

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. بدلیل شیوع بالای سرطان پروستات در آقایان، سنجش سطح PSA، نقش مهمی در تشخیص سریع این بیماری دارد. همچنین اندازه‌گیری 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. حیطه کاربرد این کیت اندازه‌گیری کمی غلظت PSA در نمونه سرم انسان به روش الایزا است.

اصول آزمایش

این تست براساس الایزای ساندویچ طراحی شده است. با مخلوط شدن آنتی‌بادی بیوتینیل، آنتی‌بادی متصل به آنزیم HRP و سرم حاوی آنتی‌ژن، کمپلکسی ایجاد می‌شود که اتصال آن به کف چاهک بدلیل میل اتصال بالای بیوتین به استرپتاویدین تثبیت شده در کف چاهک انجام می‌گیرد. پس از انجام شستشو و افزودن محلول سوبسترای آنزیم HRP به چاهک‌ها، رنگ آبی ایجاد می‌شود که با افزودن محلول متوقف‌کننده تبدیل به رنگ زرد می‌گردد. محصول نهایی تولید شده در طول موج ۴۵۰ نانومتر بیشترین جذب نوری را دارد. مقدار کمپلکس تشکیل شده و شدت رنگ بوجود آمده با غلظت PSA موجود در نمونه سرم ارتباط مستقیم دارد. در نهایت غلظت PSA سرم به‌کمک منحنی استاندارد محاسبه می‌گردد.

محتویات کیت

۱) کالیبراتورها (Calibrators):

شامل ۶ ویال کالیبراتور با غلظت‌های ۰، ۲/۵، ۵، ۱۰، ۲۵ و ۵۰ ng/mL.

۲) محلول کونژوگه آنزیمی (PSA Enzyme Conjugate)

۱۱ میلی‌لیتر:

یک ویال ۱۱ میلی لیتری شامل محلول آنتی‌بادی نشان دار شده با آنزیم و آنتی‌بادی بیوتینیل شده.

۳) پلیت 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 ۲۰ میلی لیتری شامل سورفکتانت محلول شده در بافر فسفات.

۵) محلول سوبسترای A (Substrate A) ۶/۵

میلی‌لیتر:

یک ویال ۶/۵ میلی لیتری محلول تترا متیل بنزیدین (TMB).

۶) محلول سوبسترای B (Substrate B) ۶/۵

میلی‌لیتر:

یک ویال ۶/۵ میلی لیتری محلول هیدروژن پراکساید (H₂O₂).

۷) محلول متوقف‌کننده (Stop Solution) ۱۲

میلی‌لیتر:

یک ویال ۱۲ میلی لیتری حاوی محلول متوقف‌کننده واکنش.

۸) سرم کنترل (PSA 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 خوانش گر پلیت دارای فیلتر ۴۵۰ و ۶۳۰ نانومتر (فیلتر مرجع).

۲) سمپلر کالیبره.

۳) آب مقطر دیونیزه.

موارد احتیاط در استفاده از کیت

این کیت برای انجام تست‌های تشخیصی در محیط‌های آزمایشگاهی کاربرد دارد. محتویات کیت منشاء سرم انسانی داشته و از نظر عدم وجود HBSAg و آنتی‌بادی‌های ضد HIV1/2 و HCV کنترل شده‌اند، اما از آنجا که هیچ روشی به‌طور 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 سری‌ساخت‌ها خودداری فرمایید.
- برای دریافت نتایج بهتر و دقیق‌تر فاصله زمانی بین مراحل سمپلینگ چاهک‌ها رعایت شود. این فاصله زمانی نباید به گونه ای 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 انقضای کیت پایدار هستند. از استفاده از محلول‌هایی که تاریخ انقضای آن‌ها گذشته است خودداری نمایید.

جمع آوری و تهیه نمونه‌ها

- 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 به هنگام نمونه‌گیری در درستی نتایج به‌دست 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 ۵ روز در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد قابل نگهداری می‌باشد و در صورت استفاده برای مدت زمان طولانی‌تر (حداکثر تا ۳۰ روز) در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شوند. 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.

آماده سازی 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: 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.

مراحل انجام تست

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

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

۲) حجم ۲۵ 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. 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 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 فرمایید) بشویید. اگر شستشو به‌صورت دستی انجام می‌شود در انتهای شستشو به‌آرامی پلیت را بر روی دس‌تال رطوبت‌گیر بزنید.

منابع

1. Wild D, The Immunoassay Handbook, Stockton Press, 452, (1994).
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. 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.

توجه: چنانچه از دستگاه‌های الایزا پروسسور استفاده می‌کنید، می‌توانید تنظیمات دستگاه خود را از شرکت دریافت نمایید.



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

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)	1/2	1/4	1/8	1/16
1	2.12	-1.3	-2.8	1.8	2.1
2	5.61	2.3	-3.3	-1.2	3.3
3	11.94	2.8	-3.6	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 PSA مورد نیاز برای همان مقدار جذب ارزیابی 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 کالیبراتور صفر و سه برابر انحراف معیار، حداقل غلظت قابل تشخیص در این کیت 0.5 ng/mL می‌باشد.

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 به‌صورت هر سه ماه یک بار می‌باشد.

مطالعات مختلف بررسی پایداری نشان می‌دهد که کیت مورد نظر در زمان‌های مشخص‌شده پایدار است. معیار پذیرش در آزمایش‌های مربوط به تعیین پایداری، تغییر نتایج کمتر از ۲۰ درصد است.

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 تعیین گردد.

Expected value
مردان سالم $< 4 \text{ ng/mL}$

پارامترهای کنترل کیفی

Intra – Assay

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

Serum Sample	1	2	3
No. of Repeats	20	20	20
Mean PSA (ng/mL)	2.11	5.3	14.82
SD (ng/mL)	0.11	0.26	0.64
CV (%)	5.2	4.9	4.3

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 PSA (ng/mL)	2.99	6.21	17.11
SD (ng/mL)	0.17	0.33	0.78
CV (%)	5.6	5.3	4.5

Recovery

در این تست دو نمونه سرم به‌نسبت مساوی با یکدیگر ترکیب شده و به‌عنوان یک نمونه، مقدار PSA در آن اندازه‌گیری شد. معیار پذیرش در این آزمایش $Bias < 18.7\%$ است.

No.	Sample (ng/mL)	Added (ng/mL)	Exp. (ng/mL)	Obs. (ng/mL)	% Rec
1	1.68	12.23	6.95	7.13	102.5
2	5.88	2.23	4.05	3.99	98.5
3	11.01	6.15	8.58	8.72	101.6

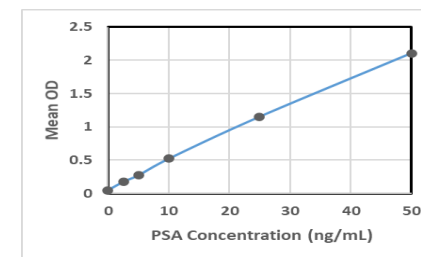
(۷) حجم ۱۰۰ میکرولیتر از محلول سوبسترای آماده شده (بخش آماده‌سازی محلول‌ها را مطالعه فرمایید) به چاهک‌ها اضافه نمایید و با برچسب پلیت بپوشانید. سپس پلیت را به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه نمایید. از تکان دادن پلیت در این مرحله خودداری فرمایید.

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

(۸) حجم ۵۰ میکرولیتر محلول متوقف‌کننده به چاهک‌ها اضافه نموده و به مدت ۲۰-۱۵ ثانیه به‌آرامی تکان دهید.

(۹) 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	0.049	0.05	0
	B1	0.051		
Cal. B	C1	0.166	0.172	2.5
	D1	0.179		
Cal. C	E1	0.266	0.273	5
	F1	0.281		
Cal. D	G1	0.511	0.522	10
	H1	0.533		
Cal. E	A2	1.141	1.153	25
	B2	1.165		
Cal. F	C2	2.099	2.105	50
	D2	2.112		



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