

# MONOKIT

کیت اندازه‌گیری Total PSA در سرم انسان  
PSA ELISA Kit 96t  
Cat. No: 0934-96 / Rev: A1 (1402/09/25)

## مقدمه:

آنتی‌ژن اختصاصی پروستات (PSA) یک آنزیم سرین پروتاز است که سطح سرمی آن در انواع تومورهای خوش‌خیم، بدخیم و متاستاتیک پروستات افزایش می‌یابد. 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 پایش پاسخ به درمان است. 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. حیطة کاربرد این کیت اندازه‌گیری کمی سطح PSA در نمونه سرم انسان به روش الیزا است.

## اصول آزمایش:

این تست براساس الیزای ساندویچ طراحی شده است. در این روش بی‌حرکت‌سازی کمپلکس‌های ایمنی در کف چاهک‌ها توسط واکنش بین استرپتاویدین تثبیت شده در کف چاهک و آنتی‌بادی بیوتینیل مونوکلونال ضد PSA صورت می‌گیرد. با مخلوط کردن آنتی‌بادی منوکلونال بیوتینیل شده، آنتی‌بادی متصل به آنزیم HRP و سرم حاوی آنتی‌ژن، واکنش بین آنتی‌ژن و آنتی‌بادی‌ها بدون هیچ رقابتی صورت می‌گیرد. پس از به‌تعادل رسیدن واکنش و شستشوی چاهک-ها، با افزودن محلول رنگزا (سوبسترای آنزیم HRP) و سپس محلول متوقف‌کننده محصول نهایی تولید می‌شود که بیشترین جذب نوری را در طول موج ۴۵۰ نانومتر دارد. میزان رنگ و در نتیجه شدت جذب نوری با غلظت PSA سرم ارتباط مستقیم دارد. در نهایت غلظت PSA سرم به کمک منحنی استاندارد محاسبه می‌گردد.

## محتویات کیت:

- ۱) میکروپلیت ۹۶ تستی حاوی استرپتاویدین تثبیت شده.
  - ۲) کالیبراتورهای (PSA Cal A-F): شش ویال در غلظت های ۰، ۲/۵، ۵، ۱۰، ۲۵ و ۵۰ ng/mL تهیه شده از سرم انسان.
  - ۳) محلول کونژوگه آنزیمی (PSA Enzyme Conjugate): یک ویال ۱۱ میلی‌لیتری حاوی آنتی‌بادی متصل به آنزیم HRP و آنتی‌بادی متصل به بیوتین.
  - ۴) محلول شستشو (Wash Solution-50X): یک ویال ۲۰ میلی‌لیتری.
  - ۵) محلول رنگزا A (Substrate Solution A): یک ویال ۶/۵ میلی‌لیتری.
  - ۶) محلول رنگزا B (Substrate Solution B): یک ویال ۶/۵ میلی‌لیتری.
  - ۷) محلول متوقف‌کننده واکنش (Stop Solution): یک ویال ۱۲ میلی‌لیتری.
  - ۸) برچسب مخصوص پلیت: یک ورق.
  - ۹) محلول کنترل (PSA Control): ویال(های) ۰/۵ میلی‌لیتری.
- توجه ۱: کلیه محلول‌ها در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شوند. محلول متوقف‌کننده در دمای اتاق نیز قابل نگهداری است.
- توجه ۲: مقادیر کنترل(ها) در برگه COA درج شده است.

## مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نمی‌باشند:

- 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 کیت‌ها و یا شماره‌های ساخت دیگر جداً خودداری نمایید.
- ۲) تمام محلول‌ها تا زمان انقضاء کیت پایدار هستند. از محلول‌هایی که تاریخ انقضاء آن‌ها گذشته است استفاده نشود.
- ۳) توجه فرمایید که محلول‌ها در معرض نور مستقیم قرار نگیرند.
- ۴) محتویات این کیت با منشاء انسانی از نظر منفی بودن HIV1/2، HBsAg و HCV بررسی شده‌اند؛ ولی تشخیص قطعی در مورد منفی بودن تمام عوامل عفونی بیماری‌زا با استفاده از روش‌های متداول آزمایشگاهی امکان پذیر نیست. بنابراین با توجه به احتمال

آلودگی و بیماری‌زایی محتویات کیت، تمام مراحل آزمایش باید مطابق با دستورالعمل‌های 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 جلوگیری نمایید.

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

## جمع‌آوری، آماده‌سازی و نگهداری نمونه:

- ۱) نمونه مناسب برای این آزمایش سرم است. ناشتا بودن فرد به هنگام نمونه‌گیری در درستی نتایج به‌دست آمده تأثیرگذار خواهد بود. نمونه خون با استفاده از تکنیک استاندارد خون‌گیری سیاهرگی تهیه شود و سرم بعد از لخته شدن کامل خون (۳۰ تا ۶۰ دقیقه) از سلول‌های خونی جدا گردد. حتی الامکان از نمونه‌های ایکتریک، لیپمیک و همولیز استفاده نشود.
- ۲) در افرادی که دوز بالای از بیوتین ( $>5 \text{ mg/day}$ ) را دریافت می‌کنند، نمونه‌گیری باید حداقل ۸ ساعت پس از دریافت آخرین دوز بیوتین انجام شود.
- ۳) درب ظرف نمونه‌ها باید کاملاً بسته باشد. نمونه‌ها تا ۵ روز در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد و حداکثر تا ۱ ماه در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قابل نگهداری و استفاده هستند. از منجمد و ذوب کردن مکرر نمونه‌ها خودداری کنید.

## آماده‌سازی و نگهداری معرف‌ها:

- ۱) آماده‌سازی و نگهداری محلول شستشو: حجم ۲۰ میلی‌لیتر از محلول شستشو (50X) را به ۹۸۰ میلی‌لیتر آب مقطر دیونیزه اضافه و پس از آماده‌سازی در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری کنید. در صورت مشاهده رسوب در محلول شستشو، آن را در بن‌ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار دهید تا رسوب حل شود. در صورت مشاهده کدورت در محلول شستشو، از مصرف آن خودداری کنید.
- ۲) آماده‌سازی محلول رنگزا: محلول‌های رنگزا A و B را با حجم‌های مساوی (۱:۱) مخلوط کنید (به‌عنوان مثال، برای تهیه ۲ میلی‌لیتر محلول آماده مصرف، ۱ میلی‌لیتر از محلول رنگزا A را به ۱ میلی‌لیتر از محلول رنگزا B اضافه کنید) و به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه کنید. 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 نمونه‌ها به دمای اتاق (۲۲ تا ۲۸ درجه سانتی‌گراد) رسیده‌اند. کالیبراتورها، نمونه‌ها و کنترل‌ها را با ۵ بار سر و ته کردن به‌آرامی یکنواخت کنید.

۱) تعداد چاهک‌های مورد نیاز برای انجام آزمایش را بردارید و بقیه چاهک‌ها را همراه رطوبت‌گیر در کیسه آلومینیومی قرار دهید، درب آن‌را بسته و در دمای ۸-۲ درجه سانتی‌گراد نگهداری نمایید.

۲) حجم ۲۵ میکرولیتر از کالیبراتورها، نمونه‌ها و کنترل در چاهک‌های مورد نظر بریزید. بهتر است که از هر نمونه یا کالیبراتور به‌صورت دوتایی (دوپلیکیت) در چاهک‌ها ریخته شود.

۳) حجم ۱۰۰ میکرولیتر محلول کونژوگه آنزیمی به هر چاهک اضافه کنید و پلیت را به‌مدت ۳۰ ثانیه روی سطح میز به‌آرامی تکان دهید.

۴) چاهک‌ها را با برچسب مخصوص پلیت بپوشانید و به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.

۵) محتویات چاهک‌ها را با وارونه کردن یا اسپیراسیون تخلیه کنید. سپس چاهک‌ها را ۳ مرتبه و هر مرتبه با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشو آماده مصرف، (بخش آماده‌سازی معرف‌ها را مطالعه فرمایید) بشویید. اگر شستشو به‌صورت دستی انجام می‌شود در انتهای شستشو پلیت را به‌آرامی بر روی دستمال رطوبت‌گیر بزنید. به‌منظور انجام شستشوی مناسب و استاندارد چاهک‌ها، مطابق با فیلم قرار داده شده در وب‌سایت شرکت اقدام نمایید.

۶) حجم ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رنگزای آماده مصرف (بخش آماده‌سازی معرف‌ها را مطالعه فرمایید) درون تمام چاهک‌ها بریزید و پلیت را به‌مدت 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 به‌مدت ۱۰ دقیقه افزایش دهید.

۷) حجم ۵۰ میکرولیتر از محلول متوقف‌کننده به تمام چاهک‌ها اضافه کنید و پلیت را به‌مدت ۲۰ ثانیه به‌آرامی تکان دهید تا تمام رنگ آبی آن به‌زرد 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 فرانس ۶۲۰ تا ۶۳۰ نانومتر استفاده کنید).

1. <http://www.samantajhiz.com/Support.aspx>

## علائم استفاده شده در پرچسب کالاها

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

## ۶) 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  $10 \pm 10\%$  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

## 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.

**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.

## ۲) بررسی دقت-آزمون دقت بین دور (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)	3.13	6.55	15.72
SD (ng/mL)	0.16	0.31	0.72
CV (%)	5.1	4.7	4.6

## 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،  $Bias < 18.7\%$  نسبت به نتیجه مورد انتظار است.

No.	Sample (ng/mL)	Added (ng/mL)	Exp. (ng/mL)	Obs. (ng/mL)	%Rec.
1	1.82	9.63	5.72	5.58	97.5
2	3.51	14.22	8.86	8.61	97.2
3	12.34	21.4	16.87	17.12	101.5

## 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	1.18	1.8	-0.6	-1.7	-2.0
2	5.9	-1.8	2.2	-2.2	-2.7
3	13.4	-2.4	-2.6	-3.9	-2.8

## ۵) 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  $0.05 \text{ ng/mL}$  تعیین گردید.

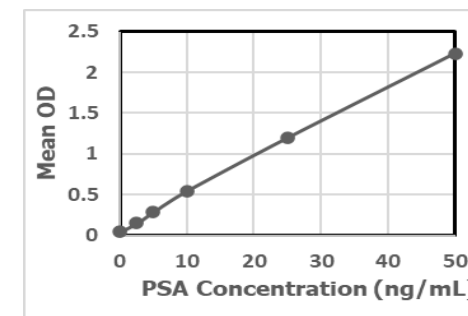
$$LOD = LOB + 1.645 SD_s$$

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

(s: Diluted sample & b: Blank)

میزان جذب و نمودار کالیبراتورهای این کیت به‌عنوان نمونه در زیر آورده شده است.

Calibrator	Well Number	OD	Mean OD	Conc. (ng/mL)
Cal. A	A1	0.039	0.045	0
	B1	0.051		
Cal. B	C1	0.134	0.148	2.5
	D1	0.162		
Cal. C	E1	0.274	0.289	5
	F1	0.304		
Cal. D	G1	0.523	0.546	10
	H1	0.569		
Cal. E	A2	1.175	1.198	25
	B2	1.222		
Cal. F	C2	2.213	2.232	50
	D2	2.251		



## مقادیر مورد انتظار برای تست ایزای PSA

شرکت تولیدکننده کیت، مقادیر مورد انتظار برای این آزمایش را به‌قرار 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)	1.63	8.20	14.61
SD (ng/mL)	0.08	0.35	0.52
CV (%)	4.9	4.3	3.6