www.padyabteb.com

PSA

Tumor Markers ELISA Kits

REF: PT-EPS-301
IVD

مقدمه

آنتـــی ژن اختصاصی پروســـتات (PSA) یک زنجیر گلیکوپروتئینی با وزن تقریبی 34 kDa اســـت که فعالیت سرین پروتئازی دارد. PSA از لحاظ ایمونولوژیک اختصاصی بافت پروستات است و از سلول‌های طبیعی، خوش خیم و ســـرطانی اپی تلیوم پروستات ترشح می‌شود. PSA از نظر عملکرد و خواص ایمونو شـــیمیایی از اســـید فســـفاتاز پروستاتی مجزا است.

غلظت PSA در سرم بیماران مبتلا به سرطان پروستات، هیپرتروفی پروســـتاتی خوش خیم و شـــرایط التهابی مرتبط با جراحی و متاستاز بیماری افزایش می‌یابد. در حال حاضر، PSA به عنوان مارکر سرمی ارزشـــمند که از صحت بالایی برخوردار است، در تشخیص سرطان پروســـتات و پایش درمان تومور از طریق جراحی یا ســـایر درمان‌ها شناخته شده است.

اساس روش اندازه‌گیری

این تســت به کمک آنتــی بــادی مونوکلونال اختصاصــی به روش ساندویچی طراحی شده است.

بدیــن گونه که یک آنتی بادی مونوکلونــال Anti-PSA برای تثبیت بر روی فاز جامد و یک آنتی بادی Anti-PSA برای کوتژوگاســیون با آنزیم مورد استفاده قرار گرفته است.

با افزودن نمونه ســرم مولکول PSA با آنتی بادی های فوق واکنش داده و بین آنتی بادی متصل بر روی فاز جامد و آنتی بادی کونژوگه با آنزیم ساندویچ می‌گردد.

پــس ازگذشــت زمــان انکوباســیون (۴۵ دقیقه) در دمــای اتاق و شستشــو چاهک‌ها توسط محلول شستشــو دهنده و اضافه کردن محلول سوبســترا و محلول رنگزا و انکوباسیون به مدت ۱۵ دقیقه رنگ آبی ظاهر می‌گردد. با اضافه کردن محلول متوقف کننده رنگ آبی به زرد تبدیل می‌شــود. شدت رنگ در طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه گیری می‌گردد.

شدت رنگ رابطه مستقیم با غلظت PSA در نمونه دارد.

محتویات کیت

ردیف	نام محصول	حجم/ تعداد
1	پلیت پوشانده شده با آنتی بادی مونوکلونال Anti-PSA (Anti PSA Coated plate)	1X96 test
2	محلول آنزیم کونژوگه آماده مصرف (Enzyme conjugate)	1X12 ml
3	استاندارد در غلظت 0.0 ng/ml (Cal PSA 0.0 ng/ml)	1X0.5 ml
	استاندارد در غلظت 1 ng/ml (Cal PSA 1 ng/ml)	1X0.5 ml
	استاندارد در غلظت 5 ng/ml (Cal PSA 5 ng/ml)	1X0.5 ml
	استاندارد در غلظت 10 ng/ml (Cal PSA 10 ng/ml)	1X0.5 ml
	استاندارد در غلظت 20 ng/ml (Cal PSA 20 ng/ml)	1X0.5 ml
	استاندارد در غلظت 40 ng/ml (Cal PSA 40 ng/ml)	1X0.5 ml
4	بافر شستشوی غلیظ 20X (Wash Buffer)	1X30 ml
5	محلول سوبسترا – رنگزا (Chrom Substrte)	1X11 ml
6	محلول متوقف‌کننده (اسیدکلریدریک‌یک‌نرمال) (Stop Solution)	1X6 ml
7	سرم کنترل به همراه نگهدارنده (Control serum)	1X0.5 ml
8	برچسب مخصوص پلیت	۱ عدد

+ محلول شستشو، رنگزا و متوقف کننده در همه کیت‌ها مشترک می‌باشند.

+ محلول شستشوی آماده مصرف، مقدار مورد نیاز را با آب مقطر به نسبت ۱/۲۰ رقیق نمائید.

+ استانداردها در بافر حاوی نگهدارنده هستند که در مقابل استاندارد اولین استاندارد WHO668/96 کالیبر شده‌اند.

مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نمی‌باشند

1- سمپلرهای ۲۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکرولیتری

2- آب مقطر

3- دستگاه الایزا ریدر دارای فیلتر ۴۵۰ نانومتری و در صورت امکان ۶۳۰ نانومتری به عنوان فیلتر رفرانس

4- کاغذ جاذب رطوبت

نگهداری کیت

1- کیت در یخچال در دمای ۸°c-۲ نگهداری شود.

2- میکروپلیت‌ها باید در کیسه در بسته به همراه نمگیر نگهداری شود.

3- مدت زمان پایداری کیت تا پایان تاریخ انقضا (یکسال از زمان تولید) نوشته شده برروی برچسب کیت می‌باشد.

4- کیت باز شده حداقل به مدت ۲ ماه در دمای ۸°c-۲ پایدار خواهد بود.

5- محلول شستشوی رقیق شده به نسبت ۱ به ۲۰ به مدت یک هفته در دمای ۸°c-۲ قابل نگهداری و مصرف می‌باشد.

جمع آوری و آماده سازی نمونه

پس از جداسازی سرم از نمونه خون بیمار، نمونه را می‌توان به مدت ۴۸ ساعت در درمای ۸-۲ °C نگهداری شوند. جهت نگهداری طولانی‌تر، نمونه‌ها باید در دمای ۲۰ °C- نگهداری شوند. نمونه‌های ذوب شده باید قبل از آزمایش مخلوط شوند. بهتر است ترجیحاً از نمونه‌های با کدورت بالا، همولیز و لیپمیک استفاده نشود. در ضمن باید از فریز و ذوب مکرر نمونه‌ها (Freeze-Thaw) اجتناب گردد.

نکات قابل توجه

1- کیت فقط جهت استفاده در آزمایشگاه تشخیصی کاربرد دارد.

2- استفاده از نوک سمپلر یک بار مصرف برای هر نمونه جهت دقت و صحت بیشتر.

3- شستشو چاهک‌ها به صورت کامل جهت نتیجه بهتر.

- بررسی چاهک‌ها از نظر وجود حباب.
- خارج کردن حباب از چاهک‌ها با زدن ضربه آهسته به پلیت.

4- عدم ترکیب اجزاء کیت با سری ساخت متفاوت.

5- جلوگیری از تعویض درب معرف‌ها.

6- جلوگیری از تماس معرف به ویژه معرف حاوی اسیدکلریدریک با پوست (در صورت تماس با آب کافی شستشو داده شود).

7- از استعمال دخانیات، خوردن و آشامیدن اجتناب شود.

8- از پی‌پت کردن مواد با دهان پرهیز شود.

9- از دستکش و کلاه مناسب استفاده شود.

+ جهت ساخت برخی از اجزای این کیت از سرم انسانی که از نظر HCV، HbsAg، HIV منفی می‌باشد، استفاده شده است.

آماده سازی معرف‌ها

1- همه معرف‌ها باید قبل از استفاده به دمای اتاق (۲۵–۱۸ درجه سانتی گراد) برسند.

2- تهیه محلول شستشو: برای تهیه محلول شستشوی آماده مصرف، یک حجم از بافر شستشو غلیظ (20X) را با ۱۹ حجم آب مقطر رقیق نمائید.

نکته‌های مهم

1- توصیه می‌شود که بیشتر از ۳۲ چاهک در هر ران کاری استفاده نشود. اگر پی‌پت به صورت دستی انجام می‌گیرد، پی‌پت کردن همه استانداردها، نمونه‌ها و کنترل‌ها باید در ۵ دقیقه تمام شود. برای پی‌پت کردن کل پلیت ۹۶ تستی باید از دستگاه اتوماتیک استفاده شود.

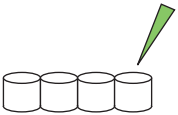
2- فرایند شستشو خیلی مهم است. شستشوی ناکافی باعث کاهش دقت و افزایش کاذب جذب می شود.

در مواردی که مقدار PSA نمونه بیش از ۴۰ ng/ml باشد، نمونه را با استاندارد صفر رقیق نموده و سپس آزمایش را تکرار کنید.

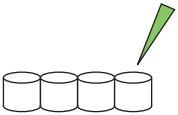
روش انجام آزمایش

1- انتخاب تعداد چاهک‌های کوت شده برای استانداردها، کنترل و نمونه‌های بیمار بصورت دوتایی و قرار دادن مابقی چاهک‌ها در کیسه مخصوص به همراه نمگیر و بستن درب آن.

2- ۲۰µl استانداردها، کنترل و نمونه‌ها به چاهک‌ها اضافه نمایید.



3- ۱۰۰µl آنزیم کونژوگه HRP به تمام چاهک‌ها اضافه نمایید.



4- پلیت را به مدت ۳۰ ثانیه به آرامی تکان دهید و سپس درب چاهک‌ها را با برچسب مخصوص پلیت پوشانده و ۴۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه کنید.

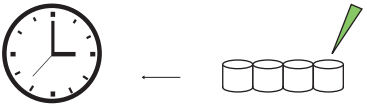
5- محتویات چاهک‌ها را خالی کنید و چاهک‌ها را ۵ بار با ۳۵۰ میکرولیتر بافر شستشوی آماده شستشو دهید. سپس چاهک‌ها را وارونه کنید و همراه با تکان دادن خالی کنید و در انتهای شستشو با ضربات ملایم بر روی کاغذ جاذب تمامی مایع موجود در چاهک‌ها را تخلیه نمایید.

محتویات چاهک‌ها تخلیه شود

۵ بار شستشو با ۳۵۰ میکرولیتر بافر

به وسیله کاغذ جاذب خشک کنید

6- ۱۰۰µl از سوبسترای آماده مصرف به تمام چاهک‌ها اضافه کنید و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه کنید.



۱۰۰ λ محلول سوبسترای (TMB)

۱۵ دقیقه انکوبه در دمای اتاق ۲۵°C

7- ۵۰ µl از محلــول متوقف کننده به همــه چاهک‌ها اضافه کنید. سپس جذب نوری هر چاهک را در طول موج ۴۵۰ نانومتر با دستگاه الایزا ریدر قرائت کنید (در صورت امکان از طول موج ۶۳۰ نانومتر به عنوان فیلتر رفرانس اســتفاده کنید). سنجش جذب نوری باید حداکثر تا ۱۵ دقیقه پس از انجام آزمایش انجام شود.

۵۰ میکرولیتر محلول STOP به تمام چاهک‌ها

ELISA READER

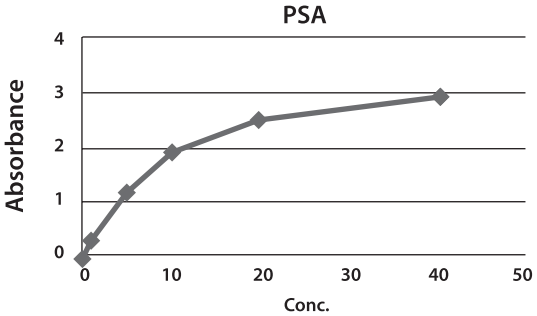
محاسبه‌نتایج

1- با استفاده از میانگین جذب نوری استانداردها (محور Y) و غلظت مشـخص آنها (محور X) برروی کاغذ میلی‌متری، منحنی استانداردی رسم کنید.

2- میانگین جذب نوری برای هر نمونه را بدست آورده و روی محور Y جای آنرا پیدا کنید. سـپس نقطه مذکور را توسط خطی به منحنی وصل کنید. از نقطه بدست آمده خطی عمود بر محور X وارد کنید تا نقطه تلاقی که نشان دهنده غلظت نمونه است، بدست آید.

راهنمای محاسبه

مقادیر جذب نوری ارائه شده در جدول ذیل تنها به عنوان راهنمایی آورده شــده است و هر آزمایشگاهی باید برای هر بار آزمایش یک منحنی استاندارد جدید بدست آورد.



ردیف	مقدار استاندارد (ng/ml)	جذب
۱	۰	۰/۰۲۲
۲	۱/۰	۰/۳۴۲
۳	۵/۰	۱/۱۹
۴	۱۰	۱/۹۴
۵	۲۰	۲/۵۰
۶	۴۰	۲/۹۰

مقادیر طبیعی

بدلیل اختلافات سـنی، نژادی و رژیم تغذیـه، نمی‌توان برای تمام جمعیت‌ها محدوده مرجع تعیین کرد. بنابراین هر آزمایشـگاه باید محدوده مرجع خود را گزارش نماید. مقادیر طبیعی در سـرم افراد نرمال که توسـط آزمایشات مکرر به روش الایزا بدست آمده است به قرار زیر می‌باشد:

محدوده طبیعی : کمتر یا مساوی ۴ ng/ml

خصوصیات کیت

1-حساسیت آنالیتیکال (حد تشخیص) :

برای تعیین حد تشـخیص ۲۰ مرتبه استاندارد صفر آزمایش شد. حـد تشـخیص از ۲ انحراف معیار (SD) بالاتـر از میانگین جذب در غلظت صفر بدسـت آمد. حد تشخیص برای این کیت ۰/۱۵ng/ml بدست آمد.

2-اختصاصیت:

واکنش متقاطع آنتی بادی مونوکلونال مورد استفاده در این آزمایش برای سایر پروتئین‌ها بسیار پایین بدست آمد.

3- دقت:

برای محاسبه میزان دقت در یک روز (درون سنجی) و روزهای مختلف، (میان سنجی) آزمایش بر روی ۳ نمونه سرم چندین بار تکرار شد که ضریب تغییرات به شرح ذیل است.

دقت درون سنجی				
نمونه سرم	دفعات تکرار	میانگین (ng/ml)	انحراف معیار	ضریب تغییرات (%CV)
۱	۱۵	۱/۲۵	۰/۱۱	۸/۴۶
۲	۱۵	۳/۶۵	۰/۲۸	۷/۶۱
۳	۱۵	۹/۳۳	۰/۵۸	۶/۲۲

دقت میان سنجی				
نمونه سرم	دفعات تکرار	میانگین (ng/ml)	انحراف معیار	ضریب تغییرات (%CV)
۱	۱۵	۱/۲۹	۰/۱۴	۱۱/۱۱
۲	۱۵	۳/۶۹	۰/۳۶	۹/۷۷
۳	۱۵	۱۰/۰۱	۰/۷۷	۷/۷۴

4- خطی بودن:

سه نمونه مختلف سرمی با استاندارد صفر به نسبت‌های ۱:۲ ، ۱:۴ و ۱:۸ رقیق شـدند. سـپس غلظت PSA در آنها با استفاده از کیت محاسبه شد که نتایج ذیل بدست آمد.

نمونه سرمی	غلظت اولیه (ng/ml)	درصد بازیابی		
		۱:۲	۱:۴	۱:۸
۱	۴/۲	۹۷	۱۰۰	۱۰۵
۲	۱۰/۵	۹۹	۱۰۶	۱۰۴
۳	۳۴/۸	۱۰۳	۱۰۱	۱۰۴

5- اثر هوک:

در این کیت، اثر هوک تا غلظت ۲۰۰ ng/ml دیده نشد.

+ References

1. Hopton M. R, et al Clinical Chemistry, 32, 691 (1986)
2. Caldwell, G. et al. Lancet, I, 1117, (1985)
3. Young, D. S, et al Clinical Chemistry 21, 3660 (1975)
4. Spencer, CA, et al Clinical Chemistry 41, 367 (1995)
5. Beck-Peccoz P, et al Eur. J. Endocrinol 131: 331-340 (1994)
6. Bravemann, L. E, Clinical Chemistry 42: 174- 181 (1996)

پاره‌ای نکات علمی در خصوص رفع مشـکلات احتمالی در کیت‌های الیزا :

	علت مشکل	راه حل
پایین بودن OD استاندارد ها و نمونه‌ها	افـت و یـا آلودگـی کوتژوگه	تکرار تست با کوتژوگه جدید
	پاییـن بـودن دمـا و یا کوتـاه بـودن زمان انکوباسـیون، بـه دما نرسـیدن محلول‌های کیت و نمونه بیماران	• دمای آزمایشـگاه و تایمر را چـک کرده و تسـت را تکرار کنید. • قبل از شروع آزمایش کیت و نمونه بیماران به دمای اتاق برسد.
	PH نامناسـب و یـا غلظـت بـالای Wash Buffer، شستشـوی نامناسـب و یا خشـک شدن چاهک‌ها	• PH آب مقطـر را چک کنید و تسـت را بـا Wash Buffer جدید تکرار کنید. • پـس از شستشـوی کامل و تخلیـه چاهک‌هـا بلافاصله تست را ادامه دهید.
	نگهـداری نامناسـب کیـت و عـدم رعایت زنجیره سرد	• پس از باز کردن کیت تاریخ را ثبت کنید و به تاریخ انقضا توجه‌کنید. • پس از هر بار مصرف پلیت را با چسـب بپوشانید و کیت را در یخچال نگهداری کنید.

	طول موج خوانش نامناسب (۴۰۵ نانومتر بجای ۴۵۰ نانومتر)	• تست را با دستگاه کالیبر شده بخوانید. • طول موج دستگاه را دوباره چک کنید.
عدم تولید رنگ در چاهک‌ها	استفاده از مواد سایر کیت‌ها	تکرار تست با مواد همان کیت
	انجام نشدن مرحله‌ای از تست	تکرار تست
	آلودگی محلول کونژوگه با سدیم آزاید	تکرار تست با محلول کونژوگه جدید
منحنی نبودن نمودار	آلودگی استانداردها	از سری استاندارد جدید استفاده کنید

صحیح نبودن نمودار	پی‌پتینگ نامناسب	• استفاده از نوک سمپلر یکبار مصرف. • از سمپلرهای تک کاناله یا چند کاناله کالیبر شده استفاده‌کنید. • توجه کنید نوک سمپلر محکم به سمپلر متصل باشد. • توجه کنید در هنگام پی‌پتینگ حباب وارد نوک سمپلر نشود.
	PH نامناسب و یا غلظت بالای Wash Buffer	PH آب مقطر را چک کنید و تست را با Wash Buffer جدید تکرار کنید.
	شستشوی نامناسب و یا خشک شدن چاهک‌ها	پس از شستشوی کامل و تخلیه چاهک‌ها بلافاصله تست را ادامه دهید.

بالا بودن رنگ زمینه، بالا بودن OD	آلودگی استاندارد صفر	تکرار تست با استانداردهای جدید
	آلودگی محلول رنگزا	استفاده از محلول رنگزا جدید
	آلودگی و یا غلظت پایین Wash Buffer، شستشوی نا مناسب	• عدم آلودگی آب مقطر با موادی مانند وایتکس را چک کنید و تست را با Wash Buffer جدید تکرار کنید. • تمام سوزن‌های دستگاه واشر را چک کنید.
	طول موج نامناسب در خوانش	• تست را با دستگاه کالیبر شده بخوانید. • طول موج دستگاه را دوباره چک کنید. • از فیلتر ۶۳۰ نانومتر به عنوان فیلتر رفرانس استفاده کنید.

	آلودگی محلول Stop	تکرار تست با محلول Stop جدید
	ایجاد وقفه در خوانش	بلافاصله بعد از Stop کردن تست، یا حداکثر تا ۱۵ دقیقه پلیت را بخوانید.
عدم تکرار پذیری مناسب	پی‌پتینگ نا مناسب	• استفاده از نوک سمپلر یکبار مصرف • از سمپلرهای تک کاناله یا چند کاناله کالیبر شده استفاده کنید. • توجه کنید نوک سمپلر محکم به سمپلر متصل باشد. • توجه کنید در هنگام پی‌پتینگ حباب وارد نشود. • توجه کنید جداره خارجی نوک سمپلر حاوی محلول نباشد. • کالیبراسیون و تمیز کردن ادواری سمپلرها.

عدم تکرار پذیری مناسب	طولانی شدن زمان انجام تست	فاصله زمانی بین اضافه کردن استانداردها و نمونه نباید بیشتر از ۱۰ دقیقه باشد. در این صورت نتایج قابل اعتماد نیست.
	نگهداری نامناسب کیت و عدم رعایت زنجیره سرد	• پس از باز کردن کیت تاریخ را ثبت کنید و به تاریخ انقضا توجه کنید. • پس از هر بار مصرف پلیت را با چسب بپوشانید و کیت را در یخچال نگهداری کنید.
	باقی ماندن کوتژوگه در لبه چاهک‌ها و عدم شستشوی مناسب و یا خشک شدن چاهک‌ها.	پی‌پتینگ صحیح و شستشوی مناسب، پس از شستشوی کامل و تخلیه چاهک‌ها بلافاصله تست را ادامه دهید.
	وجود حباب در چاهک‌ها	در حین انکوباسیون و بعد از Stop کردن واکنش توجه کنید حباب در چاهک‌ها نباشد.
	کثیف بودن کف چاهک‌ها	کف چاهک‌ها را با دستمال نرم و مرطوب، تمیز کنید.
	مخلوط نشدن محلول‌های کیت	قبل از استفاده از ویال محلول‌ها را به آرامی تکان دهید.

خلاصه روش آزمایش

معرف‌ها	استانداردها	نمونه‌ها
استانداردها	۲۰µl	–
نمونه‌ها	–	۲۰µl
کونژوگه	۱۰۰µl	۱۰۰µl

در دمای اتاق به مدت ۴۵ دقیقه انکوبه نمایید.

۵ بار با ۳۵۰µl محلول بافرشستشو رقیق شستشو دهید و با دقت محتویات را خالی کنید.

محلول رنگزا	۱۰۰ µl	۱۰۰ µl

به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق در تاریکی انکوبه نمایید.

محلول متوقف کننده	۵۰ µl	۵۰ µl

جـذب نوری هر چاهـک در طول موج ۴۵۰ nm و فیلتر رفرانس ۶۳۰ nm قرائت شود.

www.padyabteb.com

PADYABTEB
Producer of Diagnostic Products

دفتر فروش و خدمات پس از فروش:

تهران . خیابان‌شهید بهشتی . خیابان بخارست (احمد قصیر) . کوچه‌ششم . پلاک ۵ . واحد ۵

تلفن فروش: ۸ ـ ۳۷۷۷۵۵۳۱ (۰۲۶) داخلی ۱۶۰ **خدمات پس از فروش:** ۰۹۱۲۹۴۰۹۱۲۴

کارخانه:

شهرک صنعتی اشتهارد . بلوار ابوریحان بیرونی . بلوار غزالی غربی . خیابان لادن ۲

تلفن: ۸ ـ ۳۷۷۷۵۵۳۱ (۰۲۶) **فکس:** ۳۷۷۷۵۵۲۹ (۰۲۶)

TCL
ISO 13485:2012

GMP
ISO 9001:2015
ISO 10002:2014

eztest
ELISA Kits