کیت اندازه‌گیری Free-PSA در سرم انسان

Free-PSA ELISA Kit 96t Cat. No: 3924-96
Brochure Rev: 06 (1399/08/06)

مقدمه:

PSA، گلیکوپروتئینی است که به میزان زیاد در لومن پروستات یافت می‌شود. موانع قابل توجهی نظیر بافت غده‌ای پروستات و ساختارهای عروقی، بین لومن پروستات و جریان خون قرار دارند. این موانع حفاظتی با ایجاد بیماری‌هایی نظیر سرطان پروستات، عفونت و هیپرتروفی خوش‌خیم پروستات، از بین می‌روند که منجر به افزایش سطح PSA در خون می‌شود.

سطوح افزایش یافته PSA سرم، با سرطان پروستات ارتباط دارد. مقادیر بیش از ng/ml ۴ در بیش از ۸۰ درصد مردان با سرطان پروستات یافت می‌شود. هر چه حجم تومور بیشتر باشد، سطح PSA سرم هم بیشتر خواهد بود. سنجش PSA همچنین یک تست حساس برای پایش پاسخ به درمان می‌باشد. جراحی موفق، پرتو درمانی یا هورمون درمانی با کاهش قابل توجه سطح سرمی PSA همراه است. افزایش مجدد قابل توجه PSA متعاقبا بر عود سرطان پروستات دلالت دارد. البته افزایش سطح PSA در برخی از مبتلایان به سرطان پروستات اولیه رخ نمی‌دهد و همچنین مقادیر PSA بیشتر از ng/ml ۴ نیز همواره با سرطان همراه نیست.

PSA در جریان خون به دو شکل آزاد (fPSA) و فرم متصل به پروتئین‌های مهار کننده پروتئاز شامل α_1-آنتی‌کیموتریپسین و α_2 - ماکروگلوبولین وجود دارد که (cPSA) نام داشته و در مجموع، PSA توتال (tPSA) نامیده می‌شوند. در هایپرپلازی خوش‌خیم پروستات (BPH)، بیشتر فرم آزاد PSA در خون افزایش می‌یابد، در حالی که در سرطان پروستات، فرم متصل بیشتری وجود دارد. درصد PSA آزاد (%fPSA) با سرطان پروستات ارتباط معکوس دارد.

$$\%fPSA = (fPSA/tPSA) * 100$$

مطالعات نشان می‌دهند که %fPSA مارکر بهتری جهت تشخیص سرطان پروستات در بیماران با tPSA بین ۴ تا ۱۰ ng/ml بوده و حتی استفاده از آن جهت پیش‌بینی بروز سرطان پروستات در افرادی که tPSA آنها کمتر از ng/ml ۴ باشد نیز موثر است. %fPSA کمتر از ۶٪ نشاندهنده سرطان پروستات و بیش از ۲۳٪ معمولا با BPH همراه است.

اصول آزمایش:

در این روش بی‌حرکت سازی در سطح چاهک توسط واکنش بین استرپتاویدین کوت شده در سطح پلیت و آنتی‌بادی مونوکلونال ضد fPSA بیوتینیله شده که به چاهک‌ها اضافه می‌شود، صورت می‌گیرد. با مخلوط شدن آنتی‌بادی متصل به آنزیم، آنتی‌بادی منوکلونال بیوتینیله شده و سرم حاوی آنتی‌ژن، واکنش بین آنتی‌ژن و آنتی‌بادی‌ها بدون هیچ رقابتی صورت می‌گیرد و کمپلکس ساندویچی محلولی ایجاد می‌شود.

به موازات واکنش فوق، کمپلکس ساندویچی ایجاد شده به دلیل تمایل بسیار بالای بین استرپتاویدین و بیوتین به سطح پلیت متصل می‌شود. پس از به تعادل رسیدن واکنش، اجزاء متصل نشده تخلیه شده و پس از شستشوی چاهک‌ها، محلول رنگزا درون آنها ریخته می‌شود که سوبسترای آنزیم HRP است و محصول آبی رنگی ایجاد می‌کند که با افزودن محلول متوقف کننده به رنگ زرد تغییر رنگ می‌دهد. این محصول در طول موج ۴۵۰ نانومتر بیشترین میزان جذب را دارد. شدت رنگ ایجاد شده و در نتیجه مقدار جذب با غلظت fPSA سرم ارتباط مستقیم دارد. در نهایت غلظت fPSA سرم به کمک منحنی استاندارد (نمودار کالیبراتورها) محاسبه می‌گردد.

محتویات کیت:

۱. میکروپلیت Coat شده با استرپتاویدین ۹۶ تستی، بسته‌بندی شده در کیسه آلومینیومی همراه با رطوبت‌گیر.

۲. کالیبراتورهای free-PSA در مقادیر ۰، ۰/۵، ۱، ۲/۵، ۵ و ۱۰ ng/ml، تهیه شده درسرم انسان.

۳. کونژوگه آنزیمی free-PSA : ۱ ویال ۱۱ میلی‌لیتری که حاوی آنتی‌بادی متصل به آنزیم HRP و آنتی‌بادی متصل به بیوتین در بافر است.

۴. محلول شستشو (۵۰x) : ۱ ویال ۲۰ میلی‌لیتری.

۵. محلول رنگزا A: ۱ ویال ۶/۵ میلی‌لیتری.

۶. محلول رنگزا B: ۱ ویال ۶/۵ میلی‌لیتری.

۷. محلول متوقف کننده: ۱ویال ۱۲ میلی‌لیتری.

۸ بر چسب مخصوص پلیت: ۱ ورق.

توجه: کلیه محلول‌ها در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شوند. محلول متوقف کننده در دمای اتاق نیز قابل نگهداری است.

احتیاط در استفاده از کیت:

۱. محتویات این کیت برای استفاده در همین کیت تعبیه گردیده لذا از استفاده مشترک با سایر کیت‌ها و یا شماره‌های ساخت دیگر جدا خودداری نمایید.

۲. کلیه محلول‌ها تا زمان انقضاء کیت پایدار هستند. از محلول‌هایی که تاریخ انقضاء آنها گذشته است، استفاده ننمایید.

۳. توجه فرمایید محلول‌ها در مجاورت نور و گرما قرار نگیرند.

۴. مواد مورد استفاده در این کیت با منبع انسانی، از نظر منفی بودن HIV1/2، HBsAg و HCV تست شده‌اند. ولی هیچ روشی به طور کامل قادر به مشخص کردن منفی بودن موارد فوق نیست. بنابراین لازم است به صورت بالقوه آلوده در نظر گرفته شود و کار با آنها طبق دستورالعمل‌های ایمنی انجام شود.

۵. استفاده از دستکش و عینک در هنگام کار الزامی است و در هنگام کار با کیت دقت فرمائید که محتویات روی صورت یا سایر نقاط بدن ریخته نشود و از تماس با دهان و سایر مخاط جدا خودداری گردد.

جمع‌آوری و آماده‌سازی نمونه:

۱. گرفتن خون باید با استفاده از تکنیک استاندارد خون‌گیری سیاهرگی انجام شود و به سرعت سرم از سلول‌های خونی جدا گردد. از انجام تست بر روی نمونه‌های لیپمیک همراه باکدورت و همولیز خودداری نمائید. نمونه‌های پلاسما جهت انجام این تست مناسب نمی‌باشند.

۲. درب ظروف نمونه باید کاملا بسته باشد و تا ۳ روز می‌توان آنها را در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد و برای مدت طولانی‌تر حداکثر تا ۱۵ روز در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری کرد.

آماده‌سازی معرف‌ها:

محلول شستشو: کل محتویات ویال محلول شستشو (۵۰X) را با ۹۸۰ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط کنید.

محلول رنگزا: ۱ میلی‌لیتر از محلول رنگزا A را با ۱ میلی‌لیتر از محلول رنگزا B مخلوط نمایید. محلول فوق پس از ۱۰ دقیقه قابل استفاده و برای ۲ ردیف کافی می‌باشد.

توجه: در صورت مشاهده رنگ آبی در محلول رنگزا و یا کدورت و رشد باکتری، از این محلول استفاده نشود

روش انجام آزمایش:

قبل از شروع آزمایش اطمینان حاصل کنید کلیه معرف‌ها و نمونه‌ها به دمای اتاق (۲۰ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد) رسیده‌اند. کلیه کالیبراتورها را با سر و ته کردن به آرامی مخلوط نمائید.

۱. تعداد چاهک‌های مورد نیاز برای انجام تست را برداشته و بقیه چاهک‌ها را همراه رطوبت‌گیر در کیسه آلومینیومی قرار داده درب آن را بسته و در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگه دارید.

۲. ۵۰ میکرولیتر از کالیبراتورها و نمونه‌ها را در چاهک‌های مورد نظر بریزید. بهتر است که از هر نمونه یا کالیبراتور به صورت دوتایی (Duplicate) در چاهک‌ها ریخته شود.

توجه: حتماً چاهک اول به عنوان بلانک در نظر گرفته شود. در این چاهک نمونه و یا کالیبراتور ریخته نشود. بقیه مراحل با سایر چاهک‌ها یکسان می‌باشد.

۳. ۱۰۰ میکرولیتر محلول کونژوگه آنزیمی (Enzyme Conjugate) 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 بپوشانید و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.

۵. محتویات چاهک‌ها را با وارونه کردن پلیت خارج کنید. سپس ۵ مرتبه و هر مرتبه با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشو بشویید. اگر شستشو به صورت دستی انجام می شود در انتهای شستشو پلیت را به آرامی بر روی دستمال رطوبت‌گیر بزنید.

۶. ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رنگزا 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.

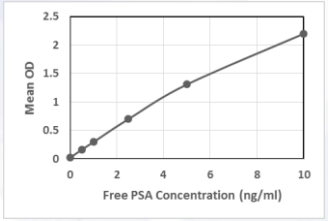
توجه: اگر بالاترین میزان جذب نوری کالیبراتور کمتر از ۲ به دست آمد، می‌توانید زمان انکوباسیون محلول رنگزا را به مدت ۱۰ دقیقه افزایش دهید.

۷. ۵۰ میکرولیتر محلول متوقف کننده به کلیه چاهک‌ها اضافه کنید و پلیت را به مدت ۲۰ ثانیه به آرامی تکان دهید تا تمام رنگ آبی آن به زرد تبدیل شود.

۸. مقدار جذب را برای هر چاهک در طول موج ۴۵۰ نانومتر با استفاده از روش Point to Point حداکثر تا ۳۰ 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	Abs	Mean Abs	Value (ng/ml)
Cal A	A1	0.018	0.019	0
	B1	0.021		
Cal B	C1	0.165	0.162	0.5
	D1	0.160		
Cal C	E1	0.290	0.295	1
	F1	0.301		
Cal D	G1	0.695	0.699	2.5
	H1	0.703		
Cal E	A2	1.295	1.308	5
	B2	1.321		
Cal F	C2	2.186	2.200	10
	D2	2.214		



مقادیر مورد انتظار برای تست الایزای free - PSA

Expected value	
مردان سالم	≤ 1.3 ng/ml

پارامترهای کنترل کیفی

Intra - Assay

دقت داخلی با ارزیابی تکرارپذیری سه نمونه سرم در یک نوبت تست انجام گردید.

Serum sample	1	2	3
No. of Repeats	20	20	20
Mean fPSA (ng/ml)	0.68	3.7	9.85
S.D. (ng/ml)	0.03	0.19	0.46
C.V (%)	4.4	5.1	4.6

Inter - Assay

ارزیابی دقت بین‌تستی با سه نمونه متفاوت سرم در ۳ نوبت هر نوبت ۵ بار انجام شد.

Serum sample	1	2	3
No. of Repeats	15	15	15
Mean fPSA (ng/ml)	0.76	4.5	8.4
S.D. (ng/ml)	0.05	0.26	0.47
C.V (%)	6.5	5.7	5.6

Recovery

در این تست دو نمونه سرم به نسبت مساوی با یکدیگر ترکیب شده و به عنوان یک نمونه غلظت fPSA در آن اندازه‌گیری شد.

NO.	Sample (ng/ml)	Added (ng/ml)	Exp. (ng/ml)	Obs. (ng/ml)	Rec. (%)
1	1.3	10.2	5.75	5.7	99
2	12.1	1.2	6.65	6.5	98
3	0.5	9.5	5	5.15	103

Linearity

در این تست غلظت fPSA در رقت‌های مختلف نمونه سرم برای تعیین خطی بودن کیت اندازه‌گیری شد.

NO.	Sample	1/2	1/4	1/8	1/16
		Bias %			
1	2.3	-1	-2.6	-2	-3
2	5.8	0	0.8	-2.4	1.7
3	9.3	-1.8	-1.54	1.2	-2.1

Specificity

اختصاصیت این آزمایش به کمک اضافه کردن غلظت‌های مختلفی از مواد مداخله گر به سرم، مورد سنجش قرار گرفت. واکنش متقاطع با اندازه‌گیری نسبت بین مقدار ماده مداخله‌گر به مقدا fPSA مورد نیاز برای ایجاد همان مقدار جذب، سنجش شد.

Analyte	Cross Reactivity
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

Sensitivity

بر اساس جمع میانگین جذب نوری کالیبراتور صفر و سه برابر انحراف معیار، حداقل غلظت قابل تشخیص در این کیت ۰/۰۱ ng/mL می‌باشد.

References:

1. Pagana KD. Mosby's manual of diagnostic and laboratory tests. Elsevier Health Sciences; Nov 8. (2013).
2. 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).
3. 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.

www.idealdiag.com
تهران - بزرگراه آبشناسان - سردارجنگل شمالی - خیابان پنج تن - بلوار قدس - کوچه دوم شرقی - پلاک ۱۵
تلفن: ۲۳-۰۲۱۸۵۵۱۹۵۱۹