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

# آلفافتوپروتئین (AFP)

موارد استفاده :

تعیین کمّی AFP در سرم یا پلاسما

## I. مقدمه :

آلفافتوپروتئین (AFP) آلفاگلبولین اختصاصی سرم جنین، گلیکوپروتئینی با وزن ملکولی kDa۷۰ می باشد که از یک زنجیر پلی پپتیدی با ۴٪ کربوهیدرات تشکیل شده است[۱]. در ابتدای حاملگی AFP به مقدار فراوانی در کیسه زرده و کبد ساخته می شود. با بالارفتن سن جنین غلظت آن در سرم جنین افزایش یافته و در مایع آمنیوتیک و سرم مادر نیز قابل اندازه گیری می گردد[۲]. در هفته سیزدهم حاملگی، غلظت این گلیکوپروتئین در پلاسمای جنین به حدود ۳۰۰۰ µg/ml می رسد. AFP ساخته شده در طی هفته های ۲۲ تا ۳۲ حاملگی ثابت مانده و در اواخر ماه نهم غلظت آن تا سطح IU/ml۵۰۰۰-IU/ml۱۲۰،۰۰۰ کاهش می یابد[۳]. بعد از تولد این روند نزولی ادامه داشته، بطوری که در اواخر دو سالگی غلظت AFP به کمتر از ۱۰ IU/ml رسیده و در طول زندگی در همین سطح باقی می ماند[۴]. AFP از سرم جنین به داخل مایع آمنیوتیک و متعاقباً به سرم مادر می رسد، در نتیجه تغییرات آن در مایع آمینوتیک با میزان ان در سرم جنین و مادر ارتباط مستقیم دارد. غلظت این پروتئین در مایع آمنیوتیک صد مرتبه کمتر از مقدار آن در سرم جنین است[۵].

معمولاً میزان AFP خارج از محدوده تغییرات طبیعی در مایع آمنیوتیک و سرم مادر نشانگر وجود اختلال در تکامل و رشد است. به عنوان مثال در ۸۵ تا ۹۵٪ موارد بازمانده لوله عصبی جنین، میزان AFP سرم مادر بیش از حد نرمال[۶] و در ۳۰٪ موارد سندروم داون پائین تر از نرمال است[۷]. علاوه بر بارداری، مقدار AFP سرمی در بیماری های خوش خیم کبدی (هپاتیت و سیروز) و برخی سرطان ها (کارسینوم های سلول های کبدی، تومور کیسه زرده، کوریوکارسینوم ها و کارسینوم های جنینی) نیز افزایش می یابد. با اینکه در برخی از بدخیمی ها میزان AFP به بیش از IU/ml۱۰۰۰ می رسد ولی بهتر است جهت تشخیص زودرس تومورهای کوچک میزان IU/ml۱۵ تا ۲۰ را به عنوان سطح هشدار دهنده در نظر گرفت. البته در این موارد بایستی بیمار را از نظر هپاتیت و سیروز کبدی نیز مورد معاینه قرار داد. اندازه گیری AFP در بررسی نحوه درمان این بیماری ها نیز حائز اهمیت است به طوری که پس از عمل جراحی بالا رفتن میزان آن در سرم خون بیمار، نشانگر عدم برداشت صحیح غده یا متاستاتیک شدن آن می باشد.

## II. اصول اندازه گیری :

کیت اندازه‌گیری کمّی آلفافتوپروتئین بر مبنای سنجش واکنش ایمونوآنزیماتیک بر روی فاز جامد طراحی شده است. در این سیستم از دو آنتی بادی ( آنتی بادی پلی کلنال خرگوش و آنتی بادی مونوکلنال موش) که شاخص‌های آنتی ژنیک متمایزی را بر روی مولکول آلفافتوپروتئین شناسائی می کنند، استفاده شده است.

ابتدا به حفره‌های پلی استایرن پوشیده شده با آنتی بادی‌های پلی کلنال آلفافتوپروتئین، استانداردها، سرم کنترل‌ها و نمونه‌های بیماران افزوده می‌شود. در حین انکوباسیون اول، آلفافتوپروتئین موجود در نمونه‌ها به آنتی‌بادی‌های ضد آلفافتوپروتئین متصل شده و سپس بقیه مواد از طریق تخلیه و شستشو از سیستم خارج می‌شوند. پس از شستشو، آنتی‌بادی دوم ضد آلفافتوپروتئین که به آنزیم پراکسید از (HRP) متصل شده است به حفره‌ها افزوده می‌شود. بعد از دومین انکوباسیون و شستشو، افزودن سوبسترای TMB (۳و ۳'-۵ و ۵'تترامتیل بنزیدین) سبب ایجاد رنگ آبی توسط آنزیم می شود. شدت رنگ ایجاد شده با میزان آلفافتوپروتئین 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 آلفافتوپروتئین نمونه‌ها ابتدا منحنی جذب نور استانداردها برحسب غلظت آلفافتوپروتئین آنها رسم شده و سپس میزان غلظت آلفافتوپروتئین نمونه ها از روی منحنی استاندارد تعیین می‌گردد.

## III. محتویات کیت:

محلولهای این کیت(Cat.No.P-AFI) جهت انجام ۹۶ تست بوده و تاریخ انقضای هر یک بر روی شیشه 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 پلی کلنال ضد آلفافتوپروتئین خرگوش.

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

**۳. استانداردها :** ۵ ویال ۱/۵ میلی لیتری محلول سرم دار حاوی آلفافتوپروتئین انسانی، PBS، پروتئین و تیمروزال. غلظت های دقیق آلفافتوپروتئین استانداردها که توسط استاندارد بین‌المللی ( 72/225 IRP 1st)(سازمان بهداشت جهانی کالیبر شده اند بر روی برچسب آنها درج شده است.) =IU ۱/۲ng)

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

**۵. ردیاب آنزیمی :** یک ویال ۶ میلی لیتری آنتی بادی منوکلنال ضد آلفافتوپروتئین متصل به پراکسیداز (HRP) محلول در بافر PBS، حاوی پروتئین و تیمروزال.

**۶. بافر رقیق کننده :** یک ویال ۱۲ میلی لیتری محلول PBS حاوی پروتئین و تیمروزال.

**۷. محلول شستشو و غلیظ (x۲۰) :** یک ویال ۲۵ میلی لیتری حاوی 20 PBS-Tween و تیمروزال.

**۸. محلول رنگ زا :** یک ویال ۱۲ میلی لیتری بافر $H_2O_2$ و TMB.

**۹. محلول متوقف کننده واکنش :** یک ویال ۱۲ میلی لیتری $H_2SO_4$ دو 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 آلفافتوپروتئین، سرم یا مایع آمنیوتیک 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 نمود. برای اندازه گیری آلفافتوپروتئین 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 آلفافتوپروتئین 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 در ۳۷ 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 ۱۰۰ 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 بار با ۳۰۰ میکرو لیتر محلول شستشو بشوئید.

۴. به هر حفره ۵۰ میکرولیتر از کونژوگه ضد آلفافتوپروتئین (HRP) افزوده و به مدت ۳۰ دقیقه در حرارت اتاق قرار دهید.

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

۶. به هر حفره ۱۰۰ میکرو لیتر از سوبسترای TMB اضافه نمائید.

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

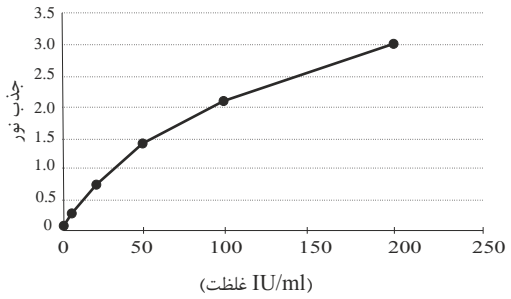
۸. ۱۰۰ میکرولیتر از محلول متوقف کننده واکنش را در هر حفره ریخته و به مدت ۱۰ ثانیه مخلوط کنید. میزان جذب نور حفره ها را در طول موج ۴۵۰ نانومتر (با دیفرانسیل ۶۳۰ نانومتر) حداکثر تا ۱۵ دقیقه بعد از افزودن محلول متوقف کننده، بخوانید.

## VII. محاسبه نتایج:

پس از تعیین میزان جذب نوری استانداردها و نمونه ها و ترسیم منحنی استاندارد، غلظت آلفافتوپروتئین 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 آلفافتوپروتئین در طول موج ۴۵۰ نانومتر و محور X شاخص غلظت استانداردهای آلفافتوپروتئین برحسب IU/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 AFP (IU/ml) |
|---|---|---|
| استاندارد A | ۰/۰۷ | ۰/۰ |
| استاندارد B | ۰/۲۵ | ۵ |
| استاندارد C | ۰/۷۵ | ۲۰ |
| استاندارد D | ۱/۴۴ | ۵۰ |
| استاندارد E | ۲/۱۱ | ۱۰۰ |
| استاندارد F | ۲/۹۹ | ۲۰۰ |
| سرم | ۱/۵۵ | ۷۵/۳ |

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



## VIII. مقادیر طبیعی:

با استفاده از سرم ۲۷۰ فرد سالم، مقادیر طبیعی AFP توسط کیت پادتن علم تعیین گردیده است. غلظت متوسط AFP در این نمونه ها IU/ml۱/۶ با انحراف معیار IU/ml۱/۴ می باشد. مقادیر طبیعی AFP در کتب رفرانس زیر IU/ml۱۰ گزارش شده است.

برای غلظت های طبیعی AFP در مایع آمنیوتیک و سرم مادر جدول زیر به عنوان یک راهنمائی کلی ارائه می گردد[۸].

| غلظت آلفافتوپروتئین (IU/ml) | | سن جنین (هفته) |
|---|---|---|
| مایع آمنیوتیک | سرم مادر | |
| $۱۱/۶x۱۰^{۳}$ | ۲۴ | ۱۵ |
| $۱۰/۲x۱۰^{۳}$ | ۲۷ | ۱۶ |
| $۸/۸x۱۰^{۳}$ | ۳۰ | ۱۷ |
| $۷/۴x۱۰^{۳}$ | ۳۵ | ۱۸ |
| $۶/۸x۱۰^{۳}$ | ۳۹ | ۱۹ |
| $۵/۶x۱۰^{۳}$ | ۴۵ | ۲۰ |

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

## IX. ویژگی های اختصاصی تست:

**۱. حساسیت:** به حداقل غلظت آلفافتوپروتئین که اختلاف جذب نور آن نسبت به جذب نور استاندارد صفر، معنی دار باشد حساسیت کیت گفته می شود. این مقدار برای کیت آلفافتوپروتئین IU/ml۰/۵ است.

**۲. اثر Hook:** در کیت EIA پادتن علم برای نمونه‌های رقیق نشده تا غلظت تقریبی ۲۰۰,۰۰۰ ml/IU اثر Hook مشاهده نشده است.

**۳. مقایسه با روش الکتروکمی لومینسانس آلفافتوپروتئین:** برای بررسی همبستگی آماری بین کیت EIA پادتن علم و کیت Roche Elecsys، غلظت آلفافتوپروتئین ۵۰۰ نمونه تصادفی با هر دو کیت اندازه گیری شد. مقایسه نتایج به دست آمده، ضریب همبستگی ۰/۹۷ 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(IU/ml) | %CV | SD | میانگین (IU/ml) |
| ۳/۷ | ۰/۳ | ۸/۱ | ۷/۵ | ۰/۶ | ۸/۰ |
| ۶/۶ | ۰/۸ | ۱۲/۱ | ۹/۲ | ۱/۱ | ۱۱/۹ |
| ۴/۵ | ۰/۹ | ۲۰/۰ | ۵/۶ | ۱/۲ | ۲۱/۴ |
| ۸/۸ | ۴/۸ | ۵۴/۵ | ۱۱/۰ | ۶/۷ | ۶۰/۵ |

**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 آلفافتوپروتئین به نمونه سرمی که غلظت پائینی از آلفافتوپروتئین دارد، افزوده شده است. درصد ریکاوری طبق فرمول زیر محاسبه می‌شود:

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

دامنه درصد ریکاوری بدست آمده مابین ۸۷/۵ تا ۱۰۰/۰ می‌باشد.

**جدول ریکاوری**

| ریکاوری ٪ | غلظت اندازه گیری شده (IU/ml) | غلظت پیش بینی شده (IU/ml) | غلظت افزوده شده (IU/ml) |
|---|---|---|---|
| - | ۱۶/۷ | - | - |
| ۹۱/۴ | ۲۲/۲ | ۲۴/۳ | ۷/۳ |
| ۱۰۰/۰ | ۳۱/۴ | ۳۱/۴ | ۱۴/۷ |
| ۸۷/۵ | ۴۶/۲ | ۵۲/۸ | ۳۶/۱ |

برای بررسی خطی بودن رقتهای آلفافتوپروتئین 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 ۹۶/۵ تا ۱۰۷/۳ می‌باشد.

**جدول رقت**

| ریکاوری ٪ (IU/ml) | غلظت اندازه گیری شده (IU/ml) | غلظت پیش بینی شده (IU/ml) | رقت |
|---|---|---|---|
| - | ۲۸/۸ | - | - |
| ۹۶/۵ | ۱۳/۹ | ۱۴/۴ | ۱:۲ |
| ۱۰۷/۳ | ۷/۷ | ۷/۲ | ۱:۴ |
| ۱۰۳/۱ | ۳/۷ | ۳/۶ | ۱:۸ |

## X.References

1.Nishi, S" Watabe, H. and Hirai, H. Immunological and chemical correlation between AFP from human and several mamalian species. Annals of the New York Academy of Sciences. 259:109,1975

2.Gitlin, D.,A. Perricelli and G. M. Gitlin. Synthesis of AFP by liver, yolk sac, and Gastrointestinal tracked of the human conceptus. Cancer Res. 32:979,1972.

3.Leek, A. E. and Chard, T. In Proceedings of colloquium on AFP: Nice. 1974.

4.Massayef, R., Gilli, J., Krebs. B" Callivaud, A and Bonet, C. Evolution of AFP serum levels throughout life in humans and rals and during pregnancy in the rat. Annals of the New York Academy of Sciences. 259:17,1975.

5-Haddon, J. E" Macri, J.N. And Munson, M. The amnion regulates movement of fetally derived AFP into maternal blood. Journal of laboratory and clinical medicine. 94:344,1979

6.U.K.Collaborative study: Maternal serum AFP measurement in antenatal screening for anencephaly and spina bifida in early pregnancy: Report of U.K. Collaborative study on AFP in relation to Neural-Tube Defects. Lancets, 1:1323,1977.

7.Haddon, J. E., Palomaki, G. E., Knight G. J. et al.: Prenatal screening for Down's syndrome with use of maternal serum markers. N. Engl. J. Med., 327:588,1992.

8.Burtis C. A., Ashwood E. R" Fundamentals of clinical chemistry. 4th Edition: 789,1999.

**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، HIV 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 سرپرست(کیوان جنوبی)، پلاک ۲۶
تلفن و فکس : ۶۳۴۸۱(۰۲۱)