دیاپلاس

DIAPLUS

DiaPlus

کیت ۹۶ تستی اندازه‌گیری free PSA به روش الایزا

Brochure Rev: C0 (1402/04/11)

REF 3944-96

اهمیت بالینی

آنتی‌ژن اختصاصی پروستات (PSA)، یک سرین پروتئاز با فعالیتی مشابه کیموتریپسین می‌باشد. افزایش مقادیر PSA سرم در انواع تومورهای خوش‌خیم، بدخیم و متاستاتیک پروستات مشاهده می‌شود. سطح PSA سرم با افزایش حجم تومور افزایش می‌یابد. PSA در جریان خون به دو شکل آزاد (fPSA) و فرم متصل به پروتئین‌های مهارکننده پروتئاز شامل a1-آنتی کیموتریپسین و a2- ماکروگلوبولین وجود دارد که در مجموع PSA توتال (tPSA) نامیده می‌شوند. در هایپرپلازی خوش‌خیم پروستات (BPH)، سطح fPSA در خون افزایش می‌یابد، در حالی‌که سرطان پروستات با افزایش فرم متصل همراه است. بنابراین، درصد PSA آزاد (%fPSA) با سرطان پروستات ارتباط معکوس دارد. حیطه کاربرد این کیت اندازه‌گیری سطح Free-PSA در سرم انسان به روش الایزا می‌باشد.

اصول آزمایش

این آزمایش براساس الایزای ساندویچ ترتیبی طراحی شده است. با اضافه شدن آنتی‌بادی بیوتینیله و سرم حاوی آنتی‌ژن به چاهک، بی‌حرکت‌سازی کمپلکس‌های ایمنی توسط واکنش بین استرپتاویدین تثبیت شده در کف چاهک‌ها و آنتی‌بادی بیوتینیله ضد fPSA صورت می‌گیرد. پس از شستشوی چاهک‌ها، آنتی‌بادی متصل به آنزیم HRP اضافه شده و کمپلکس‌های ایمنی تشکیل می‌شوند. پس از به تعادل رسیدن واکنش و شستشوی مجدد چاهک‌ها، با افزودن محلول رنگزا (سوبسترای آنزیم HRP) و سپس محلول متوقف‌کننده ، محصول نهایی تولید می‌شود که بیشترین جذب نوری را در طول‌موج 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 می‌گردد.

محتویات کیت

۱) کالیبراتورها (Calibrators) ۰/۷۵ میلی‌لیتر:

شامل شش ویال در غلظت‌های ۰، ۰/۵، ۱، ۲/۵، ۵ و ۱۰ ng/mL تهیه شده از سرم انسان.

۲) محلول کونژوگه آنزیمی (FPSA Enzyme Conjugate) ۱۱ میلی‌لیتر:

یک ویال شامل محلول آنتی بادی نشان‌دار شده با آنزیم.

۳) محلول کونژوگه بیوتینی (FPSA Biotin Conjugate) ۱۱ میلی‌لیتر:

یک ویال شامل محلول آنتی‌بادی منوکلونال و بیوتینیله شده.

۳) پلیت استرپتاویدین ۹۶ تستی:

یک پلیت حاوی استرپتاویدین تثبیت شده که به همراه رطوبت‌گیر در کیسه آلومینیومی بسته‌بندی شده است.

۴) محلول شستشو غلیظ (Wash Buffer-50X) ۲۰ میلی‌لیتر:

یک ویال شامل سورفاکتانت محلول شده در بافر فسفات.

۵) محلول سوبسترای A (Substrate A) ۶/۵ میلی‌لیتر:

یک ویال محلول تترا متیل بنزیدین (TMB).

۶) محلول سوبسترای B (Substrate B) ۶/۵ میلی‌لیتر:

یک ویال محلول هیدروژن پراکساید (H_2O_2).

۷) محلول متوقف‌کننده (Stop Solution) ۱۲ میلی‌لیتر:

یک ویال حاوی محلول متوقف‌کننده واکنش.

۸) سرم کنترل (fPSA Control):

ویال(های) حاوی ۰/۵ میلی‌لیتر سرم کنترل.

۹) برچسب مخصوص پلیت:

یک ورق.

توجه ۱: کلیه اجزای کیت در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شود. محلول متوقف‌کننده را می‌توان در دمای اتاق نگهداری کرد.

توجه ۲: مقادیر کنترل(ها) در برگه COA درج شده است.

مواد و وسایل مورد نیاز تأمین نشده در کیت

۱) دستگاه خوانش‌گر پلیت دارای فیلتر ۴۵۰ و ۶۳۰ نانومتر (فیلتر مرجع).

۲) سمپلر کالیبره.

۳) آب مقطر دیونیزه.

ISO13485:2016 KGS

موارد احتیاط در استفاده از کیت

- این کیت برای انجام تست‌های تشخیصی در محیط‌های آزمایشگاهی کاربرد دارد. محتویات کیت منشأ سرم انسانی داشته و از نظر عدم وجود HBsAg و آنتی‌بادی‌های ضد HIV1/2 و HCV کنترل شده‌اند، اما از آنجا که هیچ روشی به طور صددرصد نمی‌تواند منفی بودن این موارد را تأیید نماید، بنابراین لازم است هنگام استفاده از کیت، مراقبت‌های لازم به عمل آورده شود.
- محتویات تعبیه شده در این کیت برای استفاده در همین سری ساخت بوده و از استفاده مشترک با سایر سری ساخت‌ها خودداری فرمایید.
- برای دریافت نتایج بهتر و دقیق‌تر فاصله زمانی بین مراحل سمپلینگ چاهک‌ها رعایت شود. این فاصله زمانی نباید به گونه‌ای باشد که منجر به اثر دریفت (drift) گردد. لازم به ذکر است که در تمامی مراحل این نکته حائز اهمیت است. دقت نمایید محلول‌ها نزدیک به ته چاهک ریخته شوند.
- شستشوی نامناسب می‌تواند باعث بوجود آمدن نتایج اشتباه در آزمایش شود.
- کلیه محلول‌ها تا زمان انقضاء کیت پایدار هستند. از استفاده از محلول‌هایی که تاریخ انقضاء آن‌ها گذشته است خودداری نمایید.

جمع آوری و تهیه نمونه ها

- نمونه مورد استفاده در این آزمایش سرم می‌باشد که از خون سیاهرگی تهیه شده و سرم بعد از لخته شدن کامل خون (۳۰ تا ۶۰ دقیقه) از سلول‌های خونی جدا می‌گردد. ناشتا بودن فرد (ترجیحاً به مدت ۴ ساعت قبل از نمونه‌گیری) به هنگام نمونه‌گیری در درستی نتایج به دست آمده تأثیرگذار خواهد بود. حتی الامکان از نمونه‌های ایکتریک، لیپمیک و همولیز استفاده نکنید.
- نگهداری سرم باید در لوله‌های در بسته انجام شود. نمونه‌ها تا ۸ ساعت در دمای اتاق و تا ۲ 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.
- در افرادی که دوز بالایی از بیوتین (>5 mg/day) را دریافت می‌کنند، نمونه‌گیری باید حداقل ۸ ساعت پس از دریافت آخرین دوز بیوتین انجام شود.

آماده‌سازی محلول‌ها

محلول شستشو: حجم ۲۰ میلی‌لیتر از محلول شستشو (50X) را با ۹۸۰ میلی‌لیتر آب مقطر دیونیزه به حجم ۱۰۰۰ میلی‌لیتر برسانید. محلول آماده شده را 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.

محلول سوبسترا: محلول‌های سوبسترای A و B را با حجم‌های مساوی (۱:۱) مخلوط کنید (به‌عنوان مثال، برای تهیه ۲ میلی‌لیتر محلول آماده مصرف، ۱ میلی‌لیتر از محلول سوبسترا A را به ۱ میلی‌لیتر از محلول سوبسترا B اضافه کنید) و به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه کنید. در صورت مشاهده رنگ آبی و یا کدورت در محلول سوبسترا، از مصرف آن خودداری فرمایید.

مراحل انجام تست

قبل از شروع آزمایش مطمئن شوید که تمام اجزاء کیت،کنترل و نمونه‌ها به دمای اتاق (۲۲ تا ۲۸ درجه سانتی‌گراد) رسیده‌اند. کلیه ویال‌های کالیبراتور، نمونه‌ها و کنترل را با ۵ بار سر و ته کردن به آرامی یکنواخت نمایید.

۱) تعداد چاهک‌های مورد نیاز برای انجام آزمایش را جدا نموده و چاهک‌های باقی‌مانده را به همراه رطوبت‌گیر در کیسه آلومینیومی قرار داده، درب آن را ببندید و در دمای ۸-۲ درجه سانتی‌گراد نگهداری نمایید.

۲) حجم ۵۰ میکرولیتر از کالیبراتورها، نمونه‌ها و یا کنترل را در چاهک‌های مورد نظر بریزید. بهتر است که از هر نمونه یا کالیبراتور به‌صورت دوتایی (دوپلیکیت) در چاهک‌ها ریخته شود.

توجه: چاهک اول به‌عنوان بلانک در نظر گرفته شود. در این چاهک، نمونه و یا استاندارد ریخته نشود. بقیه مراحل با سایر چاهک‌ها یکسان می‌باشد.

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 بپوشانید و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.

۵) محتویات چاهک‌ها را در روش دستی با وارونه کردن پلیت و در روش دستگاهی با آسپیره کردن کاملاً تخلیه نمایید.

۶) چاهک‌ها را ۳ مرتبه و هر مرتبه با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشوی آماده شده (بخش آماده‌سازی محلول‌ها را مطالعه بفرمایید) بشویید. اگر شستشو به‌صورت دستی انجام می‌شود در انتهای شستشو به‌آرامی پلیت را بر روی دستمال رطوبت‌گیر بزنید.

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

۸) پلیت را به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید سپس محتویات چاهک‌ها را در روش دستی با وارونه کردن پلیت و در روش دستگاهی با آسپیره کردن کاملاً تخلیه نمایید.

۹) چاهک‌ها را مطابق با بند ۶ شستشو دهید.

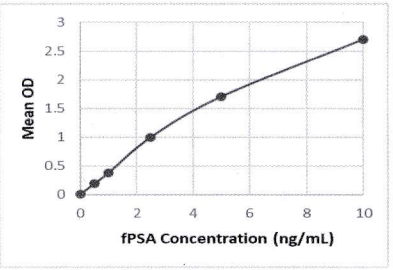
۱۰) حجم ۱۰۰ میکرولیتر از محلول سوبسترای آماده شده (بخش آماده‌سازی محلول‌ها را مطالعه بفرمایید) به چاهک‌ها اضافه نمایید و با برچسب پلیت بپوشانید. سپس پلیت را به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه نمایید. از تکان دادن پلیت در این مرحله خودداری فرمایید.

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

۱۰) حجم ۵۰ میکرولیتر محلول متوقف‌کننده به چاهک‌ها اضافه نموده و به‌مدت ۲۰-۱۵ ثانیه به آرامی تکان دهید.

۱۱) جذب نوری چاهک‌ها را در طول موج ۴۵۰ نانومتر با استفاده از روش Point to Point و 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 به‌عنوان نمونه در زیر آورده شده است.

Calibrators	Well Number	Abs.	Mean Abs	Conc. (ng/mL)
Cal. A	A1	0.008	0.01	0
	B1	0.012		
Cal. B	C1	0.188	0.195	0.5
	D1	0.202		
Cal. C	E1	0.371	0.380	1
	F1	0.389		
Cal. D	G1	0.983	1.0	2.5
	H1	1.017		
Cal. E	A2	1.692	1.705	5
	B2	1.718		
Cal. F	C2	2.698	2.707	10
	D2	2.716		



نکته: جذب نوری به دست آمده از کالیبراتورها و همچنین منحنی مربوطه فقط به‌عنوان مثال ذکر شده و در هر آزمایشگاهی، در هر مرتبه آزمایش باید منحنی جدیدی ترسیم گردد.

مقادیر مورد انتظار

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

Expected value	
مردان سالم	≤ 1.0 ng/mL

پارامترهای کنترل کیفی

Intra – Assay

دقت درون‌تستی با ارزیابی تکرارپذیری نتایج حاصل از سه نمونه سرمی با غلظت‌های متفاوت در یک نوبت کاری (۲۰بار تکرار) بررسی گردید. معیار پذیرش در این آزمایش CV<10% است.

Serum Sample	1	2	3
No. of Repeats	20	20	20
Mean fPSA (ng/mL)	0.52	4.1	9.11
SD (ng/mL)	0.03	0.20	0.41
CV (%)	5.7	4.9	4.5

Inter – Assay

دقت بین‌تستی با ارزیابی نتایج حاصل از سه نمونه سرمی با غلظت‌های متفاوت در چهار نوبت کاری (هر نوبت پنج بار تکرار) بررسی گردید. معیار پذیرش در این آزمایش CV<10% است.

Serum Sample	1	2	3
No. of Repeats	20	20	20
Mean fPSA (ng/mL)	0.48	5.09	7.8
SD (ng/mL)	0.03	0.27	0.38
CV (%)	6.2	5.3	4.9

Recovery

در این تست به ازاء هر آزمون، دو نمونه سرم به‌نسبت مساوی با یکدیگر ترکیب شده و به‌عنوان یک نمونه، مقدار fPSA در آن اندازه‌گیری شد. معیار پذیرش در این آزمایش Bias<10% است.

No.	Sample (ng/mL)	Added (ng/mL)	Exp. (ng/mL)	Obs. (ng/mL)	% Rec
1	1.11	8.23	4.67	4.53	97
2	3.69	1.23	2.46	2.49	101.2
3	8.01	3.15	5.58	5.72	102.5

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
		% Bias			
1	1.06	-1.3	-2.8	1.8	2.1
2	3.11	2.9	-3.3	-1.2	3.3
3	8.18	1.8	-3.1	1.9	1.1

Cross Reactivity

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

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

Sensitivity

بر اساس جمع میانگین جذب کالیبراتور صفر و سه برابر انحراف معیار، حداقل غلظت قابل تشخیص در این کیت ng/mL ۰/۰۸ می‌باشد.

منابع

1. Wild D, The Immunoassay Handbook, Stockton Press, 452, (1994).
5. Junker R, Brandt B, Zechel C, Assmann G, Clin Chem, 43, 1588-94 (1997).
2. Prestigiacomo AF, Stamey TA, "Physiological variations of serum prostate antigen in the (4-10 ng/ml) range in male volunteers' J Urol, 155, 1977-80 (1996).
3. Stamey TA, McNeal JE, Yemoto CM, Sigal BM, Johnstone IM, "Biological determinants of cancer progression in men with prostate cancer", JAMA 281, 1395-1400 (1999).
4. Stenman UH, Leinonen J, Alfthan H, Rannikko S, Tuhkanen K and Alfthan O,"A complex between prostate specific antigen and α1-anticymotrypsin is the major form of prostate specific antigen in serum of patients with prostate cancer:assay of complex improves clinical sensitivity for cancer", Cancer Res,51, 222-26 (1991).
5. Pagana KD. Mosby's manual of diagnostic and laboratory tests. Elsevier Health Sciences; 2013.

در صورت بروز هرگونه مشکل با بخش پشتیبانی شرکت تینا پژوهان آروین تماس حاصل فرمایید.

IVD

DIAPLUS
شرکت تینا پژوهان اروین
سهروردی شمالی ، پایین تر از آپادانا،
کوچه فیروزه، پلاک ۳ واحد ۱ و ۲
تلفن: ۰۲۱-۴۱۷۹۶۰۰۰