IVD-REF: PS - PSA		کیت الایزا PSA
Ver. No: 04	پیشگام‌آمان سنجش پیشگام در سنجش و نوآوری	PSA ELISA KIT

معرف	۴۸ تستی	۹۶ تستی	آماده سازی
پلیت پوشیده شده با استرپتاویدین	1×48 wells	1×96 wells	آماده مصرف
کالیبراتور ۱-۶ (۰، ۱، ۵، ۱۰، ۲۰، و ۴۰نانوگرم در میلی لیتر) با قابلیت ردیابی به ماده مرجع WHO 668/96 در بافر سازگار با سرم انسانی، همراه با نگهدارنده	6 ×0.5 mL	6 ×0.5 mL	آماده مصرف
یک نمونه کنترل در بافر سازگار با سرم انسانی همراه با نگهدارنده (بازه قابل قبول سرم کنترل برروی برچسب قید شده است)	1 ×0.5 mL	1 ×0.5 mL	آماده مصرف
کونژوگه(قرمز رنگ)	1 ×6.0 mL	1 ×12.0 mL	آماده مصرف
محلول شستشو غلیظ	1 ×30 mL	1 ×30 mL	به نسبت ۱ به ۲۰ با آب مقطر یا آب دیونیزه رقیق کنید
محلول سوبسترا-رنگ زا(تترامتیل بنزدین و آب اکسیژنه)	1 ×6.0 mL	1 ×12.0 mL	آماده مصرف
محلول توقف (اسید کلریدریک ۱ مولار)	1 ×6.0 mL	1 ×6.0 mL	آماده مصرف

کاربرد:

کیت PSA ELISA Kit شرکت پیشگامان سنجش ایساتیس برای اندازه گیری کمی آزمایشگاهی شاخص تومورال آنتی ژن اختصاصی پروستات تام Total Prostate-specific Antigen (tPSA) در سرم یا پلاسما طراحی گردیده است.

مقدمه :

آنتی ژن اختصاصی پروستات یا PSA نوعی سرین پروتئاز از خانواده کالیکرئین ها است که منحصراً در سلول های اپیتلیال غده پروستات ساخته می شود. ساخت PSA تحت تنظیم پذیرنده های هورمون های جنسی مردانه یا آندروژن هاست.

آنتی ژن اختصاصی پروستات به دو فرم متصل و آزاد در بدن وجود دارد. فرم متصل PSA در حدود ۷۵ درصد PSA تام می باشد. بیشترین درصد اتصال PSA به آلفا ۱-آنتی کموتریپسین (ACT) و به میزان بسیار کمی سایر پروتئازها مانند آلفا-دو- ماکروگلوبولین و مهارکننده آلفا پروتئازی(API) می باشد. فرم آزاد PSA در حدود ۲۵ درصد PSA تام می باشد. در سنجش PSA تام هر دو فرم اندازه گیری می شوند.

سرطان پروستات یکی از شایعترین بدخیمی های مردان به ویژه در سنین بالا می باشد. در تحقیقات مختلف صورت گرفته، میزان شیوع سرطان پروستات در مردان بین ۷۰ تا ۷۹ سال بین ۳۶ تا ۵۱ درصد گزارش گردیده است. به دلیل اینکه در اکثر موارد، بروز سرطان پروستات به شکل خاموش می باشد، سنجش PSA تام ، به دلیل اختصاصیت بافتی بسیار بالا ، در کنار سایر معاینات بالینی نقش بسیار مهمی در تشخیص بیماری دارند. علاوه بر سرطان پروستات، میزان این آنتی ژن بافتی در سایر موارد نظیر هایپرتروفی خوش خیم پروستات(BPH)، و التهاب پروستات نیز افزایش می یابد. علیرغم افزایش در مواردی غیر از سرطان پروستات، سنجش میزان PSA تام در کاهش ۲۰ درصدی مرگ و میر مردان در بسیاری از گذشته پژوهی های بلند مدت به اثبات رسیده است. در مواردی که سلولهای غده پروستات به سمت سرطانی شدن تمایل پیدا می کنند، میزان تولید فرم متصلPSA نسبت به فرم آزاد PSA افزایش پیدا می کند که این تغییر، به عنوان یک فاکتور با ارزش در کنار سایر معیارهای تشخیصی مطرح می گردد.

میزان کاهش tPSA به عنوان معیاری برای پایش موفقیت آمیز بودن درمان در مردانی که تحت عمل جراحی برداشت شعاعی پروستات، شیمی درمانی، ادجوانت درمانی و پرتودرمانی قرار گرفته اند محسوب می شود.

از آنجایی که PSA در مقادیر ناچیز درغدد بافت حاشیه پیشابراه، مقعد و بافت سرطانی پستان وجود دارند، لذا PSA در زنان نیز قابل اندازه گیری است. گاهی اوقات دلایل یادشده باعث می شود حتی متعاقب جراحی و برداشت پروستات، مقداری PSA در خون وجود داشته باشد.

مواردی نظیر احتباس ادراری متعاقب آزمایش مقعدی ، سیستوسکوپی، کولونوسکوپی و بیوپسی درون پیشابراهی، لیزر درمانی که منجر به التهاب یا ترومای پروستات می شود، به درجاتی از افزایش tPSA می انجامد که همواره باید در تفسیر هرنتیجه بیشتر از بازه نرمال مدنظر قرار گیرد.

اساس آزمایش :

مبنای کیت سنجش PSA شرکت تولیدی-تحقیقاتی دانش بنیان پیشگامان سنجش ایساتیس بر پایه اصول الایزا نوع ساندویچی می باشد.. در این کیت از فن آوری استرپتاویدین در پوشاندن فاز جامد استفاده شده است. در روش آزمایش، استاندارد یا کنترل یا نمونه بیمار همراه با کونژوگه که حاوی دو نوع آنتی بادی علیه PSA یکی کونژوگه با بیوتین و دیگری کونژوگه با آنزیم HRP است و PSA را از دو جایگاه متفاوت شناسایی می کنند به چاهک های پوشیده شده از استرپتاویدین اضافه می شوند. PSA موجود در استاندارد یا کنترل یا نمونه بیمار بین دو آنتی بادی به حالت ساندویچ در آمده و مجموعه از طریق بیوتین به استرپتاویدین فازجامد متصل می شود. سپس اجزای اتصال نایافته طی شستشو از محیط خارج و با افزودن محلول سوبسترا - رنگزا و انکوباسیون بمدت ۱۵ دقیقه رنگ آبی بوجود می آید. با افزودن محلول متوقف گر، واکنش آنزیمی متوقف می گردد و در نهایت شدت جذب نوری در ۴۵۰ نانومتر اندازه گیری می شود. شدت رنگ تولید شده با مقدار PSA موجود در سرم نسبت مستقیم دارد.

مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نیست :

۱. سمپلرهای۲۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکرولیتری دقیق. سمپلر ۸ کاناله با قابلیت پیپتینگ ۵۰ تا ۱۰۰ میکرولیتر و یا دیسپنسر اتوماتیک، اگرچه ضروری نیست ولی باعث بهبود قابل توجه تکرارپذیری و صحت نتایج می گردد.

۲. آب مقطر با هدایت الکتریکی کمتر از $1\mu S/cm$

۳. دستگاه الایزا ریدر دارای فیلتر ۴۵۰ نانومتری و در صورت امکان ۶۳۰ نانومتری بعنوان فیلتر مرجع.

۴. کاغذ جاذب رطوبت

۵. دستگاه واشر اتوماتیک یا هر تجهیز دیگر نظیر سمپلر ۸ کاناله یا سرنگ که قادر به ریختن ۳۵۰ میکرولیتر محلول شستشو باشد.

نگهداری کیت :

۱. کیت پس از تحویل باید در دمای ۸-۲ درجه سانتی گراد (یخچال) نگهداری شود. کلیه معرف ها و اجزاء کیت تا تاریخ انقضاء مندرج برروی جعبه کیت به شرط نگهداری در دمای یادشده پایدار هستند. ***هرگز فراتر از تاریخ انقضاء مندرج برروی جعبه از کیت استفاده نکنید.***

۲. غلظت کالیبراتورها و نیز دامنه قابل قبول نمونه های کنترل بر روی ویال درج شده است و ممکن است بین شناسه های مختلف ساخت تفاوت داشته باشد.

۳. از انجماد کیت یا اجزاء کیت خودداری نمایید.

۴. میکروپلیت باید در کیسه در بسته به همراه نمگیر نگهداری شود. در هنگام استفاده پس از رسیدن دمای کیسه میکروپلیت به دمای اتاق، تعداد لازم استریپ را از کیسه آلومینیومی خارج و مابقی همراه نم گیر بلافاصله به کیسه منتقل و درب کیسه با دقت بسته و به یخچال منتقل گردد.

۵. محلول شستشو باید روزانه و تازه تهیه شود و در همان روز تهیه مصرف شود.

۶. تغییر در خصوصیات فیزیکی معرف ها نظیر وجود ذرات معلق در آنها اغلب حاکی از آلودگی و خرابی معرف ها می باشد.

۷. محلول سوبسترا-رنگ زا باید بی رنگ باشد. وجود رنگ آبی در این محلول نشان از خرابی و آلودگی آن دارد و باید دور ریخته شود.

۸. کیت های باز شده اگر در شرایط توصیه شده در بالا نگهداری شوند، حداکثر به مدت ۸ هفته پایدار خواهند بود.

۹. اجزاء کیت ها با سری ساخت متفاوت را با یکدیگر مخلوط نسازید و از جابه جایی درب معرف ها جلوگیری شود.

۱۰. استفاده از سر سمپلر یکبار مصرف برای دقت و صحت و پرهیز از آلودگی برای برداشتن نمونه ها استانداردها و کنترل ها ضروری است.

جمع آوری و آماده سازی نمونه:

۱. سرم یا پلاسمای EDTA نمونه مناسب برای این آزمایش است.

۲. از نمونه های با کدورت بالا، همولیز یا لیپمیک ترجیحا استفاده نشود.

۳. در صورتی که انجام آزمایش در همان روز جمع آوری نمونه امکان پذیر نباشد، نمونه ها را می توان برای مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتیگراد نگه داری کرد. برای مدت طولانی تر نمونه ها باید در$-۲۰^{\circ}C$ سانتیگراد نگهداری شود.

۴. از ذوب و انجماد مکرر نمونه ها اجتناب شود. نمونه های منجمد باید قبل از آزمایش به آرامی، اما به طور کامل مخلوط شده تا کاملاً یکنواخت و همگن گردد.

احتیاطات و هشدارها

۱. کیت فقط برای تشخیص طبی آزمایشگاهی کاربرد دارد.

۲. کلیه معرف های کیت برای سنجش مستقیم PSA در سرم یا پلاسمای EDTA استاندارد شده اند و برای سنجش PSA در سایر مایعات بیولوژیک یا پلاسمای غیر EDTA مناسب نمی باشد.

۳. قبل از آغاز سنجش، دستورالعمل پیش رو را بدقت مطالعه نموده و اطمینان حاصل کنید که تمامی نکات آن را بخوبی فراگرفته اید. همواره از ویرایش معتبر و به روز دستورالعمل که همراه کیت بسته بندی شده است، استفاده کنید

۴. کلیه جوانب ایمنی دراجرای آزمایش رعایت شود. برای آگاهی از احتیاطات لازم به "راهنمای اصول کلی حفاظت و پیشگیری از آلودگی کارکنان و محیط آزمایشگاه (روش های صحیح میکروب شناسی وتکنیک های صحیح آزمایشگاهی)" تالیف دکتر شهلا فارسی از انتشارات کمیته ایمنی و امنیت زیست آزمایشگاهی اداره کل آزمایشگاه مرجع سلامت ویرایش ۱۳۹۳ مراجعه نمایید.

۵. از تماس تمام معرف ها به ویژه محلول توقف که حاوی اسید کلریدریک است با پوست جلوگیری شود. در صورت تماس با آب و صابون شستشو داده شود.

۶. در این کیت برای ساخت برخی اجزا از سرم انسانی استفاده شده است که از نظر آنتی بادی علیه HIV-1 and 2 و HCV و آنتی ژن سطحی ویروس هپاتیت (HBsAg)B ، منفی گزارش شده اند، ولی از آنجایی که هیچ آزمایشی نمی تواند به طورکامل ایمنی یک نمونه با منشاء انسانی را تضمین نماید، با آن همانند یک نمونه بالقوه عفونی رفتار نمایید.

۷. با کلیه نمونه های بیمار به عنوان نمونه های بالقوه عفونی برخورد نمایید.

۸. برخی از معرف ها حاوی سدیم آزاید به عنوان نگهدارنده می باشند. سدیم آزاید ممکن است با سرب و مس موجود در لوله کشی آب شهری واکنش داده و تولید آزایدهای فلزی قابل انفجار کند. جهت آگاهی از نحوه وارهایی پس ماندهای آزمایشگاهی به "دستورالعمل نحوه مدیریت پسماندهای آزمایشگاهی" تالیف دکتر شهلا فارسی از

انتشارات کمیته ایمنی و امنیت زیست آزمایشگاهی اداره کل آزمایشگاه مرجع سلامت ویرایش ۱۳۹۴ مراجعه نمایید.

آماده سازی معرف ها:

۱. همه معرف ها باید قبل از استفاده به دمای اتاق (۲۰-۲۷°C) برسند.

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

نکات مهم در انجام تست:

۱. فرایند شستشو از اهمیت بسیار بالایی برخوردار است. شستشوی ناکافی باعث عدم جداشدن پیوندهای غیراختصاصی و جذب نوری زمینه (Background) می گردد.

۲. کیفیت آب مقطر مصرفی در کیفیت محلول شستشو و جدا کردن پیوندهای غیراختصاصی اهمیت زیادی دارد.

۳. در مواردی که مقدار PSA نمونه بیش از 40 ng/mL باشد، نمونه را با استاندارد صفر رقیق و سپس آزمایش را تکرار نموده و ضریب رقت را در محاسبه نهایی منظور نمایید.

۴. قبل از شروع کار اطمینان حاصل نمایید که دمای کلیه اجزاء کیت به دمای اتاق رسیده باشد.

۵. دمای مطلوب محیط آزمایشگاه برای آزمایش های الایزا۲۰ تا۲۷ درجه سانتیگراد می باشد.

۶. معرف ها و نمونه ها را قبل از آزمایش بخوبی مخلوط نمایید.

۷. بهتراست استانداردها، کنترل ها و نمونه ها را به صورت دوتایی(Duplicate) و ترجیحاً در دو چاهک عمودی آزمایش کنید و میانگین جذب نوری دو چاهک جهت محاسبه نتایج مورداستفاده قرار گیرد.

۸. جهت پیپت کردن محلول سوبسترا-رنگ زا و محلول توقف از میکروپیپت های حاوی ***قطعات فلزی استفاده نکنید***.

۹. زمان های انکوباسیون و دمای انکوباسیون را با دقت رعایت کنید.

۱۰. در کیت PSA شرکت پیشگامان سنجش به دلیل استفاده از استرپتاویدین برای پوشاندن کف چاهک، تا زمان افزودن کونژوگه عملاً واکنشی در چاهک رخ نمی دهد، بنابراین، جز خطای ناشی از تبخیر نمونه(در صورتی که ریختن استانداردها، کنترل ها و نمونه ها بیش از۵ دقیقه به طول بیانجامد) خطای قابل توجهی از ناحیه اختلاف زمانی بین ریختن اولین نمونه و آخرین نمونه رخ نمی دهد. با این وجود پیپتینگ چاهک ها با محلول کونژوگه نباید بیشتر از ۵ دقیقه به طول بیانجامد، لذا توصیه می شود، اگر کل پلیت هم زمان ران می شود، برای پرهیز از

خطای ناشی از اختلاف زمانی(Drift)، از تجهیزاتی نظیر دیسپنسر اتوماتیک یا سمپلر هشت کاناله برای ریختن معرف ها استفاده شود یا بیش از شش استریپ در هر بار ران نشود.

۱۱. در هر بار انجام آزمایش منحنی کالیبراسیون را مجدد ترسیم نموده و برای محاسبه نتایج از منحنی ذخیره شده استفاده نکنید.

۱۲. مراحل آزمایش را بدون وقفه انجام دهید. وقفه بین مراحل باعث نتایج کاذب می گردد.

۱۳. در کلیه مراحل انجام آزمایش و متعاقب هر مرحله پیپتینگ، چاهک ها از نظر وجود حباب بررسی شوند. در صورت وجود حباب با ضربه آهسته به پلیت از محیط خارج شوند.

۱۴. هر نوع نمونه یا ماده کنترلی که حاوی سدیم آزاید یا تیومرسال باشد، با این کیت سازگار نبوده و آزمایش برروی آنها ممکن است به حصول پاسخ های کاذب بیانجامد.

۱۵. با توجه به ارزش بالینی تعیین درصد نسبت fPSA به PSA تام، تاکید می گردد هر دو تست با کیت الایزا پیشگامان سنجش، اندازه گیری و گزارش گردد. معتبرترین داده ها زمانی است که از لات نامبر یکسان برای سنجش هر دو تست استفاده گردد.

روش انجام آزمایش:

۱- تعداد چاهک های کوت شده برای استانداردها، کنترل ها و نمونه های بیمار را بصورت ۲ تایی انتخاب کنید و مابقی چاهک ها را همراه ماده نمگیر درون کیسه مخصوص قرار داده و درب آنرا ببندید.

۲- ۲۰ میکرولیتر از استانداردها، کنترل ها و نمونه های بیمار به داخل هر چاهک بریزید.

۳- ۱۰۰ میکرولیتر از محلول کونژوگه ، به تمام چاهک ها اضافه کنید.

۴- پلیت را بمدت ۳۰ ثانیه به آرامی تکان دهید تا محتویات چاهک ها به خوبی مخلوط شوند. سپس درب چاهک ها را با برچسب مخصوص پلیت پوشانده، آنرا بمدت ۴۵ دقیقه در دمای اتاق(۲۷°C-۲۰) انکوبه کنید.

۵- محتویات چاهک ها را خالی کرده و چاهک ها را طبق دستورالعمل زیر شستشو دهید:

- برای شستشوی چاهک ها، ابتدا ۳۵۰ میکرولیتر بافر شستشو را داخل چاهک بریزید، سپس چاهک ها را وارونه کرده و همراه با تکان دادن خالی کنید و عمل شستشو را چهار بار دیگر (جمعاً به مدت ۵ بار) تکرار کنید. در انتهای شستشو، با ضربه زدن ملایم پلیت بر روی کاغذ جاذب الرطوبه تمامی مایع موجود در چاهک ها را تخلیه نمائید.

• بهتراست برای شستشو از دستگاه های اتوماتیک واشر که قابل برنامه ریزی است استفاده نمایید. که در این صورت به دستورالعمل دستگاه شستشو مراجعه نمایید.

۶- ۱۰۰ میکرولیتر از سوبسترا-رنگ زا آماده مصرف به تمامی چاهک ها اضافه کنید و آنها را بمدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه نمائید.

۷- ۵۰ میکرولیتر از محلول متوقف کننده واکنش به همان ترتیبی که محلول سوبسترا رنگ زا را اضافه نمودید، به همه چاهک ها اضافه کنید. سپس حداکثر ظرف مدت ۱۰ دقیقه جذب نوری هر چاهک را در طول موج ۴۵۰ نانومتر با دستگاه الایزا ریدر قرائت نمائید (در صورت امکان از طول موج ۶۳۰ نانومتر بعنوان فیلتر رفرانس استفاده کنید).

محاسبه نتایج:

۱. با استفاده از میانگین جذب نوری استانداردها برروی محور عمودی (محور Y) و غلظت مشخص آنها برروی محور افقی(محور X) برروی کاغذ میلی متری، منحنی استاندارد را از طریق ترسیم خطوطی که از که از تمامی نقاط تلاقی عبور کرده باشد،ترسیم کنید.

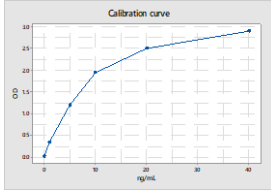
۲. میانگین جذب نوری برای هر نمونه را بدست آورده و روی محور Y جای آنرا پیدا کنید. سپس نقطه مذکور را توسط خطی به منحنی وصل کنید. از نقطه بدست آمده خطی عمود بر محور X وارد کنید تا نقطه تلاقی که نشان دهنده غلظت نمونه است، بدست آید.

۳. در صورتی از اسپکتروفتومتر مخصوص میکروپلیت که مجهز به سیستم پردازش داده های داخلی است استفاده می کنید، جهت محاسبه نتایج و ترسیم منحنی کالیبراسیون به دستوالعمل دستگاه مراجعه نمایید. برای محاسبه نتایج کیت PSA شرکت پیشگامان سنجش ایساتیس از مدل محاسباتی نقطه-به-نقطه(Point-to-point) استفاده کنید.

داده های نمادین منحنی کالیبراسیون

مقادیر جذب نوری ارائه شده در جدول ذیل بعنوان داده های نمادین آورده شده است. لازم به یادآوری است این داده ها فقط جنبه راهنمایی داشته و هر آزمایشگاهی باید برای هر بار آزمایش یک منحنی استاندارد جدید براساس نتایج بدست آمده در آزمایشگاه خویش ترسیم نماید.

ROW	ng/mL	OD
1	**0**	**0.02**
2	**1**	**0.34**
3	**5**	**1.19**
4	**10**	**1.94**
5	**20**	**2.5**
6	**40**	**2.9**



کنترل کیفی:

در هر کیت یک نمونه کنترل وجود دارد که مقادیر موردانتظار برای آن برروی برچسب ویال درج شده است. علاوه بر کنترل داخل کیت ، آزمایشگاه می تواند از نمونه های سرم انباشته(Pooled serum) که در خود آزمایشگاه تهیه شده یا نمونه های کنترل خارجی نیز استفاده نماید. در دو حالت یادشده لازم به ذکر است که آزمایشگاه باید مقدار هدف ، انحراف معیار نتایج و کرانه های بالایی(UCL) و پایینی(LCL) قابل قبول را خود محاسبه و مبنای برنامه های کنترل کیفی خویش قرار دهد.

بازه مرجع:

در یک بررسی که برروی سرم تعدادی از مراجعه کنندگان چندین آزمایشگاه مختلف در سطح استان تهران به عمل آمد ، دامنه مرجع زیر برای گروه های مختلف سنی مردان براساس محاسبه کرانه ٪۹۵ بالایی با استفاده از کیت الایزا PSA شرکت پیشگامان بدست آمد. لازم به ذکر است به دلیل تفاوت های بیولوژیک بین جمعیت های مختلف، و همچنین عواملی نظیر سن، جنس، نژاد، عوامل جغرافیایی، هر آزمایشگاهی باید ابتدا انتقال پذیری(transferability) این داده ها را درخصوص جمعیت موردنظر خویش راستی آزمایی(Verification) کرده و درصورت مشاهده ناهمخوانی، بازه مرجع خود را بدست آورد. بازه مرجع بدست آمده دارای همخوانی ٪۹۹/۹ با مراجع معتبر می باشد.

سن(سال)	Total PSA (ng/mL)
<50	**0.0-2.5**
50-59	**0.0-3.5**
60-69	**0.0-4.5**
≤70	**0.0-6.0**

خصوصیات اجرایی کیت

۱- حد پایینی اندازه گیری(Lower limit of measurement) :

حد شاهد(Limit-of-Blank: LOB) و حد آشکارسازی (Limit-of-detection: LOD)مطابق با راهنمای EP 17-A2 مؤسسه استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی(CLSI) بدست آمد.

به طور خلاصه حد بلانک تحت عنوان مقدار صدک ۹۵ ام (95^{th} percentile) از ۶۰ بار اندازه گیری برروی نمونه شاهد(استاندارد صفر) طی چندین ران بدست آمد. حد بلانک معادل غلظتی درنظر گرفته شد که ۹۵٪ از ۶۰ نتیجه اندازه گیری های تکراری مقداری کمتر از آن بدست دهد. برای تعیین حد آشکارسازی ۲۰ اندازه گیری تکراری بر روی سه نمونه سرم(۶۰=۳×۲۰=n) با محتوای PSA کمتر از**0.5**ng/mLکه مقدار PSA آن به روش مستقل دیگری تعیین شده بود طی سه روز انجام شد و بزرگترین انحراف معیار اندازه گیری های تکراری بر روی سه نمونه یادشده مبنای تعیین حد آشکارسازی قرار گرفت. و از رابطه زیر حد آشکارسازی معادل***0.2 ng/mL***تعیین گردید.

$$LOD = LOB + 1.645SD_L$$

۲- دقت(Precision):

دقت روش با استفاده از کلیه معرف های کیت PSA شرکت پیشگامان سنجش ایساتیس و ۳ انباشته سرمی تهیه شده از نمونه های بیمار در نقاط مختلف بازه اندازه گیری(0.2-40 ng/mL) مطابق با راهنمای EP 05-A3 مؤسسه استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی(CLSI) بدست آمد.

طی ۱۰ روزکاری، سه کاربر و هر یک روزانه سه ران اندازه گیری های تکراری به صورت دوتایی در هر ران بروی نمونه های یاد شده انجام دادند(۲×۳×۳×۱۰). نتایج با روش آماری Fully nested ANOVA تحلیل گردید:

خلاصه نتایج در جدول زیر آورده شده است

Sample Description	Mean (ng/mL)		Repeatability		Within-Laboratory Precision	
			SD	%CV	SD	%CV
Patient Pool	**1.25**	**0.11**	**8.80**		**0.14**	**11.20**
Patient Pool	**3.65**	**0.28**	**7.67**		**0.36**	**9.86**
Patient Pool	**9.33**	**0.58**	**6.22**		**0.77**	**8.25**

۳- اختصاصیت(Specificity):

ارزیابی اختصاصیت مطابق با راهنمای EP 07-A2 مؤسسه استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی(CLSI)، جهت تعیین میزان تداخل از ناحیه مداخله گرهای معمول واکنش های شیمی بالینی ، انجام گردید و مشخص شد که هموگلوبین تا 50 mg/mL، بیلیروبین غیرکونژوگه تا 20 mg/dL و تری گلیسریدهای سرم تا 1000 mg/mL تأثیری بر سنجش PSA تام سرم به روش پیشگامان سنجش ندارد(%interference≤10%).

۴- خطی بودن(Linearity):

به منظور ارزیابی خطی بودن یک نمونه با غلظت اولیه 33.65 ng/mL را با نمونه دیگری با غلظت 0.1 ng/mL به نسبت های مختلف با یکدیگر رقیق کردیم و رقت های مختلف را به صورت مضاعف اندازه گیری ونتایج را با مقادیر موردانتظار که از ضرب غلظت اولیه در ضریب رقت بدست آمده بود مقایسه کردیم و میزان بازیابی و سوگرایی را در نقاط مختلف محاسبه کردیم، که نتایج در جدول زیر خلاصه شده است.

No	Ratio	Expected (ng/mL)	Rep 1 (ng/mL)	Rep 2 (ng/mL)	recovery%	%Bias
1	1	33.65	34.9	32.4	NA	NA
2	0.9	30.30	26.6	27.8	90%	-10.2%
3	0.8	26.95	24.5	25.6	93%	-7.1%
4	0.7	23.60	22.3	21.5	93%	-7.2%
5	0.6	20.25	21.2	19.7	101%	1.0%
6	0.5	16.90	15.7	16.2	94%	-5.6%
7	0.4	13.55	12.8	13.5	97%	-3.0%
8	0.3	10.20	11.2	9.4	101%	0.9%
9	0.2	6.85	5.9	6.4	90%	-10.3%
10	0.1	3.50	3.1	3.8	98%	-1.6%
11	0	0.16	0.21	0.1	NA	NA

NA: کاربردی ندارد

۵- درستی(Trueness):

۵-۱- ارزیابی بازیابی(Recovery Evaluation)

ارزیابی خطای سیستماتیک یا بایاس روش به دو صورت انجام گرفت. ابتدا میزان خطای سیستماتیک نسبی(Proportional Error) از طریق مطالعات بازیابی و با افزودن مقادیر مشخص از PSA انجام گرفت. در این ارزیابی مقادیر مشخصی از PSA به نمونه های مختلف با محتوای PSA متفاوت افزوده و سپس توانمندی سیستم اندازه گیری درتعیین و بازیابی مقدار افزوده شده از طریق رابطه زیر محاسبه گردید:

$$\%Recovery = \frac{Concentration\ Recovered}{Concentration\ Added} \times 100$$

همچنین مقدار خطای سیستماتیک که به زبان ریاضی با Bias بیان می گردد، از رابطه زیر بدست آمد:

$$\%Bias = \frac{\bar{X}\ measured - expected}{Expected} \times 100$$

نتایج این ارزیابی در جدول زیر خلاصه شده است:

Sample	Original Concentration (ng/mL)	2 ng/mL added		4 ng/mL added	
		Recovery%	Bias	Recovery %	Bias
1	0.33	97.5	-5.58%	99.2	2.77%
2	1.4	97.75	-1.33%	97.6	-1.76%
3	4.4	95	-1.56%	93.7	-2.98%
4	11.25	97.5	-0.38%	91.2	-0.69%

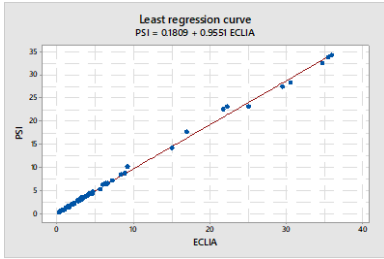
۵-۲- ارزیابی مقایسه ای(Method comparison)

ارزیابی مقایسه ای بین نتایج اندازه گیری کیت سنجش PSA سرم شرکت پیشگامان و روش ECLIA-Cobas E411-Roche diagnostic (n=65, range:0.1-36.7) انجام مطابق با راهنمای EP 09-A2 مؤسسه استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی(CLSI) به روش رگرسیون خطی تحلیل گردید. خلاصه نتایج و نمودار رگرسیون خطی(Linear regression) در ادامه آورده شده است:

$$PSI = 0.9551ECLI + 0.1809$$

$$r = 0.9987$$

$$r^2 = 0.9975$$



۶- پدیده هوک

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

منابع و مراجع

1. CLSI. Evaluation of detection capability for clinical laboratory measurement procedures; approved guideline.2nd ed. CLSI document EP 17-A2. Pierson-Perry J.F. Clinical and Laboratory Standard Institute, 2012.

2. CLSI. Evaluation of precision of quantitative measurement procedures; approved guideline. CLSI document EP 05-A3. McEnroe R.J. Clinical and Laboratory Standard Institute, 2014.

3. CLSI. Interference Testing in clinical chemistry; approved guideline.2nd ed. CLSI document EP07-A23. McEnroe R.J. Clinical and Laboratory Standard Institute, 2005.

4. Desirable Specifications for Total Error, Imprecision, and Bias, derived from intra- and inter-individual biologic variation, https://www.westgard.com/biodatabase1.htm

5. Kasper D.L. et al. (2018). Harrison's principles of internal medicine.20th ed.(pp. 3/17-4/17) Mc Graw Hill Education

6. Pagana K.D. et al. (2018). Mosby's Manual of diagnostic and Laboratory tests.6th ed. (pp. 378-82). Elsevier Inc.

7. Rifai Nader. et al. (2018). Clinical chemistry and molecular diagnostics.6th ed. (pp. 472-5). Elsevier Inc.

خطایابی در آزمایش های الایزا

نوع مشکل	علت مشکل	راه حل
پایین بودن OD استانداردها و نمونه ها	افت و یا آلودگی کونژوگه	تکرار تست با کونژوگه جدید
	پایین بودن دما و یا کوتاه بودن زمان انکوباسیون، به دما نرسیدن محلولهای کیت و نمونه بیماران	۱.دمای آزمایشگاه و تایمر را چک کرده و تست را تکرار کنید. ۲.قبل از شروع آزمایش کیت و نمونه بیماران به دمای اتاق برسد.
	PH نامناسب و یا غلظت بالایWash Buffer، شستشوی نامناسب و یا خشک شدن چاهک ها	۱.PH آب مقطر را چک کنید و تست را با Wash Buffer جدید تکرار کنید. ۲.پس از شستشوی کامل و تخلیه چاهک ها بلافاصله تست را ادامه دهید.
	نگهداری نامناسب کیت و عدم رعایت زنجیره سرد	۱.پس از باز کردن کیت تاریخ را ثبت کنید و به تاریخ انقضا توجه کنید. ۲.پس از هر بار مصرف پلیت را با چسب بپوشانید و کیت را در یخچال نگهداری کنید.
	طول موج خوانش نامناسب (۴۵۰ nm بجای ۴۰۵nm)	۱.تست را با دستگاه کالیبر شده بخوانید. ۲.طول موج دستگاه را دوباره چک کنید.
صحیح نبودن نمودار استانداردها	آلودگی استانداردها	از سری استاندارد جدید استفاده کنید.
	پیپتینگ نامناسب	۱.استفاده از نوک سمپلر یکبار مصرف ۲.از سمپلرهای تک کاناله یا چند کاناله کالیبر شده استفاده کنید. ۳.توجه کنید نوک سمپلر محکم به سمپلر متصل باشد. ٤.توجه کنید در هنگام پیپتینگ حباب وارد نوک سمپلر نشود.

	PH نامناسب و یا غلظت بالای Wash Buffer، شستشوی نامناسب و یا خشک شدن چاهک ها	۱ . PH آب مقطر را چک کنید و تست را با Wash Buffer جدید تکرار کنید. ۲.پس از شستشوی کامل و تخلیه چاهک ها بلافاصله تست را ادامه دهید.
بالا بودن رنگ زمینه، بالا بودن OD	آلودگی استاندارد صفر	تکرار تست با استاندارد های جدید
	آلودگی محلول رنگزا	استفاده از محلول رنگزا جدید
	آلودگی و یا غلظت پایین Wash Buffer، شستشوی نامناسب	۱.عدم آلودگی آب مقطر با موادی مانند وایتکس را چک کنید و تست را با Wash Buffer جدید تکرار کنید. ۲. تمام سوزن های دستگاه واشر را چک کنید.
	طول موج نامناسب در خوانش	۱.تست را با دستگاه کالیبر شده بخوانید. ۲.طول موج دستگاه را دوباره چک کنید. ۳.از فیلتر ۶۳۰ نانومتر بعنوان فیلتر رفرانس استفاده کنید.
	آلودگی محلول Stop	تکرار تست با محلول Stop جدید
عدم تولید رنگ در چاهک ها	استفاده از مواد سایر کیت ها	تکرار تست با مواد همان کیت
	انجام نشدن مرحله ای از تست	تکرار تست
	آلودگی محلول رنگزا	تکرار تست با محلول رنگزا جدید
	آلودگی محلول کونژوگه با سدیم آزاید	تکرار تست با محلول کونژوگه جدید
	پیپتینگ نامناسب، گرفتگی لوله داخلی سمپلر بواسطه آلودگی	۱. استفاده از نوک سمپلر یکبار مصرف ۲. از سمپلرهای تک کاناله یا چند کاناله کالیبر شده استفاده کنید ۳. توجه کنید نوک سمپلر محکم به سمپلر متصل باشد.

عدم تکرار پذیری مناسب		٤. توجه کنید در هنگام پیپتینگ حباب وارد نشود. ٥. توجه کنید جداره خارجی نوک سمپلر حاوی محلول نباشد. ٦. کالیبراسیون و تمیز کردن ادواری سمپلر ها
	طولانی شدن زمان انجام تست	فاصله زمانی بین اضافه کردن استاندارد ها 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.
	باقی ماندن کونژوگه در لبه چاهکها و عدم شستشوی مناسب و یا خشک شدن چاهک ها	پیپتینگ صحیح و شستشوی مناسب، پس از شستشوی کامل و تخلیه چاهک ها بلافاصله تست را ادامه دهید.
	وجود حباب در چاهک ها	در حین انکوباسیون و بعد از Stop کردن واکنش توجه کنید حباب در چاهک ها نباشد.
	کثیف بودن کف چاهکها	کف چاهکها را با دستمال نرم و مرطوب، تمیز کنید.
	مخلوط نشدن محلول های کیت	قبل از استفاده، ویال محلول ها را به آرامی تکان دهید.

PSA ELISA KIT

Direct immunoenzymatic determination of PSA in serum

Σ = 96 tests **REF PSPS-01**

INTENDED USE

The Quantitative Determination of PSA Concentration in Human Serum.

CLINICAL SIGNIFICANCE

Prostate Specific antigen (PSA) is a serine protease with chymotrypsin-like activity. The protein is a single chain glycoprotein with a molecular weight of 28.4 kDA. PSA derives its name from the observation that it is a normal antigen of the prostrate but is not found in any other normal or malignant tissue. PSA is found in benign, malignant and metastatic prostate cancer. Since prostate cancer is the second most prevalent form of male malignancy, the detection of elevated PSA levels plays an important role in the early diagnosis. Serum PSA levels have been found too more useful than prostatic acid phosphatase (PAP) in the diagnosis and management of patients due to increased sensitivity. In this method, PSA calibrator, patient specimen or control is first added to a streptavidin coated well. Biotinylated monoclonal and enzyme labeled antibodies (directed against distinct and different epitopes of PSA) are added and the reactants mixed. Reaction between the various PSA antibodies and native PSA forms a sandwich complex that binds with the streptavidin coated to the well. After the completion of the required incubation period, the enzyme- PSA antibody bound conjugate is separated from the unbound enzyme-PSA conjugate by aspiration or decantation. The activity of the enzyme present on the surface of the well is quantitated by reaction with a suitable substrate to produce color. The employment of several serum references of known prostate specific antigen (PSA) levels permits the construction of a dose response curve of activity and concentration. From comparison to the dose response curve, an unknown specimen's activity can be correlated with PSA concentration.

PRINCIPLE

The technology uses streptavidin-Biotin with two high affinity monoclonal antibodies in an immunometric assay system. One of these antibodies is conjugated to biotin and the otherwise is conjugated to horseradish peroxidase enzyme. The two antibodies react simultaneously with the antigen present in standards or samples and at the same time biotinylated antibody is captured to the solid phase by biotin-streptavidin interaction. This reaction leads to the formation of a streptavidin – biotinylated *capture antibody - antigen - signal antibody* complex, also referred to as a “sandwich”. For replace of unreacted reagents, microtiter wells are washed repeatedly. After the addition of a ready-to-use tetramethyl-benzidine substrate, TMB is catalyzed by the HRP to produce a blue color product that changes to yellow after adding stop solution. The signal is measured using an ELISA reader at 450nm and 630nm reference filter.

Reagent and material supplied in the kit

1.Microwell 1 plate: 12 x 8 wells coated with streptavidin.
2.Standards Set : 6 vials, 0.5 ml per vial, containing 0, 1.0 ,5.0 ,10 ,20 and 40 ng/ml PSA, calibrated against NIBSC/WHO, 668/96 serum with preservative.
3.Enzyme Conjugate: 1 vial, 12 ml, monoclonal anti-PSA Conjugated to biotin plus monoclonal anti-PSA Conjugated to HRP. **ready to use**
4.Substrate - Chromogen: 1 vial, 11 ml. Hydrogen peroxide and (TMB) solution, **ready to use**
5.Stop Solution: 1 vial, 6 ml, 1N HCL, **ready to use**
6.Wash Buffer: 1 vial, 30 ml, concentrated buffer with Tween-20, (**20x).**
7.Control Serum:1 vial, 0.5 ml, containing PSA, in serum with preservative. the exact concentration is printed on the label.

Preparation of the Sample

Serum samples can be prepared according to common procedures used routinely in clinical laboratory practice. Samples can be stored at 2-8 °C if the assay is carried out within 24 hours, otherwise aliquots should be prepared and stored deep frozen (-20 °C). Frozen samples should be thawed and thoroughly mixed before assaying. Repeated freezing and thawing should be avoided.

PRECAUTION

1. In one test-run do not combine strips, conjugate and standards from kits which have different lot numbers.
2. Solutions containing TMB and/or peroxide should not come into contact with metals or metal- ions, since this may give rise to unwanted color formation.
3. Allow that samples and all reagents come to ambient temperature before use.

Preparation of Wash Solution

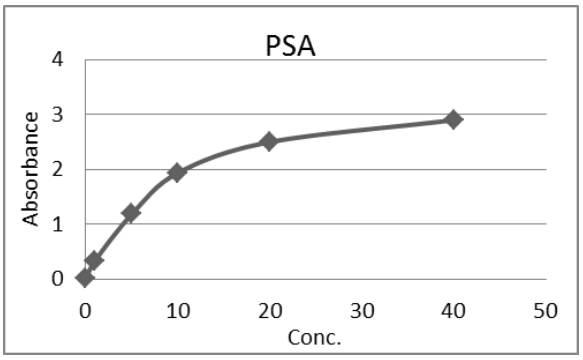
1. Dilute the concentrated wash buffer 1:20 with distilled water. The diluted wash buffer must be at 20 to 25°C when used.
2. Incomplete washing will adversely affect the test results. Operating instructions for the washing equipment should be followed. Wash five times each plate. Blot dry the microplate by inverting the plate onto absorbent tissue, and striking a hard surface several times. If no automatic washer is available, washing can be performed manually as follows: Aspirate thoroughly the liquid in the wells. Then fill each well (0.3ml) with diluted wash solution. Repeat these steps 5 times. Complete the wash cycle by blotting the plate dry with absorbent tissue.

PROCEDURE

1. take out the microplate with the required number of strips. The left strips are placed in the plastic pouch along with the silica gel bag, and sealed
2. Pipette **20 µl of standards, control and sera** into the wells.
3. Pipette **100 µl of enzyme conjugate** into each well.
4. Cover the strips with a plate sealer. Incubate **at room temperature for 45 minutes**.
5. Wash each well with the solution **above five times** and then blot dry by pressing plate onto absorbent tissue. (See Directions for washing).
6. Pipette **100 µl** of **Substrate-chromogen** into each well and Incubate **in dark and room temperature for 15 minutes**
7. Stop the reaction by adding **50 µl of stop solution** to each well and mixing completely.
8. Put the plate in the microplate reader and read (within 10 minutes after step 7) the absorbance of the solution in the wells at **450nm and 630 nm.**

Calculation of Results

1. Calculate the mean absorbance value for each set of standards and samples at 450 nm.
2. Construct a standard curve by plotting the mean absorbance obtained from each reference standard against its concentration in ng/ml on graph paper, with absorbance values on the vertical or Y axis, and concentrations on the horizontal or X axis.
3. Use the mean absorbance values for each sample to determine the corresponding concentration of PSA in ng/ml from the standard curve.



Standards ng/ml	OD 450nm
0	0.022
1.0	0.342
5.0	1.19
10	1.94
20	2.50
40	2.90

REFERENCE VALUE

Healthy males are expected to have values below 4 ng/ml.

PERFORMANCE AND CHARACTERISTICS

Sensitivity

For the analytical sensitivity **0.15** ng/ml has been obtained by assaying 15 replicates of the zero standard. It is defined as the concentration corresponding to the sum of the mean OD and its double standard deviation.

. **Specificity**

No interference was detected with the performance of this kit upon other proteins.

Precision and reproducibility

Intra Assay Variation

Within run variation was determined by replicate determination of 3 different sera in one assay.

CV %	SD	Mean (ng/ml)	Number of determinations	Sample
8.46	0.11	1.25	۱۵	۱
7.61	0.28	3.65	۱۵	۲
6.22	0.58	9.33	۱۵	۳

Inter Assay Variation
Between run variations was determined by replicate measurements of three different sera.

CV %	SD	Mean (ng/ml)	Number of determinations	Sample
11.11	0.14	1.29	15	۱
9.77	0.36	3.69	15	۲
7.74	0.77	10.1	15	۳

Linearity
linearity was investigated by serial dilution of three samples of known PSA concentrations. All samples were diluted with zero standard of FSH ELISA Kit.

Recovery %			First Conc. (ng/ml)	Samples
1:8	1:4	1:2		
105	100	97	4.2	1
104	106	99	10.5	2
104	101	103	34.8	3

Hook Effect
In this kit up to 200 ng/ml there isn't hook effect.

References

1. Wild D, *The Immunoassay Handbook*., Stockton Press (1994) p452.
2. Junker R, Brandt B, Zechel C, Assmann G, *Clin Chem,* **43,** 1588- 94 (1997).
3. Prestigiacomo AF, Stamey TA, ' *Physiological variations of serum prostate antigen in the (4-10 ng/ml) range in male volunteers.'* J. Urol 1996;**155**:1977-80.
4. Stamey TA, McNeal JE, Yemoto CM, Sigal BM, Johnstone IM,'*Biological determinants of cancer progression in men with prostate cancer.'* JAMA 1999;**281**:1395-1400.