

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

Free-PSA

موارد استفاده:
تعیین کفی Free-PSA در سرم یا پلاسما

۱. مقدمه

آنتی ژن اختصاصی پروستات (PSA)، سرین پروتئاز از خانواده Kalikrein، از یک گلیکوپروتئین منومر تشکیل شده است (۹۳). PSA با فعالیت آنزیماتیک نظیر کیموتربیسین و تربیسین دارای نقشی فعال در تقسیم پروتئینهای کبسه منی، آبی شدن مایع منی و افزایش تحرک اسپرماتوئیدها است (۹۴). PSA به طور عمده از سلولهای اپیتلیال غده پروستات ترشح می‌شود. قسمت اعظم PSA خون به صورت ترکیب شده با یکی از پروتئینهای مهار کننده (آلفا-۱-آنتی کیموتربیسین و آلفا-۲-ماکروگلوبولین) و قسمت ناچیزی از آن بصورت آزاد است. برخلاف PSA ترکیبی با آلفا-۲-ماکروگلوبولین، دو فرم دیگر PSA یعنی PSA آزاد و PSA ترکیبی با آلفا-۱-آنتی کیموتربیسین با روشهای ایمنونولوژیک متداول مانند EIA قابل اندازه‌گیری هستند (۹۵).

PSA در بافتهای سالم پروستاتیک، پلاسمای منی و مایع پروستات یافت می‌شود (۵). غلظت این مولکول در سرم زنان صفر و در سرم مردان سالم ناچیز است. مقدار PSA در هاپیرپلازی خوش خیم، بدخیم و عفونتهای پروستات افزایش می‌یابد (۹۶-۹۷). در دیگر سرطانها با منشاء غیر پروستاتیک افزایشی در غلظت سرمی PSA دیده نمی‌شود (۹۸). در کشورهای پیشرفته سرطان پروستات، دومین سرطان تشخیص داده شده است و بیشترین تلفات را در بین بیماران دارد. تحقیقات متعدد نشان داده‌اند که نسبت Free-PSA به PSA کل سرمی در سرطان پروستات کمتر از ۲۰ تا ۴ ng/ml باشد و در معاینه پروستات علائم بدخیمی مشاهده نشود، از این نسبت می‌توان برای تشخیص افتراقی این دو عارضه پروستات استفاده کرد (۹۹-۱۰۱). لازم به ذکر است که پایین بودن مقدار Free-PSA به تنهایی برای تأیید سرطان پروستات کافی نیست و بهتر است مقادیر به دست آمده با توجه به نتایج سایر روش های تشخیصی تفسیر گردد.

۱۱. اصول اندازه‌گیری

کیت اندازه‌گیری کفی Free-PSA بر مبنای سنجش واکنش ایمنوآنزیماتیک بر روی فاز جامد طراحی شده است. در این سیستم از دو آنتی بادی مونوکلنل موش که شاخص‌های آنتی ژنیک متمایزی را بر روی مولکول Free-PSA شناسایی می‌کنند، استفاده می‌شود. ابتدا به حفره‌های پلی استایرن پوشیده شده با آنتی بادی های منو کلنل ضد Free-PSA، استانداردها، سرم کنترل‌ها و نمونه‌های بیماران افزوده می‌شود. در حین انکوباسیون اول، Free-PSA موجود در نمونه‌ها به آنتی بادی‌های ضد Free-PSA متصل و سپس بقیه مواد از طریق تخلیه و شستشو از سیستم خارج می‌شود. پس از شستشو، آنتی‌بادی دوم ضد Free-PSA که به آنزیم پراکسیداز (HRP) متصل شده است به حفره‌ها افزوده می‌شود. بعد از دومین انکوباسیون و شستشو، افزودن سوبسترای TMB (۳ و ۳' و ۵' و ۵' تترامیل بنزیدین) سبب ایجاد رنگ آبی توسط آنزیم می‌شود. شدت رنگ ایجاد شده با مقدار Free-PSA موجود در نمونه‌ها نسبت مستقیم دارد. رنگ‌زائی واکنش آنزیماتیک با افزودن محلول متوقف کننده خاتمه می‌یابد و رنگ آبی ایجاد شده به رنگ زرد تبدیل می‌شود.

شدت رنگ ایجاد شده به وسیله یک اسپکتروفوتومتر مخصوص میکروپلیت در طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه‌گیری می‌شود. برای تعیین غلظت Free-PSA نمونه‌ها ابتدا منحنی جذب نوری استانداردها برحسب غلظت Free-PSA آنها رسم و سپس غلظت Free-PSA نمونه‌ها از روی منحنی استاندارد ها تعیین می‌گردد.

۱۱۱. محتویات کیت:

محلولهای این کیت (Cat.No.P-FPI) برای انجام ۹۶ تست در نظر گرفته شده و تاریخ انقضای هر یک بر روی شیشه آن درج شده است. دمای مناسب برای نگهداری کیت ۸-۲ درجه سانتی‌گراد است.

۱. پلیت: پلیت ۹۶ حفره‌ای پوشش داده شده با آنتی‌بادی‌های مونو کلنل ضد Free-PSA موش.
۲. استاندارد صفر: ۱ و ۴ میلی‌لیتری، حاوی پروتئین و تیمروزال. از استاندارد صفر برای رقیق کردن نمونه‌ها نیز استفاده شود.
۳. استانداردها: ۶ و ۱۵ میلی لیتری محلول سرم دار حاوی Free-PSA انسان. غلظت دقیق Free-PSA استانداردها، که بر مبنای استاندارد سازمان بهداشت جهانی (1st IRP 96/668) کالیبر شده اند، بر روی برچسب آنها درج شده است.
۴. کنترل‌های سرمی: ۲ و ۱۵ میلی لیتری سرم انسانی حاوی Free-PSA. غلظت دقیق Free-PSA کنترل‌ها بر روی برچسب آن‌ها درج شده است.
۵. بافر رقیق کننده: یک و ۶ میلی لیتری محلول PBS، حاوی پروتئین و تیمروزال.
۶. ردیاب آنزیمی: یک و ۱۲ میلی لیتری آنتی‌بادی مونوکلنل ضد Free-PSA متصل به پراکسیداز (HRP) محلول در بافر PBS، حاوی پروتئین و تیمروزال.
۷. محلول شستشوی غلیظ (۲۰X): یک و ۲۵ میلی لیتری PBS-Tween ۲۰ و تیمروزال.
۸. محلول رنگ زا: یک و ۱۲ میلی لیتری بافر حاوی H2O2 و TMB.
۹. محلول متوقف کننده واکنش: یک و ۱۲ میلی لیتری H2SO4 دو نرمال.

۱۱۱. وسایل مورد نیاز (این وسایل همراه کیت عرضه نمی‌شوند):

۱. دستگاه اسپکتروفوتومتر میکروپلیت با دامنه جذب نوری ۲-۳ در طول موج ۴۵۰ نانومتر یا دیفرانسیل ۶۳۰ نانومتر.
۲. میکروپیپت ۵۰ و ۱۰۰ میکرولیتر و تیپ های یکبار مصرف.
۳. آب مقطر یا آب دیونیزه برای رقیق کردن محلول شستشو.

۱۱۱. جمع‌آوری و آماده‌سازی نمونه‌ها:

نمونه مناسب برای اندازه‌گیری Free-PSA، سرم یا پلاسمای هپارینه بیمار است. این نمونه‌ها را می‌توان تا ۴ روز در دمای ۸-۲ درجه سانتی‌گراد نگهداری کرد. برای نگهداری طولانی‌تر سرم یا پلاسمای بیمار را در حجم‌های کم تقسیم و در دمای ۲۰-۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری کنید. بهتر است از ذوب شدن و یخ زدن مکرر نمونه‌ها اجتناب شود. برای اندازه‌گیری Free-PSA نمونه‌های منجمد شده، ابتدا نمونه را در دمای اتاق ذوب و سپس با حرکت دست یکنواخت کنید. برای یکنواخت کردن نمونه‌ها نباید از Vortex استفاده شود. برای اندازه‌گیری دقیق نمونه‌هایی که غلظت Free-PSA آنها بیش از آخرین استاندارد است، ابتدا نمونه‌ها را با استاندارد صفر رقیق و سپس دوباره اندازه‌گیری کنید. بدیهی است در محاسبه نتایج این نمونه‌ها، ضریب رقت منظور می‌شود.

قابل ذکر است که پس از ماساژ پروستات، بیوپسی و تراش پروستات از داخل مجرای ادراری مقدار Free-PSA افزایش می‌یابد، لذا با توجه به اینکه نیمه عمر Free-PSA در سرم ۲ تا ۳ روز است توصیه می‌شود اندازه‌گیری Free-PSA سه هفته بعد از انجام هر عملی که باعث بالا رفتن مقدار آن می‌شود، انجام پذیرد.

۱۱۱. روش کار:

قبل از شروع کار باید دمای تمامی محلولها 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 اِزاء 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 چند دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار دهید تا محلول یکنواخت شود.

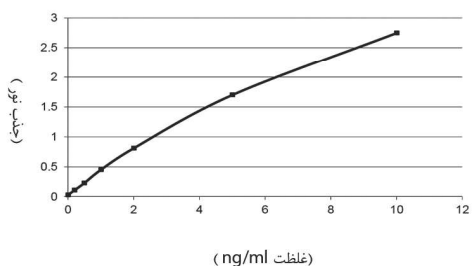
۱. ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر از استانداردها، سرم کنترل‌ها و سرم بیماران را داخل حفره‌ها ریخته و به آن ۵۰ میکرولیتر بافر رقیق کننده اضافه کنید. سپس با تکان دادن پلیت، محتویات حفره‌ها را به مدت ۱۵ ثانیه مخلوط نمایید.
۲. پلیت را ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار دهید.
۳. حفره‌ها را ۴ بار با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشو بشوئید.
۴. به هر حفره ۱۰۰ میکرولیتر از کوئزوگه ضد Free-PSA (HRP) اضافه کنید و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار دهید.
۵. حفره‌ها را ۴ بار با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشو بشوئید.
۶. به هر حفره ۱۰۰ میکرولیتر سوبسترای TMB اضافه کنید.
۷. پلیت را ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و در محلی تاریک قرار دهید.
۸. ۱۰۰ میکرولیتر محلول متوقف کننده واکنش در هر حفره ریخته و به مدت ۱۰ ثانیه مخلوط کنید.
۹. میزان جذب نور حفره‌ها را در طول موج ۴۵۰ نانومتر (با دیفرانسیل ۶۳۰ نانومتر) حداکثر تا ۱۵ دقیقه بعد از افزودن محلول متوقف کننده، بخوانید.

۱۱۱. محاسبه نتایج:

پس از تعیین میزان جذب نوری استانداردها و نمونه‌ها و ترسیم منحنی استاندارد، می‌توان غلظت Free-PSA بیماران را محاسبه کرد. در منحنی مذکور که با استفاده از دستگاه الایزا ریدر (قابل برنامه‌ریزی) و یا به صورت دستی ترسیم می‌شود، محور Y شاخص میزان جذب نور استانداردهای Free-PSA در طول موج ۴۵۰ nm و محور X شاخص غلظت استانداردهای Free-PSA برحسب ng/ml می‌باشد. نتایجی که در جدول زیر آمده، فقط مثال است و نباید برای تفسیر نتایج از آنها استفاده شود.

غلظت Free-PSA (ng/ml)	جذب نور	نمونه
۰/۰	۰/۰۳	استاندارد A
۰/۲	۰/۱۱	استاندارد B
۰/۵	۰/۲۳	استاندارد C
۱/۰	۰/۴۵	استاندارد D
۲/۰	۰/۸۱	استاندارد E
۵/۰	۱/۷۰	استاندارد F
۱۰/۰	۲/۷۵	استاندارد G
۱/۴	۰/۵۸	سرم

برای ترسیم منحنی از غلظت‌های مندرج بر روی ویال استانداردها استفاده نمایید.



(غلظت ng/ml)

(OD)

VIII. مقادیر طبیعی:

با استفاده از نمونه سرم‌های مردان سالم ۲۰ تا ۷۰ ساله (n=۵۶۲)، مقادیر طبیعی Free-PSA کیت شرکت پادتن علم ارزیابی گردید. نتایج بدست آمده به شرح زیر است:

میانگین (ng/ml)	تعداد	سن
۰/۱۱	۱۱۱	۲۰-۴۰
۰/۱۸	۲۹۸	۴۱-۶۰
۰/۴۵	۱۵۳	>۶۱

برای بررسی احتمال ابتلا به سرطان پروستات بیماران ابتدا، با استفاده از نتایج بدست آمده نسبت غلظت Free-PSA آزاد به PSA کل (برحسب درصد) طبق فرمول زیر محاسبه می‌شود:

$$\frac{\text{غلظت Free-PSA (ng/ml)}}{\text{غلظت PSA کل (ng/ml)}} \times 100$$

طبق جدول زیر، چنانچه نسبت Free-PSA به PSA کل بیمار بیش از ۲۳/۱٪ باشد، احتمال ابتلا به سرطان پروستات به طرز معنی داری کاهش می‌یابد. اگر این نسبت بین ۱۶/۳ تا ۲۳/۱ درصد باشد، تفسیر نتیجه مشکوک و در بیماران که این نسبت کمتر از ۱۶/۳ باشد احتمال ابتلا به سرطان پروستات افزایش می‌یابد (ایمونوتک).

احتمال سرطان پروستات	نسبت PSA آزاد به کل (%)
متفی	> ۲۳/۱
مشکوک	۱۶/۳ - ۲۳/۱
مثبت	< ۱۶/۳

پایین بودن نسبت Free-PSA به PSA کل به تنهایی دلیل بر ابتلا به بیماری بدخیم پروستات نیست و نتایج به دست آمده باید با توجه به ارزیابی‌های دیگر روش‌های تشخیصی تفسیر شوند.

جدول بالا به عنوان یک راهنمای کلی ارائه شده است. توصیه می‌شود که هر آزمایشگاه با در نظر گرفتن درصد Free-PSA افراد سالم، افراد مبتلا به سرطان پروستات و BPH منطقه خود، دامنه طبیعی آن را تعیین و از آن برای تفسیر نتایج بیماران استفاده کند.

تذکر مهم:

به دلیل اختلاف در شناسایی اپیتوپ‌های چندگانه PSA توسط آنتی‌بادی‌های کوئینگ شرکت‌های تجاری مختلف توصیه می‌شود جهت تعیین غلظت Free-PSA و PSA کل، از ترکیب کیت‌های Free-PSA و PSA کل سازندگان متفاوت بهره‌برداری (۱۵-۱۷).

IX. ویژگی‌های اختصاصی تست:

۱. حساسیت: به حداقل غلظت Free-PSA که اختلاف جذب نور آن نسبت به جذب نور استاندارد صفر، معنی‌دار باشد حساسیت کیت می‌گویند. این مقدار برای کیت Free-PSA، کمتر از ۰/۰۲ ng/ml است.

۲. اثر Hook: در کیت EIA پادتن علم برای نمونه‌های رقیق نشده تا غلظت ۱۰ μg/ml اثر Hook مشاهده نشده است.

۳. مقایسه با کیت Roche Elecsys: برای بررسی همبستگی آماری بین کیت EIA پادتن علم و کیت الکتروکمی لومینسانس Roche، غلظت Free-PSA ۱۰۰۰ نمونه تصادفی با هر دو کیت اندازه‌گیری شد. مقایسه نتایج به دست آمده، ضریب همبستگی ۰/۹۲ را نشان می‌دهد.

۴. دقت: شاخص دقت کیت با مقایسه تکرارپذیری جواب‌ها به روش میان سنجی (Inter-assay) و درون‌سنجی (Intra-assay) تعیین شده است. برای این منظور ۳ 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					
میان‌سنجی		درون‌سنجی			
میانگین (ng/ml)	SD	%CV	میانگین (ng/ml)	SD	%CV
۰/۷۲	۰/۰۴	۵/۸۶	۰/۷۱	۰/۰۳	۴/۲۵
۱/۱۲	۰/۰۸	۷/۰۴	۱/۰۶	۰/۰۲	۶/۳۴
۳/۲۶	۰/۱۶	۴/۸۴	۳/۲۲	۰/۱۷	۵/۱۷

۵. ریکواری و رقت: ریکواری به حالتی اطلاق می‌شود که با افزودن حجم معینی از یک محلول با غلظت بالا، به نمونه رقیق‌تر، افزایش غلظت حاصل شود. برای تعیین ریکواری، محلولی با غلظت بالای Free-PSA به نمونه سرمی که غلظت پائینی از Free-PSA دارد، افزوده شده است. درصد ریکواری طبق فرمول زیر محاسبه می‌شود:

$$100 \times \frac{\text{غلظت اندازه‌گیری شده (ng/ml)}}{\text{غلظت پیش‌بینی شده (ng/ml)}}$$

دامنه درصد ریکواری به دست آمده ۹۲/۶ تا ۱۱۲/۱ درصد است.

جدول ریکواری

ریکواری %	غلظت اندازه‌گیری شده (ng/ml)	غلظت پیش‌بینی شده (ng/ml)	غلظت افزوده شده (ng/ml)
-	۱/۰	-	-
۱۱۲/۱	۳/۷	۳/۳	۲/۳
۹۴/۴	۵/۱	۵/۴	۴/۳
۹۵/۹	۷/۰	۷/۳	۶/۳
۹۲/۶	۱۱/۲	۱۲/۱	۱۱/۲

برای بررسی خطی بودن رقت‌های Free-PSA بر روی منحنی چندین نمونه سرمی غلیظ، پس از رقیق شدن متوالی با استاندارد صفر، اندازه‌گیری شده و نتایج یک نمونه برای مثال در جدول زیر آورده شده است. دامنه درصد ریکواری بدست آمده مابین ۸۴/۲ تا ۱۰۴/۱ درصد است.

جدول رقت			
ریکواری	غلظت اندازه‌گیری شده (ng/ml)	غلظت پیش‌بینی شده (ng/ml)	رقت
-	۷/۶	-	-
۱۰۲/۶	۳/۹	۳/۸	۱:۲
۸۹/۵	۱/۷	۱/۹	۱:۴
۸۴/۲	۰/۸	۰/۹۵	۱:۸
۱۰۴/۱	۰/۵	۰/۴۸	۱:۱۶

X. References

- Belanger A, Van Halbeek H, Graves HCB, et al. Molecular Mass and Carbohydrate structure of prostate specific antigen: Studies for Establishment of an International PSA Standard. *Prostate*. 27:187-97, 1995.
- Mc Cormack RT, Rittenhouse HG, Finlay JA, et al. Molecular Forms of prostate specific antigen and the Human Kallikrein Gene Family: A New Era. *Urology* 45:729-44, 1995.
- Watt KWK, Lee P-J, K, Timkulu T, et al. Human of prostate specific antigen: Structural and functional similarities with serine proteases. *Proc Natl Acad Sci UDS*. 83:3166-70, 1986.
- Liedtke, R. J., Batijer J. D., Measurement of prostate specific antigen by RIA. *Clin. Chem.*, 30:649, 1984.
- Papsidero L. D., Wang M. C., Valenzuela, L. A. Murphy G.P. Chu T. M. A prostate antigen measurement in sera of prostatic cancer antigen. *Cancer Res*. 40:2428, 1980.
- Pontes J. E., Chu T. M., Slack N., Karr J., G. P. Murphy. Serum prostatic antigen measurement in localized prostatic cancer: Correlation with clinical course. *J. Urol*. 138:1216, 1982.
- Samey T. A. Et al. PSA as a serum marker for adenocarcinoma of the prostate. *N. E. J. Med.*, 317:909, 1987.
- Parker ST, Tong T, Bolden S, et al. *Cancer Statistics*, CA Cancer J. Clin 47:5-27, 1997.
- Ludner AA, Chen Y-T Soriano TF, et al. Measurements of the proportion of free to total prostate-specific antigen improves diagnostic performance of prostate-specific antigen in the diagnostic gray zone of total prostate-specific antigen. *Urology* 46:187-194, 1995
- Yemoto CM, Nolley R, Prestigiacomo AF, et al. Free (f) and total (t) PSA density in patients with prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *J. Urol.*, 155:347A, 1996.
- Correale M, Pagliarulo A, Donatuti G, Sturda F, Capobianco AM, Stigliani V, et al. Preliminary clinical evaluation of free/total PSA ratio by the IMMULITE system. *Int J Biol Markers* 1996;11:24-8
- Wymecga LF, Duijsterwinkel FJ, Groenier K, Visser-van Brummen P, Marrink J, Mensink HJ. Clinical implications of free-to-total immunoreactive prostate-specific antigen ratios. *Scand J Urol Nephrol* 2000;34:181-7
- McArdle PA, Pollock MA, Wallace Ma, McMillan DC, Crooks JE, Underwood MA. Comparison of total, complexed and free prostate-specific antigens and their ratios in the detection of prostate cancer in a non-screened population. *Ann Clin Biochem* 2004;41:201-6

- Martinez-Pineiro L, Garcia Mediero JM, Gonzalez Gancedo P, Tabercero A, Lozano D, et al. Probability of prostate cancer as a function of the percentage of free prostate-specific antigen in patients with a non-suspicious rectal examination and total prostate-specific antigen of 4-10 ng/ml. *World J Urol* 2004;22:124-31
- Zhou AM, et al. Multiple forms of prostate-specific antigen in serum: differences in immunorecognition by monoclonal and polyclonal assays. *Clin Chem* 1993;39:2483-91
- Wolff JM, Stocker G, Borchers H, Haubeck H, Greiling H, Jakse G. Critical aspects related to the interpretation of the free-to-total PSA-ratio. *Anticancer Res* 1999;19:2633-6
- Patel D, White PA, Milford Ward A. A comparison of six commercial assays for total and free prostate specific antigen (PSA): the predictive value of the ratio of free to total PSA. *BJU Int* 2000;85:686-9

احتیاط!

با توجه به اینکه محلول‌های به‌کار رفته در این کیت‌ها حاوی مواد سمی مانند تیروزول و مواد پروتئینی با منشأ انسانی و حیوانی هستند، و اینکه با هیچ تستی نمی‌توان از عدم وجود ویروس‌هایی چون HIV، HBV، HCV در 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 : Jul.2020

تهران ۱۴۱۶۸، خیابان طالقانی غربی، خیابان شهید سرپرست (کیوان جنوبی)، پلاک ۲۶

تلفن و فکس: ۰۲۱)۶۳۴۸۱