

کیت اندازه گیری Total PSA در سرم انسان  
**PSA ELISA Kit 96t**  
Cat. No: 0924-96 / Rev: C4 (1404/09/26)

**مقدمه:**

آنتی ژن اختصاصی پروستات (PSA) یک آنزیم سرین پروتئاز است که سطح سرمی آن در انواع تومورهای خوش خیم، بدخیم و متاستاتیک پروستات افزایش می یابد. سرطان پروستات، دومین فرم شایع سرطان در آقایان است و سنجش مقادیر افزایش یافته PSA نقش مهمی در تشخیص سریع این بیماری دارد. هر چه حجم تومور بیشتر باشد، سطح PSA سرم هم بیشتر خواهد بود و بر این اساس، سنجش سطح PSA، تستی حساس برای پیش پاسخ به درمان است. علاوه بر سرطان پروستات، بالا رفتن غلظت PSA سرم در بیماری که به بزرگ شدن خوش خیم پروستات مبتلا هستند و یا دچار عفونت و التهاب بافت های تناسلی مجاور هستند نیز گزارش شده است. حیطة کاربرد این کیت اندازه گیری کمی غلظت PSA در نمونه سرم انسان به روش الیزا است.

**اصول آزمایش:**

این آزمایش براساس الیزای ساندویچ 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 چاهک ها و آنتی بادی بیوتینیل ضد PSA صورت می گیرد. پس از شستشوی چاهک ها، آنتی بادی متصل به آنزیم HRP اضافه شده و کمپلکس های ساندویچ تشکیل می شوند. پس از به تعادل رسیدن واکنش و شستشوی مجدد چاهک ها، 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 PSA سرم، ارتباط مستقیم دارد. در نهایت غلظت PSA سرم به کمک منحنی استاندارد محاسبه می گردد.

**محتویات کیت:**

- ۱) میکروپلیت ۹۶ تستی حاوی استرپتاویدین تثبیت شده.
- ۲) کالیبراتورهای (PSA Cal A-F). شش ویال در غلظت های ۰، ۰/۵، ۱، ۲۵ و ۵۰ ng/mL تهیه شده از سرم انسان.
- ۳) محلول کونژوگه آنزیمی (PSA Enzyme Conjugate). یک ویال ۱۱ میلی لیتری حاوی آنتی بادی متصل به آنزیم HRP.
- ۴) محلول کونژوگه بیوتینی (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: 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 کنید.

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 منشاء 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، چاهک ها 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، آماده سازی و نگهداری نمونه:**

۱) نمونه مناسب برای این آزمایش سرم است. ناشتا بودن فرد 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 شود. حتی الامکان از نمونه های ایکتریک، لیپمیک و همولیز استفاده نکنید.

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 ۱ روز در دمای اتاق و تا ۵ روز در دمای ۸ تا ۸ درجه سانتی گراد و حداکثر تا 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 چاهک ها 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 ۲۵ میکرولیتر از کالیبراتورها، نمونه ها و یا کنترل در چاهک های مورد نظر بریزید. بهتر است که از هر نمونه یا کالیبراتور به صورت دوتایی (دوپلیکیت) در چاهک ها ریخته شود.

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









۴) چاهک ها را با برچسب مخصوص پلیت بیوشانید و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.

۵) محتویات چاهک ها را با وارونه کردن یا اسپیراسیون تخلیه کنید. سپس چاهک ها را ۳ مرتبه و هر مرتبه با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشو آماده شده، (بخش آماده سازی معرف را مطالعه فرمایید) بشویید. اگر شستشو به صورت دستی انجام می شود، در انتهای شستشو پلیت را به آرامی بر روی دستمال رطوبت گیر بریزید. به منظور انجام شستشوی مناسب و استاندارد چاهک ها، مطابق با فیلم قرار داده شده در وب سایت شرکت اقدام نمایید.

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

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

#### علامت استفاده شده در برچسب کالاها

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

#### References:

- Hara, M. and Kimura, H. Two prostate-specific antigens, gamma-seminoprotein and beta-microseminoprotein. J. Lab. Clin. Med. 113:541-548;
- Yuan, J.J.; Coplen, D.E.; Petros, J.A.; Figenshau, R.S.; Ratliff, T.L.; Smith, D.S. and Catalona, W.J. Effects of rectal examination, prostatic massage, ultrasonography and needle biopsy on serum prostate specific antigen levels. J. Urol. 147: 810-814; (1992).
- McPherson & Pincus. Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. 22<sup>nd</sup> Edition. (2011).

در صورت بروز هرگونه مشکل خواهشمند است با شماره‌های مندرج بر روی جعبه (بخش پشتیبانی) تماس بگیرید. **توجه:** چنانچه از دستگاه‌های ایزا پروسور استفاده می‌کنید، می‌توانید تنظیمات دستگاه خود را از شرکت دریافت نمایید.

#### ۴) بررسی درستی-آزمون خطی بودن (Linearity)

در این تست غلظت PSA در رقت‌های مختلف نمونه سرم برای تعیین خطی بودن کیت اندازه‌گیری شد. معیار پذیرش در این آزمایش Bias < 18.7% است.

No.	Sample (ng/mL)	% Bias			
		1/2	1/4	1/8	1/16
1	2.3	-1	-2.6	-2	-3
2	6.8	0	-0.8	-2.4	-1.7
3	11.9	-2.8	3.4	-1.5	-1.4

#### 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 PSA 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  $100 \pm 10$  درصد و برای ماده اضافه شده حداکثر تا ۲۵ درصد است.

Analyte	Concentration
Acetylsalicylic Acid	100 µg/mL
Ascorbic acid	100 µg/mL
Caffeine	100 µg/mL
CEA	10 µg/mL
AFP	10 µg/mL
CA 125	10,000 IU/mL
hCG	1000 IU/mL
hLH	10 IU/mL
hTSH	100 mIU/mL
hPRL	100 µg/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  $0.09 \text{ ng/mL}$  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.

#### مقادیر مورد انتظار برای تست الیزای PSA

شرکت تولید کننده 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	
مردان سالم	< 4 ng/mL

#### 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 PSA (ng/mL)	1.34	6.8	16.91
SD (ng/mL)	0.07	0.31	0.67
CV (%)	5.2	4.6	4.0

#### 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 PSA (ng/mL)	2.53	5.41	15.11
SD (ng/mL)	0.14	0.26	0.68
CV (%)	5.5	4.8	4.5

#### ۳) بررسی درستی-آزمون بازیابی (Recovery)

در این آزمایش به ازاء هر آزمون، دو نمونه سرم به نسبت مساوی با یکدیگر ترکیب شد و به‌عنوان یک نمونه، غلظت PSA در آن سنجش گردید. معیار پذیرش در این آزمایش،  $\text{Bias} < 18.7\%$  نسبت به نتیجه مورد انتظار است.

No.	Sample (ng/mL)	Added (ng/mL)	Exp. (ng/mL)	Obs. (ng/mL)	Rec. (%)
1	15.6	11.2	13.4	13.7	102.2
2	9.7	1.9	5.8	5.7	98.3
3	18.5	2.5	10.5	10.1	96.2

۶) حجم ۱۰۰ میکرولیتر محلول کونژوگه آنزیمی به هر چاهک اضافه کنید. از تکان دادن پلیت در این مرحله خودداری کنید.

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

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

۹) حجم ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رنگزای آماده شده (بخش آماده‌سازی معرف‌ها را مطالعه بفرمایید) 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 کنید.

توجه: اگر بالاترین میزان جذب 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 متد Point to Point حداکثر تا ۱۵ دقیقه بعد از متوقف کردن واکنش بخوانید. (از طول موج فرانس ۶۲۰ تا ۶۳۰ نانومتر استفاده کنید). میزان جذب و نمودار کالیبراتورهای این کیت به‌عنوان نمونه در زیر آورده شده است.

Calibrators	Well Number	OD	Mean OD	Conc. (ng/mL)
Cal. A	A1	0.013	0.019	0
	B1	0.025		
Cal. B	C1	0.303	0.311	2.5
	D1	0.319		
Cal. C	E1	0.525	0.534	5
	F1	0.543		
Cal. D	G1	0.942	0.948	10
	H1	0.954		
Cal. E	A2	1.829	1.841	25
	B2	1.853		
Cal. F	C2	2.547	2.565	50
	D2	2.583		

