

کیت سنجش PSA به روش الایزا

مقدمه :

آنتی ژن اختصاصی پروستات (PSA) جزئی از خانواده آنزیم کالیکرین با وزن ملکولی حدود ۳۰ کیلو دالتون است که دارای فعالیت آنزیمی مشابه کیموتریپسین می باشد. این گلیکو پروتئین منومر در اپی تلیوم غده پروستات تولید و به طور طبیعی به داخل مایع سمینال ترشح شده و عملکرد آن تجزیه پروتئینهای وزیکولهای سمینال و حل کردن لخته سمینال است. PSA در سرم به چندین شکل وجود دارد، یک نوع با وزن مولکولی پایین (حدود ۳۰ کیلو دالتون) که نمایانگر یک پرو آنزیم یا شکل غیر فعال از نظر آنزیمی است و نوع دیگر که بصورت یک کمپلکس بزرگ با مهار کننده های سرین پروتئازی سرم نظیر آلفا - ۱ - آنتی کیموتریپسین (ACT) مشاهده می شود. شکل غالب در اکثر افراد وزن مولکولی بالائی حدود ۱۰۰-۹۰ کیلو دالتون دارد که معادل وزن مولکولی PSA و ACT است، نسبت این دو فرم در افراد تفاوت دارد، به ویژه در محدوده ای از PSA که برای تشخیص اولیه کانسر پروستات اهمیت دارد. مقادیر کم PSA بطور طبیعی در جریان خون وجود دارد ولی افزایش آن نشانه ای از آسیب خوش خیم یا بدخیم پروستات است. امروزه اندازه گیری PSA به عنوان یک روش در تشخیص کانسر پروستات و پیگیری پس از درمان و جراحی بطور وسیع مورد استفاده قرار می گیرد. در کشورهای پیشرفته سرطان پروستات بیشترین تلفات را در بین سرطانها داشته و به عنوان دومین سرطان تشخیص داده شده به شمار می آید. اندازه گیری میزان PSA به تنهایی جهت تایید وجود کانسر کافی نبوده زیرا در بزرگی خوش خیم پروستات (BPH) نیز دیده می شود و بهتر است به همراه سایر روشهای تشخیصی به کار رود. بعد از برداشتن پروستات (پروستکتومی) میزان PSA در حد صفر خواهد بود و مقادیر بالاتر از ۰/۱ ng/ml باید مورد توجه قرار گیرد و جهت عدم برداشت کامل غده و یا متاستاز پیگیری شود. آنتی بادیهای مورد استفاده در این کیت بطور دقیق جهت ارزیابی PSA آزاد و کمپلکس انتخاب شده است.

اساس آزمایش :

اساس این کیت به روش ساندویچ و با استفاده از آنتی بادیهای مونوکلونال می باشد. در این روش چاهکها توسط آنتی بادیهای علیه یک شاخص آنتی ژنیک PSA پوشش داده می شوند (Coating). نمونه بیماران با آنتی بادی پوشش داده شده در ته چاهکها مجاور می شود. پس از انکوباسیون و شستشو آنتی بادی ثانویه ضد PSA متصل به آنزیم HRP به چاهکها اضافه شده و انکوبه می گردد که مقدار کمپلکس ایمنی تشکیل شده در چاهکها با غلظت PSA در نمونه ها متناسب است، پس از شستشو محلول رنگزا که محتوی هیدروژن پراکسید (H_2O_2) و کروموزن است داخل چاهکها ریخته می شود که رنگ آبی پدید آمده متناسب با کمپلکس ایمنی تشکیل شده در چاهکهاست. با افزودن محلول متوقف کننده رنگ آبی به زرد تبدیل می شود که بهترین جذب نوری را در طول موج ۴۵۰ نانومتر دارد.

محتویات کیت :

- ۱) پلیت ۹۶ خانه حاوی چاهکهای پوشش داده شده با آنتی بادی ضد PSA (Anti-PSA Coated Plate).
- ۲) محلول آنزیم کنژوگه (Enzyme Conjugate) : یک ویال حاوی ۱۲ میلی لیتر (آماده مصرف).
- ۳) سری استانداردها (Standards Set) : شامل ۶ ویال استاندارد با غلظتهای PSA 0, 1, 4, 10, 25, 50 ng/ml کالیبره شده در مقابل استاندارد ۹۶/۶۷۰ WHO 1 st IS (استاندارد صفر محتوی ۲ میلی لیتر و سایر استانداردها حاوی ۱ میلی لیتر می باشند).
- ۴) سرم کنترلهای بالا و پایین : دو ویال هر یک حاوی ۱ میلی لیتر سرم کنترل با غلظت مشخص درج شده بر روی برچسب ویال.
- ۵) محلول اسی بافر (Assay Buffer) : یک ویال حاوی ۱۲ میلی لیتر (آماده مصرف).
- ۶) محلول رنگزای یک مرحله ای (Chromogen-Substrate) : یک ویال حاوی ۱۲ میلی لیتر (آماده مصرف).
- ۷) محلول شستشو (Wash Solution) : یک ویال حاوی ۵۰ میلی لیتر محلول شستشوی غلیظ (۲۰X). جهت تهیه محلول شستشوی آماده مصرف، مقدار مورد نیاز را با آب مقطر به نسبت ۱/۲۰ رقیق نمایید.
- ۸) محلول متوقف کننده (Stop Solution) : یک ویال حاوی ۱۲ میلی لیتر اسید کلریدریک ۱ نرمال.
- ۹) برچسب مخصوص پلیت.

مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نمی باشند :

- ۱) دستگاه الایزایدر با طول موج ۴۵۰ نانومتر و در صورت امکان ۶۳۰ نانومتر.
- ۲) سمپلر های ۲۰ و ۱۰۰ میکرولیتر دقیق.
- ۳) آب مقطر.

نکات قابل ذکر برای مصرف کنندگان :

- (۱) محتویات این کیت برای مصرف در همین کیت طراحی شده است .
- (۲) از مخلوط کردن محتویات کیتها با شماره ساختهای مختلف جداً خودداری نمایید .
- (۳) کلیه مواد موجود در کیت که منشاء سرمی دارند از نظر وجود HBSAg و آنتی بادی های ضد HCV و HIV کنترل گردیده اند و فاقد این عوامل می باشند ، جهت احتیاط بهتر است کاربرانی که با کیت کار می کنند از تماس مستقیم با مواد بپرهیزند .

شرایط نگهداری :

- (۱) کیت را در یخچال بین دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد نگهداری نمایید .
- (۲) چاهکها را در کیسه مخصوص پلیت همراه با نمگیر نگهداری نمایید .
- (۳) پایداری محتویات کیت تا پایان مدت انقضای نوشته شده بر روی هر یک از آنها می باشد .
- (۴) محلول شستشوی آماده مصرف که به نسبت ۱/۲۰ با آب مقطر رقیق شده باشد به مدت یک هفته در شرایط ۲-۸ درجه سانتی گراد قابل نگهداری و مصرف می باشد .

جمع آوری و آماده سازی نمونه :

سرم یا پلاسما را می توان پس از جدا نمودن از خون استفاده نمود ، نمونه را می توان به مدت دو روز در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد و یا برای مدت زمان طولانی تر (حداکثر ۳۰ روز) در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری نمود . در ضمن باید از Freeze-thaw نمودن نمونه پرهیز شود . پس از ماساژ پروستات ، بیوپسی و یا جراحی Transurethral میزان PSA در سرم افزایش می یابد که با توجه به نیمه عمر ۳-۲ روزه آن بهتر است اندازه گیری PSA حدوداً ۲-۳ هفته بعد انجام شود .

توضیحات عمومی :

- (۱) قبل از شروع مراحل آزمایش تمام مواد و نمونه ها را به درجه حرارت اتاق رسانده و بخوبی تکان دهید تا کاملاً یکنواخت شوند .
- (۲) بهتر است به محض شروع آزمایش کلیه مراحل بدون توقف انجام پذیرند .
- (۳) از نوک سمپلر یک بار مصرف برای هر نمونه استفاده کنید .
- (۴) پس از افزودن محلول متوقف کننده جذب نوری چاهکها حداکثر تا نیم ساعت قابل قرائت می باشد .
- (۵) برای کسب نتایج مطلوب باید شستشوی چاهکها بصورت کامل صورت گرفته و آخرین قطرات پس از شستشو از چاهکها تخلیه شود .
- (۶) از مهمترین فاکتورها در حصول نتیجه مطلوب زمان انکوباسیون مناسب می باشد ، بنابراین پیشنهاد می گردد قبل از شروع آزمایش تمام مواد و محلولهای مورد نیاز را آماده نموده و درب محلولهای مورد نیاز را باز کنید، این عمل با کاهش فاصله زمانی بین مراحل سمپلینگ باعث نتایج دقیقتر می شود .
- (۷) به دلیل مشابه در بند ۶ بهتر است که حجم انجام تست محدود باشد و زمان ریختن نمونه ها بیش از ۵ دقیقه بطول نینجامد .

مراحل انجام آزمایش :

- (۱) تعداد چاهکهای مورد نظر را انتخاب نموده و سایر چاهکها را به همراه نمگیر درون کیسه مخصوص نگهداری پلیت قرار داده و درب آن را ببندید .
- (۲) ۲۰ میکرولیتر از هر استاندارد، سرم کنترل و نمونه را به داخل هر چاهک بریزید ، پیشنهاد می گردد که از استانداردها و نمونه ها بصورت داپلیکیت استفاده شود بدین معنی که هر استاندارد و نمونه را در دو چاهک بریزید و در انتها از میانگین جذب نوری آنها برای محاسبه نتایج استفاده کنید .
- (۳) ۱۰۰ میکرولیتر از محلول اسی بافر (Assay Buffer) را به هر چاهک اضافه نموده و پلیت را به آرامی به مدت ۱۵ ثانیه تکان دهید تا محتویات آن بخوبی مخلوط شوند درب چاهکها را با برچسب مخصوص پلیت پوشانده و چاهکها را به مدت ۳۰ دقیقه در درجه حرارت اتاق (۲۸-۲۲ درجه سانتی گراد) انکوبه نمایید .
- (۴) محتویات چاهکها را خالی کرده و چاهکها را ۵ بار با محلول شستشوی آماده مصرف بشویید (برای شستشو می توان از سمپلر ۸ کاناله استفاده نمود ولی باید مواظب بود که محلول شستشو از یک چاهک به چاهک دیگر وارد نشود زیرا می تواند موجب ایجاد خطا در نتیجه آزمایش گردد ، در هر دفعه شستشو حدود ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشو در هر چاهک ریخته و سپس چاهک ها را با وارونه کردن و تکاندن خالی نمایید و در انتهای عملیات شستشو چاهکها را در حالت وارونه و با ضربات ملایم بر روی یک پارچه یا کاغذ نمگیر بزنید تا قطرات اضافی خارج شوند) .
- (۵) ۱۰۰ میکرو لیتر از محلول آنزیم کنژوگه (Enzyme Conjugate) را به هر چاهک اضافه نموده و چاهکها را به مدت ۳۰ دقیقه در درجه حرارت اتاق (۲۸-۲۲ درجه سانتی گراد) انکوبه نمایید .
- (۶) محتویات چاهکها را خالی کرده و چاهکها را ۵ بار با محلول شستشوی آماده مصرف بشویید (همانند بند ۴) .

- (۷) ۱۰۰ میکرولیتر محلول رنگزا (Chromogen-substrate) به هر چاهک اضافه نمایید .
- (۸) چاهکها را به مدت ۱۵ دقیقه در درجه حرارت اتاق و در تاریکی انکوبه نمایید .
- (۹) با اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر محلول متوقف کننده (stop solution) به هر چاهک ادامه واکنشهای آنزیمی را متوقف نمایید . برای سنجش جذب نوری از دستگاه الایزایدر با فیلتر ۴۵۰ nm استفاده نمایید (توصیه می شود از فیلتر ۶۳۰ nm به عنوان فیلتر رفرانس استفاده گردد) .

محاسبه نتایج :

- از هر دستگاه الایزایدر با قابلیت سنجش جذب نوری در طول موج ۴۵۰ nm میتوان استفاده نمود .
- (۱) جذب نوری استاندارد و نمونه ها را به کمک دستگاه الایزایدر در طول موج ۴۵۰ nm (و در صورت امکان در مقابل فیلتر رفرانس ۶۳۰ nm) بخوانید .
- (۲) با استفاده از میانگین جذب نوری استانداردها و غلظت معلوم آنها نموداری (Point to point) رسم کنید به این صورت که جذب نوری استانداردها را روی محور عمودی (Y) و غلظت آنها را روی محور افقی (X) برده و نقطه تلاقی غلظت و جذب نوری را برای هر استاندارد بدست آورید، سپس نقاط بدست آمده را به یکدیگر وصل نمایید تا منحنی بدست آید .
- (۳) میانگین جذب نوری برای هر نمونه را بدست آورده و روی محور عمودی جای آن را پیدا کنید، سپس نقطه مذکور را توسط خطی به منحنی وصل نمایید بطوریکه این خط بر محور عمودی کاملاً عمود باشد و بعد از محل تلاقی خط و منحنی ، خطی عمود بر محور افقی وارد کنید، نقطه تلاقی این خط با محور افقی مقدار غلظت را نشان خواهد داد .

استانداردها (ng/ml)	جذب نوری
۰	۰/۰۳
۱	۰/۱۳
۴	۰/۵۵
۱۰	۱/۱۴
۲۵	۱/۸۲
۵۰	۲/۳۶



توجه : جذبهای نوری و منحنی مربوطه فقط به عنوان نمونه می باشد و هر آزمایشگاه در هر دفعه انجام آزمایش باید منحنی جدیدی رسم نماید .
مقادیر مورد انتظار :

مقادیر نرمال در سرم افراد طبیعی که توسط تستهای مکرر به روش الایزا بدست آمده به قرار زیر می باشد ولی پیشنهاد می گردد که هر آزمایشگاه مقادیر نرمال خود را بدست آورد :

محدوده طبیعی
Up to 4.0 ng/ml

شاخصهای اجرایی :

(۱) حداقل مقدار قابل اندازه گیری :

بر اساس جذب نوری استاندارد صفر و سه برابر انحراف معیار (SD) حداقل غلظت PSA قابل تشخیص در این کیت ۰/۱ ng/ml می باشد .

(۲) دقت آزمایش :

آزمایشهای اینترا-اسی (همخوانی غلظت مشخص از یک نمونه در یک سری آزمایش) و اینترا-اسی (همخوانی غلظت مشخص از یک نمونه در سری آزمایشات مختلف) با استفاده از ۴ سرم با غلظتهای مختلف PSA انجام گردید که در جداول ۱ و ۲ آمده است :

جدول شماره ۱ (اینترا-اسی) :

نمونه	تعداد دفعات تکرار تست	میانگین ng/ml	SD	CV%
۱	۲۴	۰/۶	۰/۰۳	۵/۰
۲	۲۴	۲/۲	۰/۰۸	۳/۶
۳	۲۴	۹/۹	۰/۳۵	۳/۵
۴	۲۴	۳۰	۱/۳	۴/۳

جدول شماره ۲ (اینترا-اسی) :

نمونه	تعداد دفعات تکرار تست	میانگین ng/ml	SD	CV%
۱	۱۰	۰/۶	۰/۰۵	۸/۳
۲	۱۰	۲/۹	۰/۲	۶/۹
۳	۱۰	۱۹/۲	۱/۲	۶/۳
۴	۱۰	۳۷	۲/۴	۶/۵

هر سری آزمایش بصورت Duplicate انجام شده است .

۳) ریکواری آزمایش :

مقادیر معلومی از PSA به ۴ نمونه سرم با غلظتهای مشخص PSA افزوده شده و ریکواری آنها محاسبه گردید که نتایج آن در جدول صفحه بعد آمده است :

نمونه	مقدار PSA موجود در سرم (ng/ml)	مقدار افزوده شده PSA (ng/ml)	مقدار مورد انتظار (ng/ml)	مقدار بدست آمده (ng/ml)	ریکواری (%)
۱	۱/۵	۱	۱/۲۵	۱/۱۵	۹۲
۱	۱/۵	۱۰	۵/۷	۵/۹	۱۰۳
۱	۱/۵	۲۵	۱۳/۲	۱۳	۹۸
۲	۴/۳	۱	۲/۶	۲/۴	۹۲
۲	۴/۳	۱۰	۷/۱	۶/۸	۹۶
۲	۴/۳	۲۵	۱۴/۶	۱۴/۱	۹۶
۳	۱۲/۸	۱	۶/۹	۶/۵	۹۴
۳	۱۲/۸	۱۰	۱۱/۴	۱۲/۱	۱۰۶
۳	۱۲/۸	۲۵	۱۸/۹	۱۹/۳	۱۰۲
۴	۳۷/۲	۱	۱۹/۱	۲۰	۱۰۵
۴	۳۷/۲	۱۰	۲۳/۶	۲۴/۵	۱۰۴
۴	۳۷/۲	۲۵	۳۱/۱	۲۹	۹۳

□ خطی بودن آزمایش :

به کمک استاندارد صفر رقتهای متوالی از ۳ نمونه سرم با غلظت مشخص از PSA تهیه گردید و نتایج بر اساس ضریب رقت محاسبه شد که در جدول زیر نتایج آن آورده شده است .

نمونه	مقدار PSA موجود در سرم رقیق نشده (ng/ml)	ریکالوری (%)				
		رقت ۱/۲	رقت ۱/۴	رقت ۱/۸	رقت ۱/۱۶	رقت ۱/۳۲
۱	۸۰	۱۰۴	۹۸	۸۹	۱۰۶	۹۳
۲	۴۷	۹۹	۱۰۰	۹۲	۹۵	۹۰
۳	۲۵	۱۰۲	۹۵	۹۸	۱۱۰	۱۰۸

□ اثر هوک (Hook Effect) :

آزمایش PSA جهت سرمهایی با غلظت بسیار بالا از این آنالیت (تا ۵۰ $\mu\text{g/ml}$) صورت گرفت که پدیده هوک مشاهده نشد .

References:

Belanger A, van Harbeek H, et al. Molecular mass and carbohydrate structure of prostate specific antigen. Studies for establishment of an international PSA. Prostate 1995; 27: 187-197 .
Zhov A.M, Tewari P.C, card weu G.W. Multiple forms of PSA in serum; differences in immunorecognition by monoclonal and polyclonal assay.Clin. Chem. 1993;39: 2483 .

روش انجام آزمایش بصورت شماتیک

چاهکهای کوت شده با آنتی بادی ضد PSA			
محلولها	استانداردها	سرم کنترل	نمونه
استانداردها	۳۰ میکرولیتر	-	-
سرم کنترل	-	۳۰ میکرولیتر	-
نمونه	-	-	۳۰ میکرولیتر
اسی بافر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر
پلیت را به ملایمت برای مدت ۱۵ ثانیه تکان دهید تا محتویات چاهکها بخوبی مخلوط شوند ، سپس دهانه چاهکها را با برجسب مخصوص پلیت بپوشانید. ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه کنید . برجسب پلیت را برداشته و محتویات چاهکها را خالی کنید و طبق دستور شستشو ۵ بار چاهکها را بشوید .			
محلول آنزیم کنژوگه	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر
دهانه چاهکها را با برجسب مخصوص پلیت بپوشانید. ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه کنید . برجسب پلیت را برداشته و محتویات چاهکها را خالی کنید و طبق دستور شستشو ۵ بار چاهکها را بشوید .			
محلول رنگزا	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر
۱۵ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی انکوبه کنید.			
محلول متوقف کننده	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر
جذب نوری چاهکها را در طول موج ۴۵۰ نانومتر (و در صورت امکان ۶۳۰ نانومتر به عنوان فیلتر رفرانس) قرائت کنید .			