

کیت ایمونورادیومتریک اسی برای تعیین غلظت آنتی ژن

اختصاصی پروستات

Human Prostate Specific Antigen (PSA) IRMA Kit

مقدمه

آنتی ژن اختصاصی پروستات (PSA) یک زنجیر گلیکوپروتئینی با وزن ملکولی تقریبی ۳۴ kDa است که فعالیت سرین پروتئازی دارد. PSA از لحاظ ایمونولوژیک اختصاصی بافت پروستات است و از سلول های طبیعی، خوش خیم و سرطانی اپی تلیوم پروستات ترشح می شود. PSA از نظر عملکرد و خواص ایمونو شیمیایی از اسید فسفاتاز پروستاتی مجزا است. غلظت PSA در سرم بیماران مبتلا به سرطان پروستات، هیپرتروفی پروستاتی خوش خیم و شرایط التهابی مرتبط با جراحی و متاستاز بیماری افزایش می یابد. در حال حاضر، PSA به عنوان مارکر سرمی ارزشمند که از صحت بالایی برخوردار است در تشخیص سرطان پروستات و پایش درمان تومور از طریق جراحی یا سایر درمان ها شناخته شده است.

اساس روش اندازه گیری

کیت IRMA PSA موجود، براساس سنجش ایمونولوژیکی رادیواکتیو ساندوویچی تهیه شده است. PSA موجود در نمونه ها بعنوان آنتی ژن به دو آنتی بادی زوج اختصاصی خود متصل می گردد. هر دو آنتی بادی از نوع منوکلونال موشی هستند که یکی بر روی فاز جامد (لوله ها) پوشش داده شده است و دیگری به ی-۱۲۵ متصل شده است. نمونه مورد آزمایش که دارای PSA است، در معرض دو آنتی بادی قرار می گیرد. پس از زمان انکوباسیون، لوله ها تخلیه شده و شستشو داده می شوند تا آنتی بادی متصل به ی-۱۲۵ اضافی خارج گردد. سپس اکتیویته موجود در هر لوله توسط شمارنده گاما اندازه گیری می شود که این اکتیویته بطور مستقیم با غلظت PSA در نمونه ها متناسب است. استانداردهای PSA با غلظت مشخص، همراه با نمونه های مجهول آزمایش می شوند که براساس منحنی استاندارد مقدار شمارش مقابل غلظت PSA، غلظت نمونه های مجهول بدست می آید.

معرف ها

- ۱- لوله های پوشش داده شده: شامل ۱۰۰ لوله که با آنتی بادی منوکلونال موشی ضد PSA پوشش داده شده اند.
- ۲- ردیاب (آنتی بادی علیه PSA نشاندار شده با ی-۱۲۵): یک ویال ۱۲ میلی لیتری آماده مصرف.
- ۳- استانداردها: ۷ ویال یک میلی لیتری از استاندارد با غلظت های ۰، ۰/۵، ۱، ۵، ۱۰، ۲۰ و ۴۰ نانوگرم در میلی لیتر که در سرم نرمال انسانی تهیه شده و از تیومرسال بعنوان نگهدارنده استفاده شده است.
- ۴- سرم کنترل: یک ویال یک میلی لیتری آماده مصرف.
- ۵- محلول شستشو دهنده غلیظ (20X): یک ویال ۲۵ میلی لیتری محلول شستشو که برای تهیه محلول شستشوی آماده مصرف لازم است این محلول به نسبت ۱/۲۰ با آب مقطر رقیق شود.

مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نیست

۱- سمپلر ۲۵ و ۱۰۰ میکرولیتری دقیق

۲- آب دیونیزه

۳- دستگاه شمارنده گاما

۴- کاغذ جاذب رطوبت

۵- لوله های آزمایش معمولی برای شمارش تام

نکات قابل توجه برای مصرف کنندگان

- ۱- در این کیت از سرم انسانی استفاده شده است که از نظر HbsAg و HIV منفی بوده اند.
- ۲- از استفاده از مواد پس از تاریخ انقضاء خودداری کنید و از مخلوط کردن یا استفاده از کیت ها با شماره بچ مختلف پرهیز نمایید.
- ۳- درب ظروف را پس از استفاده ببندید و از تعویض درب ها جدا خودداری کنید.
- ۴- از لباس و دستکش یکبار مصرف هنگام کار با مواد رادیواکتیو استفاده کنید.
- ۵- لوازم آزمایشگاهی آلوده به مواد رادیواکتیو جداگانه و با روش های ایمن (براساس دستورالعمل های حفاظت در برابر اشعه) شستشو و یا پسماند نماید.

تهیه و جمع آوری نمونه

- ۱- آزمایش را باید بر روی نمونه های سرمی و پلاسمایی انجام داد. نمونه های شدیداً همولیزه و دارای چربی باید حذف شوند.
- ۲- نمونه ها را می توان برای هفت روز در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتیگراد و برای زمان های طولانی تر در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری نمود.
- ۳- از انجماد و ذوب مکرر نمونه ها باید خودداری کرد.
- ۴- در مواردی که مقدار PSA نمونه بیش از ۴۰ ng/ml باشد، نمونه را با استاندارد صفر رقیق نموده و سپس آزمایش را تکرار نمایید.
- ۵- معرف ها باید مستقیماً ته لوله ریخته شوند.
- ۶- از تماس نوک سمپلر با ته لوله خودداری کنید.

آماده سازی معرف ها

- ۱- کلیه معرف ها را به دمای اتاق برسانید. قبل از استفاده آنها را به آرامی سر و ته نمائید.
- ۲- برای تهیه محلول شستشوی آماده مصرف، یک حجم از بافر شستشو غلیظ (20X) را با ۱۹ حجم آب مقطر رقیق نمایید.

روش انجام آزمایش

- ۱- تعداد لوله های پوشش شده برای استانداردها، کنترل و نمونه های بیمار را بصورت ۲ تایی انتخاب کنید. برای شمارش تام از لوله های معمولی استفاده کنید.
- ۲- ۲۵ میکرولیتر از استانداردها، کنترل و نمونه های بیمار را به داخل هر لوله بریزید.
- ۳- ۱۰۰ میکرولیتر از ردیاب را به تمام لوله ها اضافه کنید.
- ۴- لوله ها بمدت ۱۵ ثانیه به آرامی تکان دهید تا محتویات آنها خوب مخلوط شوند. سپس لوله ها را بمدت یک ساعت در همزن گردان مخصوص شرکت

پادتن گستر ایثار و یا شیکر افقی (با سرعت 280 rpm) در درجه حرارت اتاق (۱۸ تا ۲۵ درجه سانتیگراد) انکوبه کنید.

۵- محتویات لوله ها را از طریق مکش یا وارونه کردن تخلیه نمائید (بجز لوله های شمارش تام). سپس لوله ها را دو بار و هر بار با دو میلی لیتر محلول شستشوی آماده مصرف شستشو دهید. برای اطمینان از تخلیه کامل، با وارونه نگهداشتن لوله ها برروی کاغذ جاذب و با ضربت ملایم برروی لوله تمامی مایع موجود در لوله ها را تخلیه کنید.

۶- با استفاده از شمارنده گاما، اکتیویته موجود در لوله ها را بمدت یک دقیقه شمارش کنید.

محاسبه نتایج

۱- با استفاده از میانگین شمارش استاندارد ها (محور Y) و غلظت مشخص آنها (محور X) برروی کاغذ میلی متری، منحنی استاندارد رسم کنید.

۲- میانگین شمارش برای هر نمونه را بدست آورده و روی محور Y جای آنرا پیدا کنید. سپس نقطه مذکور را توسط خطی به منحنی وصل کنید. از نقطه بدست آمده خطی عمود بر محور X وارد کنید تا نقطه تلاقی که نشان دهنده غلظت نمونه است، بدست آید.

۳- با استفاده از کامپیوتر این محاسبات ساده خواهد شد.

راهنمای محاسبه

مقادیر شمارش ارائه شده در جدول ذیل تنها بعنوان راهنمایی آورده شده است و هر آزمایشگاهی باید برای هر بار آزمایش یک منحنی استاندارد جدید بدست آورد.

ردیف	مقدار استاندارد (ng/ml)	شمارش (n=3)	B/T (%)
0	شمارش تام =	209436	-
1	0	328	0.2
2	0.5	2461	1.1
3	1	4556	2.1
4	5	19905	9.1
5	10	39273	18.1
6	20	66273	30.3
7	40	90398	41.3

مقادیر طبیعی

هر آزمایشگاه باید دامنه طبیعی را برای خود به دست آورد. این مقادیر فقط برای راهنمایی داده شده است.

مردان طبیعی	کمتر یا مساوی ۴ نانوگرم در میلی لیتر
-------------	--------------------------------------

خصوصیات کیت:

۱- حساسیت آنالیتیکال (حد تشخیص): برای تعیین حد تشخیص ۲۰ مرتبه استاندارد صفر آزمایش شد. حد تشخیص از ۲ انحراف معیار (SD) بالاتر از میانگین جذب در غلظت صفر بدست آمد. حد تشخیص برای این کیت 0.2 ng/ml بدست آمد.

۲- ویژگی: واکنش متقاطع آنتی بادی های مونوکلونال مورد استفاده در این آزمایش برای سایر پروتئین ها بسیار پائین بدست آمد.

۳- دقت: برای محاسبه میزان دقت در یک روز و روزهای مختلف، آزمایش بر روی ۳ نمونه سرم ۱۵ بار تکرار شد که ضریب تغییرات به شرح ذیل است.

ضریب تغییرات در روز

نمونه سرم	دفعات تکرار	میانگین (ng/ml)	انحراف معیار	ضریب تغییرات (CV)
1	15	5.7	0.41	7.2
2	15	18.3	1.04	5.7
3	15	22.7	1.07	4.7

ضریب تغییرات در روزهای مختلف

نمونه سرم	دفعات تکرار	میانگین (ng/ml)	انحراف معیار	ضریب تغییرات (CV)
1	15	6.4	0.52	8.1
2	15	21.4	1.37	6.4
3	15	28.4	1.45	5.1

۴- خطی بودن: سه نمونه مختلف سرمی با استاندارد صفر به نسبت های ۱:۲، ۱:۴ و ۱:۸ رقیق شدند. سپس غلظت PSA در آنها با استفاده از کیت محاسبه شد که نتایج ذیل بدست آمد.

نمونه سرمی	غلظت اولیه (ng/ml)	درصد بازیابی		
		1:2	1:4	1:8
1	18.3	106	107	1.8
2	24.7	102	1.3	103
3	38.4	102	103	104

۵- اثر هوک: اثر هوک تا غلظت ۴۰۰۰ ng/ml ظاهر نمی شود.

محدودیت ها:

نتایج قابل قبول و تکرارپذیر زمانی حاصل خواهد شد که روش کار با درک کامل دستورالعمل موجود در کیت و مهارت های عملی خوب انجام گیرد.

کنترل کیفی:

عملکرد آزمایشگاهی خوب مستلزم این است که در هر سری کاری همراه با هر منحنی استاندارد نمونه های کنترل کیفی نیز برای تایید شاخص های اجرایی سنجش، آنالیز شوند. برای تضمین شاخص های اجرایی صحیح و برای تعیین مقادیر میانگین و دامنه های قابل قبول تعداد نمونه های کنترلی که آنالیز می شوند باید از لحاظ آماری معنی دار باشند.