

کیت اندازه گیری **Free-PSA** در سرم انسان
Free-PSA ELISA Kit 96t
Cat. No: 3924-96 / Rev: C4 (1404/09/08)

مقدمه:

PSA، گلیکوپروتئینی است که به میزان زیاد در لومن پروستات یافت می شود. سطوح افزایش یافته PSA سرم، با سرطان پروستات ارتباط دارد. هر چه حجم تومور بیشتر باشد، سطح PSA سرم هم بیشتر خواهد بود. سنجنش PSA همچنین یک تست حساس برای پیش پاسخ به درمان می باشد. PSA در جریان خون به دو شکل آزاد (fPSA) و فرم متصل به پروتئین های مهارکننده پروتئاز شامل α₁-آنتی کیموتریپسین و α₂-ماکروگلوبولین وجود دارد که در مجموع PSA توتال (tPSA) نامیده می شوند. در هایپرپلازی خوش خیم پروستات (BPH)، سطح fPSA در خون افزایش می یابد، در حالی که سرطان پروستات با افزایش فرم متصل همراه است. بنابراین، درصد PSA آزاد (fPSA %) با سرطان پروستات ارتباط معکوس دارد. حیطة کاربرد این کیت، اندازه گیری سطح Free-PSA در سرم انسان می باشد.

اصول آزمایش:

این آزمایش براساس الایزای ساندویچ ترتیبی طراحی شده است. با اضافه شدن آنتی بادی بیوتینیل و سرم حاوی آنتی ژن به چاهک، بی حرکت سازی کمپلکس های ایمنی توسط واکنش بین استرپتاویدین تثبیت شده در کف چاهکها و آنتی بادی بیوتینیل ضد fPSA صورت می گیرد. پس از شستشوی چاهکها، آنتی بادی متصل به آنزیم HRP اضافه شده و کمپلکس های ایمنی تشکیل می شوند. پس از به تعادل رسیدن واکنش و شستشوی مجدد چاهکها، با افزودن محلول رنگزا (سوبسترای آنزیم HRP) و سپس محلول متوقف کننده، محصول نهایی تولید می شود که بیشترین جذب نوری را در طول موج ۴۵۰ نانومتر دارد. مقدار رنگ ایجاد شده و در نتیجه شدت جذب نوری با غلظت fPSA سرم، ارتباط مستقیم دارد. در نهایت غلظت fPSA سرم به کمک منحنی استاندارد محاسبه می گردد.

محتویات کیت:

- ۱) میکروپلیت ۹۶ تستی حاوی استرپتاویدین تثبیت شده.
- ۲) کالیبراتور (Free-PSA Cal A - F): شش ویال در غلظت های ۰، ۰/۵، ۱، ۲/۵، ۵، ۱۰ و ۱۰۰ ng/mL تهیه شده از سرم انسان.

- ۳) محلول کونژوگه آنزیمی (Free-PSA Enzyme Conjugate): یک ویال ۱۱ میلی لیتری حاوی آنتی بادی متصل به آنزیم HRP.
- ۴) محلول کونژوگه بیوتینی (Free-PSA Biotin Conjugate): یک ویال ۱۱ میلی لیتری حاوی آنتی بادی متصل به بیوتین در بافر.

- ۵) محلول شستشو (Wash Solution-50X): یک ویال ۲۰ میلی لیتری.

- ۶) محلول رنگزا A (Substrate Solution A): یک ویال ۶/۵ میلی لیتری.

- ۷) محلول رنگزا B (Substrate Solution B): یک ویال ۶/۵ میلی لیتری.

- ۸) محلول متوقف کننده واکنش (Stop Solution): یک ویال ۱۲ میلی لیتری.

- ۹) محلول کنترل سطح یک (Control Level 1): یک ویال ۰/۵ میلی لیتری.

- ۱۰) محلول کنترل سطح دو (Control Level 2): یک ویال ۰/۵ میلی لیتری.

۱۱) بر چسب مخصوص پلیت: یک ورق.

توجه ۱: غلظت کالیبراتورها در هر سری تولید مطابق با مقادیر درج شده بر روی لیبل آن ها و گواهی آنالیز محصول (COA) می باشد. کلیه محلول ها در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد نگهداری شوند. محلول متوقف کننده در دمای اتاق نیز قابل نگهداری است. توجه ۲: مقادیر کنترل ها در COA درج شده است.

مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نمی باشند:

- ۱) دستگاه خوانش گر پلیت دارای فیلتر ۴۵۰ و ۶۳۰ نانومتر (فیلتر مرجع).
- ۲) سمپلر کالیبره.
- ۳) آب مقطر دیونیزه.

احتیاط در استفاده از کیت:

- ۱) محتویات این کیت برای استفاده در همین کیت تعبیه گردیده است؛ لذا از استفاده مشترک با سایر کیت ها و یا شماره های ساخت دیگر جداً خودداری نمایید.
- ۲) تمام محلول ها تا زمان انقضاء کیت پایدار هستند. از محلول هایی که تاریخ انقضاء آن ها گذشته است استفاده نکنید.
- ۳) توجه فرمایید که محلول ها در معرض نور مستقیم قرار نگیرند.

۴) محتویات این کیت با منشأ انسانی از نظر منفی بودن HIV1/2، HBSAg و HCV بررسی شده اند؛ ولی تشخیص قطعی در مورد منفی بودن تمام عوامل عفونی بیماری زا با استفاده از روش های متداول آزمایشگاهی امکان پذیر نیست. بنابراین با توجه به احتمال آلودگی و بیماری زایی محتویات کیت، تمام مراحل آزمایش باید مطابق با دستورالعمل های ایمنی انجام شوند.

۵) استفاده از دستکش و عینک در هنگام کار الزامی است و در هنگام کار با کیت دقت فرمایید که محتویات آن بر روی صورت یا سایر نقاط بدن ریخته نشود. از تماس مواد با دهان و سایر مخاط جداً جلوگیری کنید.

۶) نمونه بیماران، کنترل ها، چاهکها و سر سمپلرهای استفاده شده باید به عنوان پسماندهای عفونی در نظر گرفته شوند و مطابق با الزامات دفع پسماندهای عفونی امحاء گردند.

جمع آوری و آماده سازی نمونه:

۱) نمونه مناسب برای این آزمایش سرم است. ناشتا بودن فرد (ترجیحاً به مدت ۴ ساعت قبل از نمونه گیری) به هنگام نمونه گیری در درستی نتایج به دست آمده تأثیرگذار خواهد بود. نمونه خون با استفاده از تکنیک استاندارد خون گیری سیاهرگی تهیه شود و سرم بعد از لخته شدن کامل خون (۳۰ تا ۶۰ دقیقه) از سلول های خونی جدا گردد. حتی الامکان از نمونه های ایکتریک، لیپمیک و همولیز استفاده نشود.

۲) در افرادی که دوز بالای از بیوتین (>5 mg/day) را دریافت می کنند، نمونه گیری باید حداقل ۸ ساعت پس از دریافت آخرین دوز بیوتین انجام شود.

۳) درب ظرف نمونه ها باید کاملاً بسته باشد. نمونه ها تا ۸ ساعت در دمای اتاق و تا ۲ روز در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد و حداکثر ۱ ماه در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد قابل نگهداری و استفاده هستند. از منجمد و ذوب کردن مکرر نمونه ها خودداری کنید.

آماده سازی و نگهداری معرف ها:

۱) آماده سازی و نگهداری محلول شستشو: حجم ۲۰ میلی لیتر از محلول شستشو (50X) را به ۹۸۰ میلی لیتر آب مقطر دیونیزه اضافه و پس از آماده سازی در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد نگهداری کنید. در صورت مشاهده رسوب در محلول شستشو، آن را در بن ماری ۳۷ درجه سانتی گراد قرار دهید تا رسوب حل شود. در صورت مشاهده کدورت در محلول شستشو، از مصرف آن خودداری کنید.

۲) آماده سازی محلول رنگزا: قبل از شروع استفاده از کیت، کل حجم محلول رنگزا B (ویال روشن) را داخل محلول رنگزا A (ویال تیره) خالی نمایید و برای انجام تست تا پایان مصرف کیت استفاده نمایید. در صورت مشاهده رنگ آبی و یا کدورت در محلول رنگزا، از مصرف آن خودداری فرمایید.

روش انجام آزمایش:

قبل از شروع آزمایش مطمئن شوید که تمام اجزاء کیت، کنترل و نمونه ها به دمای اتاق (۲۲ تا ۲۸ درجه سانتی گراد) رسیده اند. کالیبراتورها، نمونه ها و کنترل ها را با ۵ بار سر و ته کردن به آرامی یکنواخت کنید.

۱) تعداد چاهک های مورد نیاز برای انجام آزمایش را بردارید و بقیه چاهکها را همراه رطوبت گیر در کیسه آلومینیومی قرار دهید، درب آن را بسته و در دمای ۸-۲ درجه سانتی گراد نگهداری نمایید.

۲) حجم ۵۰ میکرولیتر از کالیبراتورها، نمونه ها یا کنترل را در چاهک های مورد نظر بریزید. بهتر است که از هر نمونه یا کالیبراتور به صورت دوتایی (دوپلیکیت) در چاهکها ریخته شود.

۳) حجم ۱۰۰ میکرولیتر محلول کونژوگه بیوتینی به همه چاهکها اضافه کنید و پلیت را به مدت ۳۰ ثانیه روی سطح میز به آرامی تکان دهید.

۴) چاهکها را با برچسب مخصوص پلیت ببوشانید و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.

۵) محتویات چاهکها را با وارونه کردن در آسپیراسیون تخلیه کنید. سپس چاهکها را ۳ مرتبه و هر مرتبه با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشو آماده شده، (بخش آماده سازی معرفها را مطالعه فرمایید) بشویید. اگر شستشو به صورت دستی انجام می شود، در انتهای شستشو پلیت را به آرامی بر روی دستمال رطوبت گیر بزنید.

به منظور انجام شستشوی مناسب و استاندارد چاهکها، مطابق با فیلم قرار داده شده در وبسایت شرکت اقدام نمایید.

۶) حجم ۱۰۰ میکرولیتر از کونژوگه آنزیمی به همه چاهکها اضافه کنید. از تکان دادن پلیت در این مرحله خودداری نمایید.









۷) چاهکها را با برچسب مخصوص پلیت ببوشانید و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.

۸) شستشوی چاهکها را مطابق با بند ۵ تکرار نمایید.

¹ <http://www.idealdiag.com/Training.aspx>

Shelf Stability Test: بررسی پایداری ۸ عدد کیت به مدت ۲ سال در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و ارزیابی نتایج به صورت هر سه ماه یک بار می‌باشد. مطالعات مختلف بررسی پایداری نشان می‌دهد که کیت مورد نظر در زمان‌های مشخص شده پایدار است. معیار پذیرش در آزمایش‌های مربوط به تعیین پایداری، تغییر نتایج کمتر از ۲۰ درصد است.

علائم استفاده شده در پرچسب کالاها

	Manufacturer
	Date of manufacture
	Use-by date
	Batch code
	In vitro diagnostic medical device
	Catalogue number
	Contains sufficient for tests
	Temperature limit

References:

- Pagana KD. Mosby's manual of diagnostic and laboratory tests. Elsevier Health Sciences; Nov 8. (2013).
 - Salameh WA, Redor-Goldman MM, Clarke NJ, Reitz RE, Caulfield MP. Validation of a total testosterone assay using high-turbulence liquid chromatography tandem mass spectrometry: total and free testosterone reference ranges. Steroids. 75 (2): 169-75. Feb 28. (2010).
 - McPherson & Pincus. Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. 22nd Edition. (2011).
- در صورت بروز هرگونه مشکل خواهشمند است با شماره‌های مندرج بر روی جعبه (بخش پشتیبانی) تماس بگیرید.
- توجه:** چنانچه از دستگاه‌های ایژا پروسور استفاده می‌کنید، می‌توانید تنظیمات دستگاه خود را از شرکت دریافت نمایید.

(۴) بررسی درستی-آزمون خطی بودن (Linearity)
 در این تست غلظت fPSA در رقت‌های مختلف نمونه سرم برای تعیین خطی بودن کیت اندازه‌گیری شد. معیار پذیرش در این آزمایش $Bias < 10\%$ است.

No.	Sample (ng/mL)	1/2	1/4	1/8	1/16
1	2.3	-1.1	-2.6	-2.3	-3.3
2	5.8	0	0.8	-2.4	1.7
3	9.3	-1.8	-1.5	1.2	-2.1

(۵) بررسی ویژگی-آزمون واکنش متقاطع (Cross Reactivity)
 ویژگی این آزمایش به کمک اضافه کردن غلظت‌های مختلفی از مواد مندرج در جدول زیر به نمونه‌های سرم، ارزیابی شده است. واکنش متقاطع با اندازه‌گیری نسبت بین مقدار ماده اضافه شده به مقدار fPSA مورد نیاز برای ایجاد همان مقدار جذب، بررسی شده است. معیار پذیرش واکنش متقاطع (بسته به نوع آنالیت و ماده اضافه شده) برای آنالیت در محدوده $10 \pm 10\%$ درصد و برای ماده اضافه شده حداکثر تا ۲۵ درصد است.

Analyte	Concentration
AFP	10 µg/mL
Atropine	100 µg/mL
Acetylsalicylic acid	100 µg/mL
Ascorbic acid	100 µg/mL
Caffeine	100 µg/mL
Dexamethasone	10 µg/mL
Flutamide	100 µg/mL
hCG	100 IU/mL
hLH	100 IU/mL
Methotrexate	100 µg/mL
Prolactin	100 µg/mL
TSH	100 mIU/mL

(۶) بررسی حساسیت (Sensitivity)

حساسیت کیت بر اساس Limit of Detection (LOD) و Limit of Blank (LOB) با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد و برابر با 0.08 ng/mL تعیین گردید.

$$LOD = LOB + 1.645 SD_s$$

$$LOB = \text{Mean}_b + 1.645 SD_b$$

(s: Diluted sample & b: Blank)

(۷) بررسی پایداری (Stability)

Accelerated Stability Test: بررسی پایداری کیت به مدت ۴ هفته در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد.

In Use Stability Test: بررسی پایداری کیت پس از باز کردن درب محلول‌ها، به مدت ۸ هفته در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد.

مقادیر مورد انتظار برای تست ایژای fPSA

شرکت تولیدکننده کیت، مقادیر مورد انتظار برای این آزمایش را به قرار زیر مشخص کرده است. اگرچه، این مقادیر باید برای آنالیت مورد نظر توسط آزمایشگاه تعیین گردد.

Expected value (ng/mL)	
مردان سالم	≤ 1.0

پارامترهای کنترل کیفی

(۱) بررسی دقت-آزمون دقت درون‌دور (Within-Run)

دقت درون‌دور با ارزیابی تکرارپذیری نتایج حاصل از سه نمونه سرم با غلظت‌های متفاوت در یک نوبت‌کاری (۲۰ بار تکرار برای هر نمونه) بررسی شد. معیار پذیرش در این آزمایش $CV < 10\%$ است.

Serum Sample	1	2	3
No. of Repeats	20	20	20
Mean fPSA (ng/mL)	0.68	3.7	9.85
SD (ng/mL)	0.04	0.19	0.46
CV (%)	5.9	5.1	4.7

(۲) بررسی دقت-آزمون دقت بین‌دور (Between-Run)

دقت بین‌دور با ارزیابی تجدیدپذیری نتایج حاصل از سه نمونه سرم با غلظت‌های متفاوت در ۴ نوبت‌کاری (۵ بار تکرار برای هر نمونه در هر نوبت‌کاری) انجام شد. معیار پذیرش در این آزمایش $CV < 10\%$ است.

Serum Sample	1	2	3
No. of Repeats	20	20	20
Mean fPSA (ng/mL)	0.76	4.5	8.4
SD (ng/mL)	0.05	0.26	0.47
CV (%)	6.6	5.8	5.6

(۳) بررسی درستی-آزمون بازیابی (Recovery)

در این آزمایش به ازای هر آزمون، دو نمونه سرم به نسبت مساوی با یکدیگر ترکیب شد و به‌عنوان یک نمونه، غلظت fPSA در آن سنجش گردید. معیار پذیرش در این آزمایش، $Bias < 10\%$ نسبت به نتیجه مورد انتظار است.

No.	Sample (ng/mL)	Added (ng/mL)	Exp. (ng/mL)	Obs. (ng/mL)	% Rec.
1	1.3	10.2	5.75	5.63	97.9
2	12.11	1.2	6.65	6.52	98
3	0.5	9.51	5	5.15	103

(۹) حجم ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رنگزای آماده شده (بخش آماده‌سازی معرف‌ها را مطالعه فرمایید) درون تمام چاهک‌ها بریزید و پلیت را به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه کنید. از تکان دادن پلیت در این مرحله خودداری نمایید.

توجه: اگر بالاترین میزان جذب نوری کالیبراتور کمتر از ۲ به‌دست آمد، می‌توانید زمان انکوباسیون محلول رنگزا را به مدت ۱۵ دقیقه افزایش دهید.

(۱۰) حجم ۵۰ میکرولیتر از محلول متوقف‌کننده به تمام چاهک‌ها اضافه کنید و پلیت را به مدت ۲۰ ثانیه به آرامی تکان دهید تا تمام رنگ آبی آن به زرد تبدیل شود.

(۱۱) مقدار جذب را برای هر چاهک در طول موج ۴۵۰ نانومتر با استفاده از روش Point to Point حداکثر تا ۱۵ دقیقه بعد از متوقف کردن واکنش بخوانید (از طول موج رفرانس ۶۲۰ تا ۶۳۰ نانومتر استفاده کنید). میزان جذب و نمودار کالیبراتورهای این کیت به عنوان نمونه در زیر ارائه شده است.

Calibrators	Well Number	OD	Mean OD	Conc. (ng/mL)
Cal. A	A1	0.021	0.023	0
	B1	0.025		
Cal. B	C1	0.181	0.188	0.5
	D1	0.195		
Cal. C	E1	0.362	0.371	1
	F1	0.380		
Cal. D	G1	0.982	0.999	2.5
	H1	1.016		
Cal. E	A2	1.618	1.631	5
	B2	1.644		
Cal. F	C2	2.686	2.695	10
	D2	2.704		

