

QUY TRÌNH

23.230.(21). QUY TRÌNH ĐỊNH LƯỢNG p2PSA

I. NGUYÊN LÝ

p2PSA là xét nghiệm miễn dịch enzyme 2 vị trí gắn (kiểu “Sandwich”). Mẫu bệnh phẩm được thêm vào giếng phản ứng cùng với chất cộng hợp kháng thể (đơn dòng, chuột) kháng [-2]PSA – alkaline phosphatase, các hạt thuận từ phủ kháng thể (đơn dòng, chuột) kháng [-2]proPSA và dung dịch khóa (blocking reagent). [-2]proPSA có trong mẫu bệnh phẩm gắn với kháng thể đơn dòng kháng [-2]proPSA đã được cố định trên pha rắn, cùng lúc đó, chất cộng hợp kháng thể đơn dòng kháng PSA – alkaline phosphatase phản ứng với các vị trí kháng nguyên khác trên phân tử [-2]proPSA. Sau khi ủ trong giếng phản ứng, các chất gắn với pha rắn sẽ được giữ lại trong từ trường, các thành phần không gắn sẽ bị rửa trôi. Tiếp đó, chất nền quang hóa Lumi-Phos 530 được thêm vào giếng phản ứng và ánh sáng tạo ra bởi phản ứng được đo bằng bộ phận đo quang (luminometer). Cường độ ánh sáng tạo ra tỷ lệ thuận với nồng độ [-2]proPSA có trong mẫu phản ứng. Lượng chất cần phân tích trong mẫu được xác định dựa trên đường cong chuẩn đa điểm đã được lưu trong máy.

II. CHUẨN BỊ

1. Cán bộ thực hiện: 01 Bác sỹ hoặc Cán bộ đại học và 01 kỹ thuật viên chuyên ngành Hóa sinh

2. Phương tiện, hóa chất:

- Phương tiện: Máy xét nghiệm miễn dịch DxI800- Beckman Coulter
- Hóa chất: Thuốc thử định lượng p2PSA bao gồm:
 - + R1a : Các hạt thuận từ (phủ streptavidin) được phủ kháng thể (đơn dòng, chuột) kháng [-2]proPSA, muối đệm TRIS, chất hoạt động bề mặt, Albumin huyết thanh bò (BSA), < 0,1% Natri azide, và 0,1% ProClin 300
 - + R1b: Dung dịch khóa (Blocking reagent): citrat, chất hoạt động bề mặt, albumin huyết thanh bò, alkaline phosphatase, protein (chuột, dê, bò), < 0,1% sodium azide, 0,1% ProClin 300.
 - + R1c: Chất cộng hợp alkaline phosphatase (bò)- kháng thể (đơn dòng, chuột) kháng PSA, dung dịch muối đệm phosphate, chất hoạt động bề mặt, albumin huyết thanh bò, protein của chuột, < 0,1% Natri azide; 0,25% ProClin 300.

- Bảo quản thẳng đứng, ổn định cho tới khi hết hạn sử dụng ghi trên nhãn ở (2-10°C). Sau khi mở, thuốc thử ổn định trong 28 ngày khi bảo quản ở 2- 10°C. Lớp nhựa đàn hồi gắn trên hộp thuốc thử bị bong ra hoặc giá trị kiểm chứng nằm ngoài dải là dấu hiệu cho thấy có thể thuốc thử đã bị hỏng, cần loại bỏ hộp thuốc thử nếu hộp bị hỏng (ví dụ: lớp nhựa đàn hồi bị bong).

1. Người bệnh: Người bệnh được giải thích về mục đích của việc lấy máu để làm xét nghiệm, bệnh nhân nhịn ăn ít nhất 10h trước khi lấy máu, tránh căng thẳng mắt ngủ trước ngày lấy máu.

2. Phiếu xét nghiệm: Có đầy đủ thông tin về bệnh nhân bao gồm họ tên, tuổi, khoa phòng, chẩn đoán của bệnh nhân và ghi rõ chỉ định xét nghiệm, ngày giờ chỉ định, lấy mẫu, nhận mẫu,...

III. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

1. Lấy bệnh phẩm và xử lý bệnh phẩm:

- Lấy 2 mL máu tĩnh mạch vào ống không có chất chống đông. Máu không vỡ hồng cầu.

- Bệnh phẩm được nhận từ các khoa lâm sàng và bộ phận lấy mẫu phòng khám. Nhân viên nhận mẫu lấy thông tin bệnh nhân từ phần mềm quản lý Bệnh viện, in và dán barcode vào ống bệnh phẩm, sau đó cho ly tâm ngay 4000 vòng trong 5 phút tách lấy huyết thanh (không sử dụng huyết tương) và bảo quản lạnh trong vòng 3 giờ sau khi lấy máu.

- Mẫu huyết thanh ổn định trong vòng 24 giờ ở 2- 8°C; 5 tháng ở -20°C hoặc lạnh hơn. Nếu lưu giữ trong khoảng thời gian dài hơn 5 tháng, mẫu bệnh phẩm cần được làm đông lạnh ở -70°C.

2. Tiến hành kỹ thuật:

Máy phân tích cần chuẩn bị sẵn sàng để thực hiện phân tích mẫu: máy đã được chuẩn với xét nghiệm p2PSA, kết quả kiểm tra chất lượng với xét nghiệm p2PSA đạt yêu cầu không nằm ngoài dải cho phép và không vi phạm luật kiểm tra chất lượng.

Cán bộ thực hiện phân tích mẫu nhập dữ liệu về thông tin bệnh phẩm và chỉ định xét nghiệm vào máy phân tích hoặc hệ thống mạng.

Nạp bệnh phẩm vào máy phân tích

Ra lệnh cho máy thực hiện phân tích mẫu bệnh phẩm

Đợi máy phân tích mẫu theo protocol của máy

Khi có kết quả cần xem xét đánh giá kết quả sau đó in phiếu kết quả xét nghiệm để trả cho bệnh nhân.

VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Giá trị tham chiếu:

Tất cả các đối tượng nằm trong độ tuổi từ 50 - 84 có giá trị PSA huyết thanh từ 2-10 ng/mL (sử dụng hiệu chuẩn Hybritech) và thăm khám trực tràng bằng ngón tay (DRE) cho thấy không có dấu hiệu nghi ngờ ung thư. Những đối tượng này đại diện cho “vùng xám chẩn đoán”, trong đó PSA được xác định ở đối tượng nam giới có nguy cơ cao (tỷ lệ ung thư là 25% ở đàn ông trên 50 tuổi) nhưng độ đặc hiệu lâm sàng có thể được cải thiện. Nguy cơ ung thư tuyến tiền liệt (của khoảng 25%) được so sánh giữa hai dải giá trị PSA, từ 2-4 ng/mL và 4-10 ng/mL.

Bảng: PSA, fPSA, [-2]proPSA, %fPSA và chỉ số *phi* Beckman Coulter
Giá trị mong đợi bởi chẩn đoán (Hiệu chuẩn PSA và PSA tự do theo Hybritech)

		Lành tính	Ung thư	Toàn phần
PSA (ng/mL) Hiệu chuẩn Hybritech	Trung vị	5,09	5,28	5,15
	Trung bình $\pm$	5,29 $\pm$ 1,95	5,35 $\pm$ 1,87	5,31 $\pm$ 1,91
	SD			1,99 -
	Dải giá trị	1,99 - 10,04	2,02 - 9,68	10,04
fPSA (ng/mL) Hiệu chuẩn Hybritech	Trung vị	0,98	0,80	0,90
	Trung bình $\pm$	1,04 $\pm$ 0,51	0,92 $\pm$ 0,55	0,99 $\pm$ 0,53
	SD			0,18 - 4,34
	Dải giá trị	0,26 - 4,34	0,18 - 3,91	
[-2]proPSA (pg/mL) [†]	Trung vị	12,44	13,41	12,94
	Trung bình $\pm$	13,84 $\pm$ 6,79	16,08 $\pm$ 10,30	14,85 $\pm$
	SD			8,61
	Dải giá trị	2,86 - 43,54	3,98 - 90,78	2,86 - 90,78
%fPSA	Trung vị	19,38	16,15	17,80
	Trung bình $\pm$	20,33 $\pm$ 7,94	17,51 $\pm$ 8,05	19,06 $\pm$
	SD			8,11
	Dải giá trị	3,51 - 53,22	5,37 - 51,07	3,51 - 53,22

				32,59
	Trung vị	29,42	37,63	37,14 ±
<i>phi</i>	Trung bình ±	31,81 ± 13,25	43,69 ± 26,64	21,20
	SD	13,67 - 94,44	14,03 - 325,80	13,67 -
	Dải giá trị			325,80

2. Ý nghĩa lâm sàng:

Trong huyết thanh, PSA tồn tại ban đầu ở cả hai đồng dạng: dạng tự do “không tạo phức” (fPSA) hoặc dạng “phức hợp” (cPSA) gắn với chất ức chế protease huyết thanh alpha 1- antichymotrypsin. Thông thường, 70 – 90% PSA trong huyết thanh là cPSA, còn lại là fPSA, %fPSA (tỷ lệ fPSA so với PSA) trong huyết thanh được chứng minh là nâng cao đáng kể việc phân biệt ung thư tuyến tiền liệt với các bệnh tuyến tiền liệt lành tính khác, đặc biệt ở những bệnh nhân có nồng độ PSA nằm trong khoảng 4 – 10 ng/mL. Giá trị %fPSA càng cao thì nguy cơ mắc ung thư tuyến tiền liệt càng thấp, trong khi giá trị %fPSA < 10% đồng nghĩa với nguy cơ mắc ung thư cao hơn.

Các dạng tồn tại khác của fPSA là ProPSA và BPSA cho thấy mối liên hệ với bệnh lớn hơn so với PSA, fPSA hay cPSA riêng lẻ. Các dạng cắt ngắn của proPSA trong các mô ung thư thuộc vùng ngoại vi tăng cao hơn so với trong các mô BPH (phì đại lành tính tuyến tiền liệt). ProPSA tăng trong các mô ung thư của tuyến tiền liệt, trong khi BPSA tăng trong các mô thuộc vùng chuyển tiếp các nốt BPH (nốt tăng sản) và tăng cao hơn so với nồng độ của nó ở các mô vùng ngoại vi. ProPSA tìm thấy ở dạng gốc chứa một đoạn pro peptide dẫn đường (pro leader peptide) gồm 7 acid amin ([–7]proPSA), tương tự như các dạng pro peptide dẫn đường cắt ngắn khác. Các dạng cắt ngắn của proPSA chủ yếu gồm ProPSA gắn với một đoạn pro peptide dẫn đường gồm 5 acid amin ([–5]proPSA), 4 acid amin ([–4]proPSA) hoặc 2 acid amin ([–2]proPSA). [–2]proPSA là pro peptide đáng chú ý nhất vì đây là dạng chủ yếu được tìm thấy khi chiết xuất khối u và thể hiện màu nhuộm miễn dịch trong khối u tuyến tiền liệt cao hơn so với mô lành tính. Ngoài ra, trong chẩn đoán *in vitro*, [–2]proPSA cũng là dạng ổn định nhất trong số 5 dạng proPSA đã được xác định.

Chỉ số *phi* Beckman Coulter được tính toán dựa trên nồng độ của PSA, fPSA, và [–2]proPSA (kết quả được thực hiện trên cùng một mẫu bệnh phẩm), được thiết kế để tối ưu hóa độ nhạy và độ đặc hiệu lâm sàng, hỗ trợ trong việc xác định nguy cơ ung thư tuyến tiền liệt. Kết quả chỉ số *phi* Beckman Coulter nên được đánh giá trong toàn cảnh lâm sàng của bệnh nhân, bao gồm: triệu chứng, lịch sử bệnh, dữ liệu từ các xét nghiệm bổ sung và các thông tin phù hợp khác.

Chỉ số *phi* Beckman Coulter không phải là bằng chứng tuyệt đối cho thấy sự hiện diện hay vắng mặt của ung thư tiền liệt tuyến. Nồng độ PSA tăng, chỉ số *phi* Beckman Coulter tăng hay %fPSA giảm trong cả huyết thanh của bệnh nhân mắc các bệnh lành tính lẫn bệnh nhân mắc ung thư tuyến tiền liệt. Ngoài ra, nồng độ PSA thấp, chỉ số *phi* Beckman Coulter giảm hay %fPSA tăng chưa thể chắc chắn bệnh nhân không mắc ung thư. Các giá trị PSA, fPSA và p2PSA trong huyết thanh nên được sử dụng kết hợp với các thông tin sẵn có từ đánh giá lâm sàng của bệnh nhân và các phương pháp chẩn đoán khác như thăm khám trực tràng bằng ngón tay (DRE). Một số trường hợp mới mắc ung thư tuyến tiền liệt sẽ không thể xác định được bằng xét nghiệm PSA; điều này cũng tương tự đối với thăm khám trực tràng bằng ngón tay (DRE). Sinh thiết tuyến tiền liệt là phương pháp chuẩn được sử dụng để chẩn đoán ung thư tiền liệt tuyến.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

1. Đối với những mẫu bệnh phẩm có nồng độ protein toàn phần tăng cao (> 80 g/L), protein toàn phần có thể trở thành yếu tố gây nhiễu. Do đó, cần thận trọng khi đánh giá kết quả ở những bệnh nhân có nồng độ protein toàn phần tăng cao.

2. Việc sử dụng thường xuyên các thuốc ức chế 5 α -reductase làm giảm nồng độ PSA, fPSA và [-2]proPSA trong huyết thanh bệnh nhân. Những thuốc khác được dùng để điều trị phì đại lành tính tuyến tiền liệt cũng có thể ảnh hưởng tới nồng độ PSA. Do đó, cần thận trọng khi đánh giá kết quả ở những bệnh nhân đang sử dụng các thuốc này.