها و همچنین ترسیم منحنی استاندارد ، غلظت CEA بیماران قابل محاسبه است. در منحنی مذکور که با استفاده از دستگاه الایزا ریدر (قابل برنامه ریزی) و یا به صورت دستی ترسیم می شود، محور Y شاخص میزان جذب نور استانداردهای CEA در طول موج ۴۵۰ نانومتر و محور X شاخص غلظت استانداردهای CEA برحسب ng/ml می باشد. نتایجی که در جدول زیر آمده ، فقط به عنوان مثال بوده و نبایستی بعنوان نتایج حاصل از آزمایش تلقی شود.

نمونه	جذب نور	غلظت CEA (ng/ml)
استاندارد A	۰/۰۴	۰
استاندارد B	۰/۲۴	۲
استاندارد C	۰/۴۸	۵
استاندارد D	۰/۸۰	۱۰
استاندارد E	۱/۲۲	۲۰
استاندارد F	۲/۰۴	۵۰
استاندارد G	۲/۷۲	۱۰۰
سرم	۰/۷۳	۸/۱

برای ترسیم منحنی از غلظت های مندرج بر روی ویال استانداردها استفاده نمائید.



VIII. مقادیر طبیعی:

با استفاده از سرم ۳۰۰ فرد سالم، مقادیر طبیعی CEA توسط کیت پادتن علم تعیین گردیده است. غلظت متوسط CEA در این نمونه ها 0.86 ng/ml با انحراف معیار 0.81 ng/ml می باشد. مقادیر طبیعی CEA در کتب رفرانس برای افراد غیر سیگاری زیر 3 ng/ml و برای افراد سیگاری 5 ng/ml گزارش شده است [11].

توصیه می گردد هر آزمایشگاه با در نظر گرفتن غلظت سرمی CEA افراد سالم، دامنه طبیعی آن را تعیین نموده و از آن بعنوان مبنای مقایسه خود استفاده نماید.

IX. ویژگی های اختصاصی تست:

۱. **حساسیت:** به حداقل غلظت CEA که اختلاف جذب نور آن نسبت به جذب نور استاندارد صفر، معنی دار باشد حساسیت کیت گفته می شود. این مقدار برای کیت CEA، 3 ng/ml است.

۲. **اثر هوک Hook:** در کیت EIA پادتن علم برای نمونه‌های رقیق نشده تا غلظت تقریبی 1 mg/ml اثر هوک مشاهده نشده است.

۳. **مقایسه با روش الکتروکمی لومینسانس CEA:** برای بررسی همبستگی آماری غلظت CEA، بین کیت EIA پادتن علم و کیت Cobas غلظت CEA، ۵۰۰ نمونه تصادفی با هر دو کیت اندازه گیری شد. مقایسه نتایج به دست آمده، ضریب همبستگی ۰/۸۷ را نشان می دهد.

۴. **دقت:** شاخص دقت کیت با مقایسه تکرارپذیری جواب‌ها به روش میان‌سنجی (Inter-assay) و درون‌سنجی (Intra-assay) تعیین گردیده است. برای این منظور ۴ نمونه سرم ده بار در یک دوره آزمایش (درون‌سنجی) و یکبار در ده دوره آزمایش متفاوت (میان‌سنجی) تعیین غلظت شده است. نتایج انحراف معیار (SD) و ضریب تغییرات (CV) در جدول زیر آمده است:

جدول شاخص دقت

درون سنجی			میان سنجی		
%CV	SD	میانگین(ng/ml)	%CV	SD	میانگین (ng/ml)
۵/۲	۰/۲	۴/۴	۵/۱	۰/۳	۶/۴
۸/۴	۰/۹	۱۰/۹	۳/۹	۰/۴	۹/۶
۴/۹	۱/۸	۳۶/۲	۵/۶	۱/۸	۳۲/۷
۲/۷	۲/۱	۷۷/۰	۴/۵	۲/۸	۶۳/۳

۵. **ریکاوری و رقت:** ریکاوری به حالتی اطلاق می‌شود که با افزودن حجم معینی از یک محلول با غلظت بالا، به نمونه رقیق‌تر، افزایش غلظت حاصل شود. برای تعیین ریکاوری، محلولی با غلظت بالای CEA به نمونه سرمی که غلظت پائینی از CEA دارد، افزوده شده است.

درصد ریکاوری طبق فرمول زیر محاسبه می‌شود:

$$\frac{\text{غلظت اندازه گیری شده (ng/ml)}}{\text{غلظت پیش بینی شده (ng/ml)}} \times ۱۰۰$$

دامنه درصد ریکاوری بدست آمده مابین ۹۱/۳ تا ۱۰۱/۳ می‌باشد.

جدول ریکاوری

ریکاوری ٪	غلظت اندازه گیری شده (ng/ml)	غلظت پیش بینی شده (ng/ml)	غلظت افزوده شده (ng/ml)
–	۳/۳	–	–
۹۱/۳	۲۱/۹	۲۴/۰	۲۰/۷
۱۰۱/۳	۳۸/۳	۳۷/۸	۳۴/۵
۹۸/۷	۴۷/۱	۴۷/۷	۴۴/۴
۱۰۱/۱	۵۴/۰	۵۳/۴	۵۰/۱

برای بررسی خطی بودن رقتهای CEA بر روی منحنی چندین نمونه سرمی غلیظ، پس از رقیق شدن متوالی با استاندارد صفر، اندازه‌گیری شده و نتایج یک نمونه بعنوان مثال در جدول زیر آورده شده است. دامنه درصد ریکاوری بدست آمده مابین ۹۳/۳ تا ۱۰۹/۸ می‌باشد.

جدول رقت

ریکاوری ٪	غلظت اندازه گیری شده (ng/ml)	غلظت پیش بینی شده (ng/ml)	رقت
–	۱۴۲/۳	–	–
۱۰۹/۸	۷۸/۱	۷۱/۱	۱:۲
۱۰۰/۲	۳۵/۷	۳۵/۶	۱:۴
۱۰۱/۱	۱۸/۰	۱۷/۸	۱:۸
۹۳/۳	۸/۳	۸/۹	۱:۱۶

X.References

1.Gold P, Freedman SO. (1965) Demonstration of Tumor-specific Antigens in Human Colonic Carcinomata by Immunological Tolerance and Absorption Techniques. J Exp Med 121:439-462.

2.Gold P, Freedman SO. (1965) Specific Carcinoembryonic Antigens of the Human Digestive Systems. J Exp Med ,122:467-480.

3.Thompson J A, et al. (1997): Molecular cloning of a gene belonging to the carcinoembryonic atigen gene family and discussion of a domain model. Proc Natl Acad Sci USA 84:2965-2969

4.McKenzie KJ, et al. (1987): Expression of carcinoembryonic antigen, T antigen, and oncogene products as markers of neoplastic and preneoplastic colonic mucosa. Hum Pathol 18:1282-1286.

5.Pascal RR, et al. (1977): Carcinoembryonic antigen: Immunohistologic identification in invasive and intraepithelial carcinomas of the lung. Arch. Pathol 101:568-571.

6.Gion M, et al. (1986): Carcinoembryonic antigen ferritin, and tissue polypetid antigen in serum and tissue: relationship with the receptor content in breast carcinoma. Cancer 57:917-922.

7.Lahousen M, Stettner H, Pickel H, Urdl W, Purstner P. (1987), The predictive value of a combination of tumor makers in monitoring patitnts with ovarian cancer. Cancer 60:2228-32.

8.Sikorsaka H, Shuster J, Gold P. (1988), Clinical applications of carcinoembryonic antigen. Cancer Det. prev. 12:321-55.

9.Go VLW, Zamcheck N. (1982), The role of tumor makers in the management of colorectal cancer. Cancer 50:2618-23.

10.Minton J, Chevinsky AH. (1989) CEA directed second-look surgery for colon andrectal cancer. Annales Chirurgiae e

11. Gynecologiae, 78:32-37.

احتیاط!

با توجه به اینکه محلول‌های به‌کار رفته در این کیت‌ها حاوی مواد سمی مانند تیمروزال و مواد پروتئینی با منشا انسانی و حیوانی هستند، و اینکه با هیچ تستی نمی توان از عدم وجود ویروس‌هایی چون HCV ، HBV، HIVدر این محلول‌ها اطمینان کامل حاصل کرد، خواهشمند است هنگام کار احتیاط‌های لازم از جمله استفاده از دستکش، امتناع از خوردن و آشامیدن و سیگار کشیدن، خودداری از پیپت کردن با دهان و پرهیز از هرگونه تماس محلول با چشم و دست‌ها، رعایت شود.

Rev: Feb 2021

تهران ۱۴۱۶۸، خیابان طالقانی غربی، خیابان سرپرست(کیوان جنوبی)، پلاک ۲۶
تلفن و فکس : ۶۳۴۸۱(۰۲۱)