کیت اندازه‌گیری
Total Prostate Specific Antigen (tPSA)
در سرم انسان

PSA ELISA Kit 96t Cat. No: 0924-96
Brochure Rev: 06 (1399/03/17)

مقدمه:

PSA، یک سرین پروتئاز با فعالیتی مشابه کیموتریپسین می‌باشد. نام PSA به دلیل اینکه یک آنتی‌ژن نرمال ویژه بافت پروستات است و در هیچ بافت نرمال یا بدخیم دیگری یافت نمی‌شود، انتخاب شده است. افزایش مقادیر PSA سرم در انواع تومورهای خوش‌خیم، بدخیم و متاستاتیک پروستات مشاهده می‌شود. سرطان پروستات، دومین فرم شایع سرطان در آقایان است، از این رو سنجش مقادیر افزایش یافته PSA، نقش مهمی در تشخیص سریع این بیماری دارد. سنجش PSA سرم در مقایسه با اسیدفسفاتاز پروستاتیک (PAP) به دلیل حساسیت بالاتر، کاربرد بیشتری در تشخیص و پیگیری درمان بیماران دارد.

مقادیر PSA بیش از ۴ ng/ml در بیش از ۸۰ درصد مردان با سرطان پروستات مشاهده می‌شود. هر چه حجم تومور بیشتر باشد، سطح PSA سرم هم بیشتر خواهد بود. همچنین سنجش سطح PSA یک تست حساس برای پایش پاسخ به درمان می‌باشد. جراحی موفق، پرتودرمانی یا هورمون‌درمانی با کاهش قابل توجه سطح سرمی PSA همراه است. افزایش قابل توجه مجدد PSA متعاقبا بر عود سرطان پروستات دلالت دارد.

علاوه بر سرطان پروستات، بالا رفتن غلظت PSA سرم در بیمارانی که به بزرگ شدن خوش‌خیم پروستات مبتلا هستند و یا دچار عفونت و التهاب بافت‌های تناسلی مجاور هستند نیز گزارش شده است. با این وجود سطح PSA سرم، مفیدترین تومورمارکر و شاخص دقیقی برای تشخیص و درمان سرطان پروستات می‌باشد. بنابراین اندازه‌گیری PSA سرم، ابزار مهمی در تشخیص سرطان پروستات و بررسی اثرات مؤثر جراحی یا سایر درمان‌ها می‌باشد.

اصول آزمایش:

در این روش بی‌حرکت سازی در سطح چاهک‌ها توسط واکنش بین استرپتاویدین (Streptavidin) کوت شده در سطح پلیت و آنتی‌بادی مونوکلونال ضد PSA بیوتینیله شده که به چاهک‌ها اضافه می‌شود، صورت می‌گیرد. با مخلوط کردن آنتی‌بادی منوکلونال بیوتینیله شده، آنتی‌بادی متصل به آنزیم و سرم حاوی آنتی‌ژن، واکنش بین آنتی‌ژن و آنتی‌بادی‌ها بدون هیچ رقابتی صورت می‌گیرد و کمپلکس‌های ساندویچ محلول ایجاد می‌شوند. به موازات واکنش فوق، کمپلکس‌های ایمنی به دلیل تمایل بسیار بالای بین استرپتاویدین و بیوتین، به سطح پلیت متصل می‌شوند. پس از به تعادل رسیدن واکنش، اجزاء متصل نشده تخلیه می‌شوند. پس از شستشوی چاهک‌ها، سوبسترای آنزیم HRP (محلول رنگزا) درون آنها ریخته می‌شود و محصول آبی‌رنگ تولید می‌شود که پس از اضافه کردن محلول متوقف کننده، به رنگ زرد تغییر رنگ می‌دهد. این محصول در طول موج ۴۵۰ نانومتر بیشترین میزان جذب را دارد. شدت رنگ و در نتیجه میزان جذب با غلظت PSA سرم ارتباط مستقیم دارد. در نهایت غلظت PSA سرم به کمک منحنی استاندارد (نمودار کالیبراتورها) محاسبه می‌گردد.

محتویات کیت:

۱. میکرو پلیت Coat شده با استرپتاویدین ۹۶ تستی بسته‌بندی شده در کیسه آلومینیومی همراه با رطوبت‌گیر.

۲. کالیبراتورهای PSA در مقادیر ۰، ۲/۵، ۵، ۱۰، ۲۵ و ۵۰ ng/ml تهیه شده درسرم انسان.

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

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

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

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

۷. محلول متوقف‌کننده واکنش: ۱ویال ۱۲ میلی‌لیتری.

۸. بر چسب مخصوص پلیت: ۱ ورق

۹. محلول کنترل: ۱ ویال ۰/۵ میلی‌لیتری

توجه: کلیه محلول‌ها در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شوند. محلول متوقف‌کننده 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. محتویات این کیت منبع انسانی دارد. مواد مورد استفاده در این کیت از نظر منفی بودن HBsAg، HIV1/2 و HCV بررسی 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.

۶. در هنگام کار دقت فرمائید که محتویات به صورت یا سایر نقاط بدن نپاشد 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.

۲. از انجام تست بر روی نمونه‌های لیپمیک همراه با کدورت و همولیز خودداری نمائید. نمونه های پلاسما جهت انجام این تست مناسب نمی‌باشند.

۳. درب ظروف نمونه باید کاملا بسته باشد و تا ۵ روز می توان آنها را در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد و برای مدت طولانی‌تر حداکثر تا ۱ ماه 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 بعد 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، نمونه‌ها و کالیبراتورها به دمای اتاق (۲۵-۲۰ درجه سانتی‌گراد) رسیده‌اند. کلیه کالیبراتورها را با سر و ته کردن به آرامی مخلوط نمائید.

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

۲. ۲۵ میکرولیتر از کالیبراتورها، نمونه‌ها و کنترل 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 استاندارد ریخته نشود. بقیه مراحل با سایر چاهک‌ها یکسان می‌باشد.

۳. ۱۰۰ میکرولیتر محلول کونژوگه آنزیمی (Enzyme Conjugate) به هر چاهک 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 ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.

۵. محتویات چاهک‌ها را با وارونه کردن پلیت تخلیه کنید. سپس چاهک‌ها را ۵ مرتبه و هر مرتبه با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشو بشویید. اگر شستشو به صورت دستی انجام می‌شود 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.

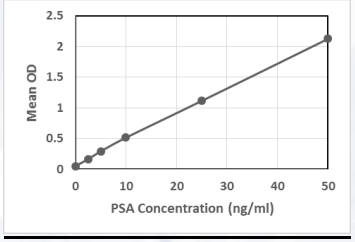
توجه: اگر بالاترین میزان جذب کالیبراتور کمتر از ۲ به دست آمد، می‌توانید زمان انکوباسیون محلول رنگزا را به مدت ۱۰ دقیقه افزایش دهید.

۷. ۵۰ میکرولیتر از 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 متد 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 آورده شده است.

calibrators	Well Number	Abs	Mean Abs	Value (ng/ml)
Cal A	A1	0.058	0.052	0
	B1	0.047		
Cal B	C1	0.156	0.164	2.5
	D1	0.172		
Cal C	E1	0.289	0.291	5
	F1	0.293		
Cal D	G1	0.509	0.515	10
	H1	0.521		
Cal E	A2	1.102	1.114	25
	B2	1.126		
Cal F	C2	2.108	2.126	50
	D2	2.144		



مقادیر مورد انتظار برای تست الایزای PSA

Expected value	
مردان سالم	< 4 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 PSA (ng/ml)	1.34	6.8	16.9
S.D (ng/ml)	0.05	0.31	0.67
C.V (%)	3.7	4.5	3.9

Inter - Assay

ارزیابی دقت بین تستی 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 PSA (ng/ml)	2.5	5.4	15.1
S.D (ng/ml)	0.14	0.26	0.88
C.V (%)	5.6	4.8	5.8

Recovery

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

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	2.6	10.5	10.1	96.2
4	10.2	14.6	12.4	12.1	97.6

Linearity

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

NO.	Sample	1/2	1/4	1/8	1/16
		recovery %			
1	2.3	99	97.4	98	97
2	6.8	100	99.2	97.6	98.3
	11.9	97.2	103.4	98.5	98.6
3	18.7	98.2	98.5	101.2	97.9

Specificity

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

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

Sensitivity

بر اساس جمع میانگین جذب نوری کالیبراتور صفر و سه برابر انحراف معیار حداقل غلظت قابل تشخیص در این کیت ng/mL ۰/۰۵ می‌باشد.

References:

1. Hara, M. and Kimura, H. Two prostate-specific antigens, gamma-seminoprotein and beta-microseminoprotein. J. Lab. Clin. Med. 113:541-548; (1989).
2. 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).
3. McPherson & Pincus. Henry`s Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. 22nd Edition. (2011).

Brochure Rev: 06 (1399/03/17)

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