

کیت سنجش AFP به روش الایزا

AFP یک مولکول گلیکو پروتئینی با وزن مولکولی ۷۰۰۰۰ دالتون است که از لحاظ ژنتیکی و ساختاری بسیار شبیه آلبومین انسانی است و هر دو پروتئین توسط ژنی در کروموزوم ۴ کد می شوند. AFP اصلی ترین پروتئین در جریان خون جنین بوده که ابتدا توسط کیسه زرده و سپس کبد سنتز می شود. غلظت AFP در خون جنین در هفته نهم بارداری به حداکثر مقدار می رسد (۳۰۰۰۰۰۰۰ نانو گرم در میلی لیتر) و سپس به تدریج کاهش می یابد و در پایان بارداری به ۲۰۰۰۰۰ نانوگرم در میلی لیتر خواهد رسید. AFP از جنین به سرم مادر نیز وارد شده و بنابراین در دوران بارداری بویژه در سه ماهه سوم مقدار آن در سرم مادر افزایش می یابد. غلظت AFP در سرم مادر در هفته ۱۰ بارداری در حدود ۵ نانوگرم در میلی لیتر می رسد و غلظت آن به میزان ۱۵ درصد به ازای هر هفته افزایش می یابد بطوری که در هفته ۲۵ بارداری به حدود ۱۸۰ نانوگرم در میلی لیتر خواهد رسید و مقدار آن پس از زایمان به حدود ۲ نانوگرم در میلی لیتر می رسد. AFP به مایع آمنیوتیک نفوذ کرده و غلظت آن در حدود ۱۵۰۰۰ نانوگرم در میلی لیتر در هفته ۱۶ بارداری می رسد. افزایش سطح سرمی در بیماریهای مختلفی دیده می شود که میتوان به کارسینوم سلول کبدی، برخی از تومورهای بیضه در بالغین اشاره کرد. علاوه بر این در تومورهای بدخیم کودکان نظیر هیپاتوبلاستوم و نوروبلاستوم نیز افزایش می یابد. بطور غیر شایع به دنبال مناساز بدخیمی های دستگاه گوارش به کبد ممکن است افزایش مشاهده شود. امروزه اندازه گیری در مایع آمنیوتیک و سرم مادر بطور گسترده به منظور تشخیص قبل از تولد نقص لوله های عصبی در جنین NTD مورد استفاده قرار می گیرد. کیت حاضر قابلیت اندازه گیری و تیتراسیون AFP را با اختصاصیت و حساسیت بالا دارا می باشد.

اساس آزمایش :

اساس این کیت به روش ساندویچ و با استفاده از آنتی بادیهای مونوکلونال می باشد. در این روش چاهکها توسط آنتی بادهایی علیه یک شاخص آنتی ژنیک AFP پوشش داده می شوند (Coating). نمونه بیماران با آنتی بادی پوشش داده شده در ته چاهکها مجاور شده، پس از انکوباسیون و شستشو، آنتی بادی ثانویه ضد AFP متصل به آنزیم HRP به چاهکها اضافه شده و انکوبه می گردد. مقدار کمپلکس ایمنی تشکیل شده در چاهکها با غلظت AFP در نمونه ها متناسب است. پس از شستشو، محلول رنگزا که محتوی هیدروژن پراکسید (H₂O₂) و کروموزن است به 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 AFP (Anti-AFP 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 0, 5, 20, 50, 100, 200 ng/ml از AFP کالیبره شده در مقابل WHO 1st IS (استاندارد صفر حاوی ۲ میلی لیتر و سایر استانداردها حاوی ۱ میلی لیتر می باشند).
- ۴) سرم کنترل: دو ویال هر کدام حاوی ۱ میلی لیتر سرم کنترل با غلظت های 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: 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.
- 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 ۵۰ 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 انقضاء یاد 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 ۸ - ۲ 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 .

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 نیانجامد .

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) ۵۰ 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 برسب 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 بشوئید (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 میکرو لیتر 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 میکرو لیتر محلول متوقف کننده (Stop Solution) به هر چاهک ادامه واکنشهای آنزیمی را متوقف نمایید . برای سنجش جذب نوری از دستگاه الیزاریدر با فیلتر nm ۴۵۰ استفاده نمایید (توصیه می شود از فیلتر nm ۶۳۰ به عنوان فیلتر رفرانس استفاده گردد) .

محاسبه نتایج :

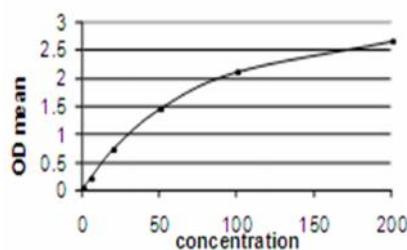
از هر دستگاه الیزاریدر با قابلیت سنجش جذب نوری در طول موج nm ۴۵۰ میتوان استفاده نمود .

۱) جذب نوری استانداردها و نمونه ها را به کمک دستگاه الیزاریدر در طول موج nm ۴۵۰ (و در صورت امکان در مقابل فیلتر رفرانس nm ۶۳۰) 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
0	0.03
5	0.20
20	0.71
50	1.44
100	2.12
200	2.66



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 الیزا بدست آمده بقرار زیر می باشد ولی پیشنهاد می گردد که هر آزمایشگاه مقادیر نرمال خود را بدست آورد :

محدوده مرجع برحسب واحد	
میانها	محدوده مرجع (۹۰٪حدود اطمینان)
2.2	0.2 – 8.5

هفته بارداری	غلظت AFP در سرم مادر (Median) (ng/ml)
15	28.6
16	33.8
17	40.3
18	45.5
19	53.3
20	57.2
21	67.6

شاخصهای اجرایی :

(۱) حداقل مقدار قابل اندازه گیری :

بر اساس جذب نوری استاندارد صفر و سه برابر انحراف معیار (SD) حداقل غلظت AFP قابل تشخیص در این کیت 0.2 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 ۳ سرم با غلظتهای مختلف AFP 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%
1	24	1.9	0.11	5.8
2	24	33	1.55	4.7
3	24	130	6	4.6

جدول شماره ۲ (اینترا-اسی) :

نمونه	تعداد دفعات تکرار تست	میانگین (ng/ml)	SD	CV%
1	10	1.92	0.16	8.3
2	10	32.3	2.4	7.4
3	10	131	7.7	5.9

*هر سری آزمایش بصورت Duplicate انجام شده است .

(ریکواری آزمایش :

سه نمونه سرم با مقادیر معلومی از AFP به ۴ سرم با غلظتهای مشخص AFP افزوده شد و ریکواری آنها محاسبه گردید که نتایج آن در جدول زیر آمده است :

نمونه	مقدار AFP موجود در سرم (ng/ml)	مقدار افزوده شده AFP (ng/ml)	مقدار مورد انتظار (ng/ml)	مقدار بدست آمده (ng/ml)	ریکواری (%)
۱	3.2	5	4.1	3.8	93
۱	3.2	20	11.6	11	95
۱	3.2	100	51.6	49	95
۲	18	5	11.5	12.5	109
۲	18	20	19	18	95
۲	18	100	59	56	95
۳	62	5	33.5	35	104
۳	62	20	41	39	95
۳	62	100	81	85	105
۴	167	5	86	81	94
۴	167	20	93.5	101	108
۴	167	100	133.5	125	94

۴) خطی بودن آزمایش :

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

ریکاوری (%)					مقدار AFP موجود در سرم رقیق نشده (ng/ml)	نمونه
رقت ۱/۳۲	رقت ۱/۱۶	رقت ۱/۸	رقت ۱/۴	رقت ۱/۲		
۹۳	۱۰۶	۸۹	۹۸	۱۰۴	۱۸۴	۱
۹۰	۹۵	۹۲	۱۰۰	۹۹	۸۷	۲
۱۰۸	۱۱۰	۹۸	۹۵	۱۰۲	۳۶	۳

(اثر هوک (Hook Effect) :

آزمایش AFP جهت سرمهایی با غلظت بسیار بالا از این آنالیت (تا $50 \mu\text{g/ml}$) صورت گرفت که پدیده هوک مشاهده نشد.

References:

- Johson p. j, (2002) Tumor markers in primary malignancies of the liver . In “ Tumor markers : physiology , pathology , technology and clinical applications “ . Dimandis E.P . AACC Press , Washington pp 269 – 276
- Stenman, U.H and Alfathan H (2002) Marker for testicular cancer . In “ Tumor markers : physiology , pathology , technology and clinical applications “ . Dimandis E.P . AACC Press , Washington pp 351 – 359
- Christiansen M , Hogdall C.K , Andersen J.R and Norgardpedersen B (2001) Alpha – fetoprotein in plasma and serum of healthy adults : preanalytical , aalytical and biological source of variation and construction of age – dependent reference intervals . Scand. J. Invest. 61 : 205 – 216
- Trape J , Botargues J.M , Porta F , Ricos C , Badal J . M , Salinas R . Sala M . and Roca A (2003) Reference change value for alpha fetoprotein and its application in early detection of hepatocellular carcinoma in patients with hepatic disease . Clin. Chem. 49 (7) : 1209 – 1211
- Nustad K , Paus E , Kierulf B , and Bormer O.P (1998) Specificity and affinity of 30 monoclonal antibodies against alpha fetoprotein . Tumor Biol. 19 : 293 – 300
- National Committee for Clinical Laboratory Standardization , Evaluation of precision performance of clinical chemistry devices . Approved Guideline EP 5 – A (1999)
- National Committee for Clinical Laboratory Standardization , National evaluation protocols for interference testing , Evaluation protocol number 7 , Vol 6 , No 13 , August (1986)

روش انجام آزمایش AFP بصورت شماتیک

چاهکهای کوت شده با آنتی بادی ضد AFP			
محلونها	استانداردها	سرم کنترل	نمونه
استانداردها	۵۰ میکرولیتر	-	-
سرم کنترل	-	۵۰ میکرولیتر	-
نمونه	-	-	۵۰ میکرولیتر
اسی بافر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر
<p>پلیت را به ملایمت برای مدت ۱۵ ثانیه تکان دهید تا محتویات چاهکها بخوبی مخلوط شوند و سپس دهانه چاهکها را با برچسب مخصوص پلیت بپوشانید . ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه کنید. برچسب پلیت را برداشته و محتویات چاهکها را خالی کنید . طبق دستور شستشو ۵ بار چاهکها را بشویید .</p>			
محلول آنزیم کنژوگه	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر
<p>دهانه چاهکها را با برچسب مخصوص پلیت بپوشانید . ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه کنید . برچسب پلیت را برداشته و محتویات چاهکها را خالی کنید . طبق دستور شستشو ۵ بار چاهکها را بشویید .</p>			
محلول رنگزا	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر
<p>۱۵ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی انکوبه کنید .</p>			
محلول متوقف کننده	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر
<p>جذب نوری چاهکها را در طول موج ۴۵۰ نانومتر (و در صورت امکان ۶۳۰ نانومتر به عنوان فیلتر رفرانس) قرائت کنید .</p>			