راهنمای کیت
Free PSA

مقدمه:

ساختمان ومتابولیسم: این آنتی ژن هم در سلولهای اپیتلیال پروستات نرمال و هم در سلولهای سرطانی مستقر است. این آنتی ژن عملا از نظر ایمونولوژیک از اسید فسفاتاز کاملا متمایز است. ثابت شده که موثرترین روش برای پیگیری و تشخیص کارسینوم پروستات می باشد. غلظت این آنتی ژن در افراد مبتلا به سرطان پیشرفته پروستات و بزرگی خوش خیم پروستات (BPH) افزایش پیدا می کند. PSA در سرم به چندین شکل وجود دارد. یک نوع آن از نظر فعالیت ایمنی کارایی نداشته و توسط آلفا-2-ماکروگلوبولین احاطه شده است. نوع دیگر PSA در سرم با یک نوع مهار کننده پروتئاز به نام آلفا-1-آنتی کیموتریپسین (ACT) کمپلکس تشکیل داده است. با وجودی که ACT فقط به جایگاه فعال PSA متصل می شود، PSA با تست های ایمنی قابل تشخیص است. شکل سوم PSA که نمایانگر یک پروآنزیم یا شکل غیر فعال از نظر آنزیمی و کمپلکس با ACT نیست، PSA آزاد یا Free PSA نام دارد. از نظر پزشکی مقدار PSA-ACT و Free PSA زمانی که با مقدار کل PSA یا Total PSA مقایسه شود، نقطه تمایز بین کانسر پروستات و بزرگی خوش خیم پروستات (BPH) است. مطالعات نشان داده است که بین بیمارانی که مقدار Total PSA آنها بین 4 تا 10 نانوگرم بر میلی لیتر است، نسبت PSA آزاد به Total PSA در آقایان دارای سرطان پروستات پایین تر از آنهایی است که به بزرگی خوش خیم پروستات مبتلا هستند.

معرفی آزمایش و کاربرد بالینی:

این آزمایش همراه با PAP (Prostate Acid Phosphate) در مراحل اولیه سرطان پروستات افزایش می یابد اندازه گیری PSA در درمان و پیشگیری سرطان پروستات موثر است. بالاترین ارزش PSA به عنوان یک شاخص برای پیشگیری بیماران با ریسک بالا و یا بیماری پیشرفته است. PSA به تنهائی شاخص محکمی جهت تشخیص سرطان پروستات نیست و باید حتما با معاینه رکتال Digital Rectal exam همراه باشد چون PSA در هیپرتروفی های خوش خیم پروستات هم بالا می رود.

محدوده طبیعی:

با مطالعه بر روي 200 نمونه سرم مردان سالم مقدار طبیعی Free PSA با کیت شرکت زیست کارپیرا به روش الایزا بدست آمده به قرار زیر می باشد ولی پیشنهاد می گردد تا هر آزمایشگاه مقادیر نرمال خود را بدست آورد:

محدوده طبیعی	Up to 1.3 ng/ml

زمانی که غلظت Total PSA بین 4 تا 10 نانوگرم بر میلی لیتر باشد ، نسبت Free PSA به Total PSA ، نقطه تمایز بین کانسر پروستات و بزرگی خوش خیم پروستات است (Gray Zone). بسته به نسبت ، احتمال سرطان پروستات می تواند به صورت زیر باشد . با این وجود لازمه تشخیص سرطان پروستات فقط بیوپسی بوده و آزمایش Total PSA و Free PSAدر جهت کمک به تصمیم گیري پزشک براي انجام بیوپسی داراي اعتبار است . براي محاسبه درصد Free PSA نمونه ، لازم است که غلظت Total PSA و Free PSA همان نمونه را با کیتهاي شرکت زیست کارپیرا تعیین کرد . سپس با تقسیم Free PSA به Total PSA ضربدر عدد 100 ، درصد Free PSA را بدست آورید .

نسبت FreePSA بهTotal PSA	50- 59 سال	60-65 سال	بیش از 70 سال
صفر تا 10 درصد	49.2%	57.5%	64.5%
11 تا 18 درصد	26.9%	33.9%	40.8%
19 تا 25 درصد	18.3%	23.9%	29.7%
بیش از 25 درصد	9.1%	12.2%	15.8%

اساس آزمایش :

اساس این کیت به روش ساندویچ الایزا می باشد. در این روش چاهکها توسط آنتی بادی منوکلونال بر علیه یک واحد آنتی ژنیک Free PSA , Coat میشوند. نمونه بیماران با آنتی بادی Coat شده در چاهکها مجاور می شود، سپس آنتی بادی ثانویه متصل به آنزیم HRP به چاهکها اضافه می شود که باعث ایجاد یک کمپلکس ایمنی می شود که نشانگر غلظت Free PSA در نمونه ها می باشد. در ادامه پس از شستشو ، محلول رنگزا که حاوی H2O2 و کروموژن است به داخل چاهکها ریخته میشود و تولید رنگ آبی می کند که رنگ آبی تولید شده متناسب با کمپلکس ایمنی ایجاد شده در چاهکها می باشد. با افزودن محلول متوقف کننده رنگ آبی به زرد تبدیل میشود که بهترین جذب نوری را در طول موج 450 نانومتر دارد.

جمع آوري و آماده سازي نمونه :

سرم یا پلاسما را مي توان پس از جدا نمودن از خون استفاده نمود . نمونه را مي توان به مدت 24 ساعت در دماي 2 تا 8 درجه سانتي گراد ویا براي مدت زمان طولاني تر در دماي 20- درجه سانتیگراد نگهداري کرد.(درضمن باید از Freeze – Thaw نمودن پرهیز شود) سن بیمار و سابقه معاینه باید قبل از نمونه گیری پرسیده شود.

محتویات کیت :

1- یک عدد پلیت حاوی چاهکهای پوشش داده شده با آنتی بادی ضد Free PSA (Anti –Free PSA coated Plate) دارای 96 چاهک
2- سری استاندارد (Standard Set) : 6 ویال استاندارد دارای غلظت های ng/ml صفر- 0.5 ،1، 2.5،5،10 که هر ویال محتوی 0.5 میلی لیتر می باشد.
3- سرم کنترل (Control Serum) : یک ویال حاوی 0.5 میلی لیتر سرم کنترل با غلظت های مشخص نوشته شده روی برچسب ویال.
4- محلول رقیق کننده نمونه ها (Sample Diluent) : یک ویال حاوی 1 میلی لیتر برای رقیق کردن نمونه هائی که غلظت بالاتری از بالاترین استاندارد کیت را دارا می باشند.
5- محلول آنزیم کنژوگه (Enzyme Conjugate) : یک ویال حاوی 12 میلی لیتر محلول حاوی PSA کنژوکه شده با HRP .
6- محلول شستشو (Washing Solution) : یک ویال حاوی 40 میلی لیتر محلول شستشوی غلیظ (25 X) که برای تهیه محلول شستشوی آماده مصرف مقدار لازم از محلول شستشوی غلیظ را به نسبت 1/25 با آب مقطر رقیق کنید.
7- محلول رنگزا (Chromogen Substrate) : یک ویال محتوی 12 میلی لیتر و آماده برای مصرف.
8- محلول متوقف کننده (Stop Solution) :یک ویال محتوی 12 میلی لیتر.
10- بر چسب مخصوص پلیت (Card Board Sealer)

مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نمی باشد:

1- دستگاه خوانش الایزا (Eliza Reader) دارای فیلتر 450 نانومتر ودر صورت امکان 630 به عنوان فیلتر رفرانس.
2- سمپلر های 25 و 100 میکرولیتر دقیق
3- آب مقطر

نكات قابل ذكر براي مصرف كنندگان :

1- محتويات اين كيت براي مصرف در همين كيت مي باشد .
2- از مخلوط كردن محتويات كيتها باشماره ساختهاي مختلف جدا" خودداري نمائيد .
3- كليه مواد موجود در كيت كه منشاء سرمي دارند از نظر وجود HIV,HCV, HBs AG كنترل گرديده اند و فاقد اين عوامل مي باشند . جهت احتياط بهتراست هر كاربري كه با كيت كار مي كند از تماس مستقيم با مواد بپرهيزد .

توضيحات عمومي:

1- قبل از شروع مراحل آزمايش تمام مواد و نمونه ها را به درجه حرارت اتاق رسانده و به خوبي تكان دهيد تا كاملا" يكنواخت شوند.
2- بهتراست به محض شروع آزمايش كليه مراحل بدون توقف انجام پذيرند .
3- ازنوك سمپلر يك بار مصرف براي هر نمونه استفاده كنيد .
4- پس از افزودن محلول متوقف كننده ، جذب نوري چاهكها حداكثر تا نيم ساعت قابل قرائت مي باشد .
5- براي كسب نتايج مطلوب بايد شستشوي چاهكها بصورت كامل صورت گرفته وآخرين قطرات پس از شستشو از چاهكها تخليه شوند .
6- از مهمترين فاكتورها در حصول نتيجه مطلوب ، زمان انكو باسيون مناسب مي باشد ، بنابراين پيشنهاد مي گردد قبل از شروع آزمايش تمام مواد و محلولهاي مورد نيازرا آماده نموده و درب محلولهاي مورد نياز را باز كنيد ، اين عمل با كاهش فاصله زماني بين مراحل سمپلينگ باعث نتايج دقيقتري ميشود.
7- بهتر است كه حجم انجام تست محدود باشد وزمان ريختن نمونه ها پيش از5دقيقه به طول نيانجامد .

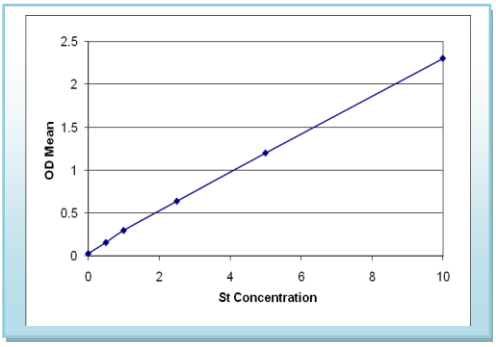
مراحل انجام آزمايش :

1- تعداد چاهكهاي مورد نظر را انتخاب نموده و باقي چاهكها را به همراه نمگير درون كيسه مخصوص نگهداري پليت قرار داده و درب آن را ببنديد .
2- 25 ميكروليتر از هر استاندارد ، سرم كنترل و نمونه را به داخل هر چاهك بريزيد ، پيشنهاد مي گردد كه از استانداردها و نمونه ها به صورت داپليكيت استفاده شود بدين معني كه هر استاندارد و نمونه را در دوچاهك بريزيد و در انتها از ميانگين جذب نوري آنها براي محاسبه نتايج استفاده كنيد .
3- سپس 100 ميكروليتر از محلول Enzyme Conjugate را به هر چاهك اضافه نموده و پليت را به آرامي به مدت 15 ثانيه تكان دهيد تا محتويات آن بخوبي مخلوط شوند .
4- درب چاهكها را با برچسب مخصوص پليت پوشانده و چاهكها را به مدت 30 دقيقه در درجه حرارت اتاق (22-28 درجه ساتيگراد) انكوبه نمائيد .
5- محتويات چاهكها را خالي كرده و چاهكها را 5 بار با محلول شستشوي آماده مصرف بشوئيد (براي شستشو مي توان از سمپلر 8 كانالـه استفاده نمود ولي بايد مواظب بود كه محلول شستشو از يك چاهك به چاهك ديگر وارد نشود زيرا مي تواند موجب ايجاد خطا در نتيجه آزمايش گردد). در هر دفعه شستشو حدود 300 ميكروليتر محلول شستشو در هر چاهك ريخته و سپس چاهك ها را درحالت وارونه و با ضربات ملايم بر روي يك پارچه يا كاغذ نمگير بكوبيد تا قطرات اضافي محلول شستشو خارج شوند.
6- 100 ميكروليتر محلول رنگزا (Chromogen – Substrate) بـه هرچاهك اضـافه نمائيد و چاهكها را بـه مدت 15 دقيقـه در درجـه حـرارت اتـاق و درتاريكي انكوبه نمائيد .
7- با اضافه كردن 100 ميكروليتر محلول متوقف كننده (Stop Solution) به هرچاهك ادامه واكنشهاي آنزيمي را متوقف نمائيد . براي سنجش جذب نوري هرچاهك از دستگاه الايزا ريدر با فيلتر 450 nm استفاده نمائيد .(توصيه مي شود از فيلتر 630 nm به عنوان فيلتر رفرانس استفاده گردد.)

محاسبه نتايج :

1- جذب نوری استاندارد ها و نمونه ها را به کمک دستگاه Eliza Reader در طول موج nm450 و در صورت امکان در مقابل فیلتر رفرانس nm630 بخوانید.
2- با استفاده از میانگین جذب نوری استاندارد ها و غلظت معلوم آنها نموداری Point To Point رسم کنید ،به این صورت که جذب نوری استانداردها را روی محور عمودی (Y) و غلظت آنها را روی محور افقی (X) برده و نقطه تلاقی غلظت و جذب نوری را برای هر استاندارد بدست آورید ،در ادامه نقاط بدست آمده را به یکدیگر وصل نمائید تا منحنی بدست آید.
3- میانگین جذب نوری برای هر نمونه را بدست آورده و روی محور عمودی جای آن را پیدا کنید ، سپس نقطه مذکور را توسط خطی بـه منحنی وصل نمائید بطوریکه این خط کاملا بر محور عمودی عمود باشد و در ادامه از محل تلاقی خط و منحنی ،خطی عمود بر محور افقی وارد کنید ، نقطه تلاقی این خط با محور افقی مقدار غلظت را نشان خواهد داد.

	Conc. ng/ml	OD 450/630
St 1	0	0.03
St 2	0.5	0.16
St 3	1.0	0.32
St 4	2.5	0.64
St 5	5	1.2
St 6	10	2.3



توجه : جذب های نوری و منحنی مربوط فقط به عنوان نمونه می باشند و هر آزمایشگاه در هر دفعه انجام آزمایش باید منحنی جدیدی رسم نماید.

شرايط نگهداري فرآورده تشخيصي:

1- دماي نگهداري كيت بين '2-8 C مي باشد و بهتراست كه در '4C نگهداري شود .
2- با توجه به انجام تست هاي Accelerate و Full Term اين كيت درصورت رعايت موارد نگهداري صحيح تا 12 ماه پايدار مي باشد ودر اين مدت كيت حاضر بالاي 90 درصد كارايي اوليه را داراست. با توجه به آزمايشات انجام شده در صورت باز نمودن كيت يک ماه پايدار می باشد .
3- چاهكها را در كيسه مخصوص پليت همراه با نمگير نگهداري نمائيد .
4- **توجه :** درصورت بازشدن درب كيت و محلول ها تازماني كه آلودگي ميكروبي و قارچي رخ ندهد كيت پايدار خواهند بود.

شاخصهاي اجرائي:

1- حداقل مقدار قابل اندازه گيري :
براساس جذب نوري استاندارد صفر و دو برابر انحراف معيار (SD)حداقل غلظت Free PSA قابل تشخيص در اين كيت 0.05 ng/ml مي باشد .

2- دقت آزمايش :
آزمايشهاي اينترا- اسي (همخواني غلظت مشخص از يك نمونه در يك سري آزمايش) و اينتر- اسي (همخواني غلظت مشخص ازيك نمونه در سري آزمايشهاي مختلف) بااستفاده از استانداردهائی با غلظتهاي مختلف Free PSA انجام گرديد كه در جداول 1و2 آمده است .

جدول شماره 1 (اينترا- اسي)

نمونه	تعداد دفعات تكرار	ميانگين ng/ml	SD ng/ml	CV%
1	12	0.21	0.015	7.4
2	12	1.75	0.07	4.9
3	12	5.4	0.29	3.2

جدول شماره 2 (اينتر- اسي)

نمونه	تعداد دفعات تكرار	ميانگين ng/ml	SD ng/ml	CV%
1	6	0.16	0.015	7.4
2	6	1.4	0.15	6.6
3	6	4.7	0.3	5.8

هرسري آزمايش بصورت Duplicate انجام شده است .

3- ريكاوري آزمايش :
مقادير معلومي از Free PSA به 4 سرم با غلظتهاي مشخص Free PSA افزوده شد و ريكاوري آنها محاسبه گرديد كه نتايج آن در جدول صفحه بعد آمده است .

جدول ريكاوري :

نمونه	مقدار FPSA موجود درسرم (ng/ml)	مقدار افزوده شده FPSA (ng/ml)	مقدار مورد انتظار (ng/ml)	مقدار بدست آمده (ng/ml)	ريكاوري (%)
1	0.14	0.5	0.32	0.29	90
1	0.14	1	0.57	65.	114
1	0.14	2.5	1.32	1.41	106
2	1.8	0.5	1.15	1	86
2	1.8	1	1.4	1.28	91
2	1.8	2.5	2.15	2.3	112
3	3.6	0.5	2.05	1.95	95
3	3.6	1	2.3	2.3	100
3	3.6	2.5	3.05	3.14	102
4	5.2	0.5	2.85	2.77	97
4	5.2	1	3.1	3.1	100
4	5.2	2.5	3.85	3.66	95

4- خطي بودن آزمايش :
به كمك استاندارد صفر رقتهاي متوالي 4 نمونه سرم با غلظت مشخص از Free PSA تهيه گرديد و نتايج بر اساس ضريب رقت محاسبه شد كه درجدول نتايج آن آورده شده است .

جدول خطي بودن :

نمونه	مقدار Free PSA موجود در سرم رقيق نشده (ng/ml)	ريكاوري (%)			
		رقت 25%	رقت 50%	رقت 75%	رقت 100%
1	2.2	97	98	100	105
2	3.9	100	103	90	98
3	6.75	105	94	92	92

5- اثر هوك (Hook Effect)
آزمايش Free PSA جهت سرمهايي با غلظت بسيار بالا از اين آناليت (10µg/ml) صورت گرفت كه پديده هوك مشاهده نشد .

6- اختصاصيت كيت
واكنش متقاطع با غلظت بسيار بالا از آناليتهای HCG (50000 IU/L) و CEA (5 µg/ml) و AFP(10 µg/ml) و با كيت PSA-ACT مشاهده نشد.

References:

Zhov A.M, Tewari P.C, card weu G.W. Multiple forms of PSA in serum; differences in immunorecognition by monoclonal and polyclonal assay.Clin. Chem. 1993;39: 2483
Jonathan McDemed, Using PSA intelligently to manage prostate cancer. PCRI Insights, August 2005 vol. 8, no.3
Belanger A, van Harbeek H, et al. Molecular mass and carbohydrate structure of prostate specific antigen.Studies for establishment of an international PSA. Prostate 1995; 27: 187-197

Adress :
No:1161 , Bid Avenue , Payetakht , Industrial zone , Tehran , Iran
Tel : +98 21 66 56 91 84 - 66 59 37 41 Fax : +98 21 66 56 14 28
Email : info@biokarpira.com
www.biokarpira.com

043 ISO 9001-2008 13485