کیت الایزا Free PSA		Free PSA ELISA KIT

کاربرد:

کیت Free PSA ELISA شرکت پیشگامان سنجش برای اندازه گیری کمی آزمایشگاهی شکل آزاد آنتی ژن اختصاصی پروستات Free Prostate-specific Antigen (fPSA) در سرم یا پلاسما طراحی گردیده است.

مقدمه :

آنتی ژن اختصاصی پروستات یا PSA نوعی سرین پروتئاز از خانواده کالیکرئین هاست که منحصراً در سلول های اپیتلیال غده پروستات ساخته می شود. ساخت PSA تحت تنظیم پذیرنده های هورمون های جنسی مردانه یا آندروژن هاست. به دلیل اختصاصیت بافتی بسیار زیاد ازسنجش PSA به عنوان شاخص تومورال، تاکنون بیشترین استفاده تشخیصی شده است. قسمت اعظم PSA ساخته شده در پروستات وارد مایع منی شده و نقش خارج کردن مایع منی از حالت انعقاد را برعهده دارد.

همواره مقداری PSA به داخل خون وارد شده که به سرعت در اثر تشکیل کمپلکس با مهارکننده های پروتئازی درون زا نظیر ۱-آنتی کموتریپسین(ACT)، آلفا-دو- ماکروگلوبولین و مهارکننده آلفا پروتئازی(API) غیرفعال می شود. اشکال یادشده تحت عنوان مجموعه(کمپلکس) PSA یا cPSA نامیده می شوند. حدود ٪۹۰ از cPSA به صورت متصل به ACT است و در سنجش PSA تام اندازه گیری می شود، ولی کمپلکس آن با آلفا-دو ماکروگلوبولین قابل اندازه گیری با روش های معمول سنجش PSA تام نیست. فقط حدود ۱۰ تا ۳۰ درصد PSA تام در سرم به صورت آزاد وجود دارد که البته فاقد فعالیت پروتئازی است.

سرطان پروستات یکی از مشکلات شایع مردان به ویژه در سنین بالاست. بررسی های مختلف شیوع سرطان پروستات را در مردان بین ۷۰ تا ۷۹ سال بین ۳۶ تا٪۵۱ نشان داده است. به تدریج و طی ارزیابی های صورت گرفته برروی اقدامات تشخیصی و درمانی انجام شده متعاقب کسب نتایج بالای آزمایش PSA مشخص گردید که آزمایش PSA تام به تنهایی از حساسیت و ویژگی (تشخیصی) کافی برای تشخیص یا غربالگری بدخیمی های غده پروستات برخوردار نیست و افزایش آن در موارد غیربدخیم، نظیر بزرگی خوش خیم پروستات(BPH) مشاهده می شود. به منظور افزایش ویژگی تشخیصی آزمایش سنجش PSA تام، سنجه های دیگری نظیر بازه نرمال مبتنی بر سن، محاسبه نسبت PSA آزاد (fPSA)به PSA تام(fPSA/tPSA)و سنجش اختصاصی کمپلکس PSA با ACT(PSA-ACT) معرفی گردید. در خصوص نسبت PSA آزاد به PSA تام باید گفت اهمیت این مؤلفه نزد افرادی است که PSA تام آنها بین ۴ تا ۱۰ نانوگرم در میلی لیتر پلاسما است، و در موارد PSA تام بیش از ۱۰ یا کم تر از ۴ نانوگرم در میلی لیتر این نسبت ارزش تشخیصی ندارد. نسبت های بزرگترPSA آزاد به PSA تام به سلامت نزدیک تر است. به عنوان مثال در حالی که ٪۶۵ افراد بالای ۷۰ سال با نسبت fPSA/tPSA کمتر از 0.1 به سرطان پروستات مبتلا هستند، فقط ٪۱۶ افراد همین گروه سنی که نسبت fPSA/tPSA آنها بیش از ۰/۲۵ است به سرطان پروستات مبتلا هستند. اندازه گیری نسبت fPSA/tPSA در افراد تحت درمان به ویژه هورمون درمانی ارزش تشخیصی ندارد، همچنین این نسبت در مواقعی که سنجش tPSA و fPSA به وسیله کیت های تشخیصی دو سازنده متفاوت صورت گرفته است ممکن است به نتایج گمراه کننده ای بیانجامد.

اساس آزمایش :

کیت سنجش fPSA شرکت تولیدی، تحقیقاتی پیشگامان سنجش ایساتیس برمبنای اصول ایمونومتریک غیررقابتی عمل می کند. در این کیت از فن آوری استرپتاویدین در پوشاندن فاز جامد استفاده شده است. به طور خلاصه استاندارد یا کنترل یا نمونه بیمار همراه با کونژوگه که حاوی دو نوع آنتی بادی علیه شاخص های اختصاصی PSA آزاد یکی کونژوگه با بیوتین و دیگری کونژوگه با آنزیم HRP است و fPSA را از دو جایگاه متفاوت شناسایی می کنند به چاهک های پوشیده شده از استرپتاویدین اضافه می شوند. fPSA موجود در استاندارد/کنترل/ 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 توقف تولید رنگ متوقف می گردد که شدت جذب نوری در ۴۵۰ نانومتر اندازه گیری می شود. شدت رنگ با مقدار fPSA موجود در سرم نسبت مستقیم دارد .

معرف ها :

معرف	٤٨ تستی	٩٦ تستی	آماده سازی
پلیت پوشیده شده با استرپتاویدین	1×48 wells	1×96 wells	آماده مصرف
کالیبراتور ۱-۶ (۰، ۰/۲۵، ۱، ۲/۵، ۵، و ۱۰ نانوگرم در میلی لیتر) در بافر سازگار با سرم انسانی، همراه با نگهدارنده	6 ×0.5 mL	6 ×1.0 mL	آماده مصرف
دو نمونه کنترل در بافر سازگار با سرم انسانی همراه با نگهدارنده (بازه قابل قبول سرم کنترل برروی برچسب قید شده است)	2 ×0.5 mL	2 ×1.0 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 بنزیدین و آب اکسیژنه)	1 ×6.0 mL	1 ×12.0 mL	آماده مصرف
محلول توقف(اسید کلریدریک یک مولار)	1 ×6.0 mL	1 ×6.0 mL	آماده مصرف

یادآوری: در کلیه کیت های پیشگامان، محلول های سوبسترا-رنگ زا، توقف و شستشو یکسان می باشد.

مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نیست :

۱. سمپلرهای، 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 µS/cm
۳. دستگاه الایزا ریدر دارای فیلتر ۴۵۰ نانومتری و در صورت امکان ۶۳۰ نانومتری بعنوان فیلتر رفرانس.
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 واش 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 ترجیحاً 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 در۲۰°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 آزمایشگاهی کاربرد دارد.
۲. کلیه معرف های کیت برای سنجش مستقیم fPSA در سرم یا پلاسمای EDTA استاندارد شده اند و برای سنجش fPSA در مایع منی یا سایر مایعات بیولوژیک و 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 B(HBsAg) ، 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 fPSA نمونه بیش از 10 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 fPSA 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، 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 آثار زیانباری بر نتایج دارد.
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.

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- ۵۰ 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(۲۰-۲۷°C) 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.
۸. 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).

۹. 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 تمامی نقاط تلاقی عبور کرده باشد،ترسیم کنید.

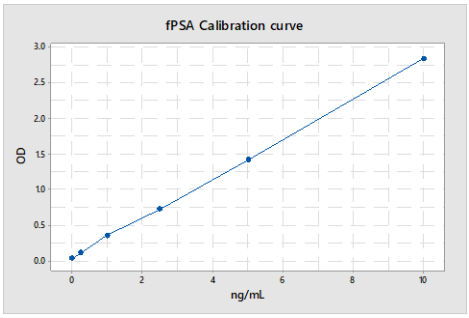
۲. میانگین جذب نوری برای هر نمونه را بدست آورده و روی محور Y جای آنرا پیدا کنید. سپس نقطه مذکور را توسط خطی به منحنی وصل کنید. از نقطه بدست آمده خطی عمود بر محور X وارد کنید تا نقطه تلاقی که نشان دهنده غلظت نمونه است، بدست آید.

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 fPSA شرکت پیشگامان سنجش ایساتیس از مد 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.

calibrator	OD	ng/mL
1	**0.03**	**0**
2	**0.11**	**0.25**
3	**0.35**	**1.0**
4	**0.72**	**2.5**
5	**1.41**	**5.0**
6	**2.83**	**10**



کنترل کیفی:

در هر کیت دو نمونه کنترل وجود دارد که مقادیر موردانتظار برای هر یک 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:

اندازه گیری fPSA باید همراه با آزمایشی هم ارزمولکولی نظیر Pishgaman Sanjesh PSA ELISA صورت گرفته تا نسبت قابل اعتمادی از fPSA/tPSA بدست آید. جهت بدست آوردن مقادیر راهنما حدود ۴۸ نمونه از افراد دچار بزرگی خوش خیم پروستات(BPH) و ۶۸ نمونه افراد مبتلا به سرطان پروستات(PCa) با هر دو روش آزمایش و نسبت یادشده در هر دو گروه محاسبه گردید، که نتایج در جدول زیر خلاصه شده است:

تشخیص	fPSA/tPSA		
	میانه	بازه	میانگین
بزرگی خوش خیم پروستات	۰/۱۹	۰/۰۴- ۰/۴	۰/۲
سرطان پروستات	۰/۰۹	۰/۰۲- ۰/۵	۰/۱۱

همانطور که از نتایج بر می آید نسبت های بالاتر به سلامت نزدیک تر هستند و مقدار fPSA در افراد دچار بزرگی خوش خیم پروستات بیش از مبتلایان به سرطان پروستات می باشد.

نقطه مرزی مشخصی را نمی توان برای نسبت fPSA/tPSA به منظور افتراق BPH از PCa تعیین کرد. اگر cut-off کوچکی برای این نسبت درنظر گرفته شود، ویژگی تشخیصی(Diagnostic specificity) کمیت fPSA/tPSA افزایش می یابد وموارد منفی کاذب کم تر و

مثبت کاذب بیشتری تشخیص داده می شود. برعکس اگر عدد بالایی را برای cut-off درنظر بگیریم از تعداد موارد مثبت کاذب کاسته و بر تعداد موارد منفی کاذب افزوده می شود.

براساس داده های بدست آمده در ارزیابی نسبت fPSA/tPSA در دو گروه BPH و PCa ، سه نسبت مختلف برای cut-off به انضمام محاسبات حساسیت و ویژگی تشخیصی و محدوده اطمینان 95% برای هریک از دو کمیت یادشده در جدول زیر ارائه شده است. لازم به ذکر است به دلیل تفاوت های بیولوژیک بین جمعیت های مختلف، و همچنین عواملی نظیر سن، جنس، نژاد و عوامل جغرافیایی هر آزمایشگاهی باید ابتدا انتقال پذیری(**transferability**) هر یک از این نسبت ها را به عنوان **cut-off** نسبت **fPSA/tPSA** را درخصوص جمعیت موردنظر خویش راستی آزمایی(**Verification**) کرده و درصورت مشاهده ناهمخوانی، **cut-off** مطلوب خویش را بدست آورد. **لازم به ذکر است هر آزمایشگاه موظف است حسب درخواست پزشک و بیمار اطلاعات لازم در خصوص میزان موارد مثبت و منفی کاذب محتمل را دراختیار وی قرار دهد.**

fPSA/tPSA	PCa(TP/FP)	BPH(TN/FN)	Diagnostic Sensitivity(CI)	Diagnostic Specificity(CI)
0.09	32 /3	45/36	47.06 %(34.83% to 59.55%)	93.75% (82.80% to 98.69%)
0.13	50/9	39/18	73.53% (61.43% to 83.50%)	81.25% (67.37% to 91.05%)
0.23	66/33	15/2	97.06 %(89.78% to 99.64%)	31.25 %(18.66% to 46.25%)

Cut-off پیشنهادی برای نسبت fPSA/tPSA

لطفاً از درج هرگونه مقدار موردانتظار برای Free PSA به تنهایی خودداری کنید، زیرا هیچ مقدار معنی‌داری را نمی توان برای cut-off کمیت Free PSA سرم تعیین کرد و تعیین هر مقدار برای این منظور ممکن است به سوء تفسیر دست‌اندرکاران بالینی منجر شود اما برای نسبت fPSA/tPSA مقدار زیر به عنوان نقطه مرزی پیشنهاد می شود.

	unit	Expected Value
fPSA/tPSA	Ratio	0.1

لازم به ذکر است که طبق برآوردهای بالینی ، در صورت انتخاب این نقطه به عنوان **cut-off** میزان شیوع سرطان پروستات ٪۴۹ در مردان ۵۹-۵۰ سال، ٪۵۸ در مردان ۶۰-۶۹ سال و ٪۶۵ در مردان بیش از ۷۰ سال می باشد[1] و توصیه می‌شود، در صورت درج این مقدار به عنوان **cut-off** حتماً نتایج این پژوهش درقالب توصیه یا کامنت در ذیل نتیجه ارائه شود.

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 شاهد تحت عنوان مقدار صدک ۹۵ ام (95th percentile) از ۶۰ بار اندازه گیری برروی نمونه شاهد(استاندارد صفر) طی چندین ران بدست آمد. حد شاهد معادل غلظتی درنظر گرفته شد که ٪۹۵ از ۶۰ نتیجه اندازه گیری های تکراری مقداری کمتر از آن بدست دهد. با این روش حد شاهد معادل 0.022 ng/mL بدست آمد. برای تعیین حد آشکارسازی ۲۰ اندازه گیری تکراری بر روی سه نمونه سرم(n=۲۰×۳=۶۰) با محتوای fPSA کمتر از**0.1ng/mL**که مقدار fPSA 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***0.05 ng/mL*** تعیین گردید.

$$LOD = LOB + 1.645SD_L$$

۲- دقت(Precission):

دقت روش با استفاده از کلیه معرف های کیت fPSA شرکت پیشگامان سنجش ایساتیس و سه انباشته سرمی تهیه شده از نمونه های بیمار در نقاط مختلف بازه اندازه گیری(0-10 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 به کمک یک نرم افزار صفحه گسترده و 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	**0.33**	**0.017**	**5.15**	**0.036**	**10.91**
Patient Pool	**3.04**	**0.125**	**4.11**	**0.428**	**14.08**
Patient Pool	**7.20**	**0.481**	**6.67**	**0.581**	**8.07**

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 متداول موجود در سرم انجام گردید. به اختصار برای ارزیابی هر مداخله گر سرم بیمار در دو ناحیه غلظتی به دو بخش مساوی تقسیم و به یکی افزونه حاوی مداخله گر و به دیگری حجم مساوی افزونه فاقد مداخله گر(بافر PBS) اضافه و حد تداخل مطابق با فرمول زیر محاسبه گردید. نتایج در جدول زیر خلاصه شده است.

$$\%interference = \frac{measured\ value - true\ value}{true\ value} \times 100$$

Compound	Concentration with no Significant interference
Lipemia (Intralipid)	**1000 mg/dL**
Bilirubin(unconjugated)	**20 mg/dL**
hemoglobin	**500 mg/dL**

٤- خطی بودن(Linearity):

به منظور ارزیابی خطی بودن یک نمونه با غلظت اولیه 9.65 ng/mL را با نمونه دیگری با غلظت 0.34 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	9.65	9.33	9.97	NA	NA
2	0.9	8.72	8.39	8.53	97%	-2.9%
3	0.8	7.79	7.48	7.97	99%	-0.8%
4	0.7	6.86	6.88	6.97	101%	1.0%
5	0.6	5.93	6.20	7.06	112%	11.9%
6	0.5	4.99	5.24	5.71	110%	9.6%
7	0.4	4.06	4.59	4.46	111%	11.5%
8	0.3	3.13	3.32	3.33	106%	6.1%
9	0.2	2.20	2.34	2.42	108%	8.3%
10	0.1	1.27	1.29	1.32	103%	2.8%
11	0	0.34	0.34	0.34	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 fPSA انجام گرفت.

در این ارزیابی مقدار مشخصی از fPSA به نمونه های مختلف با محتوای fPSA 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 بایاس بیان می گردد، از رابطه زیر بدست آمد:

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

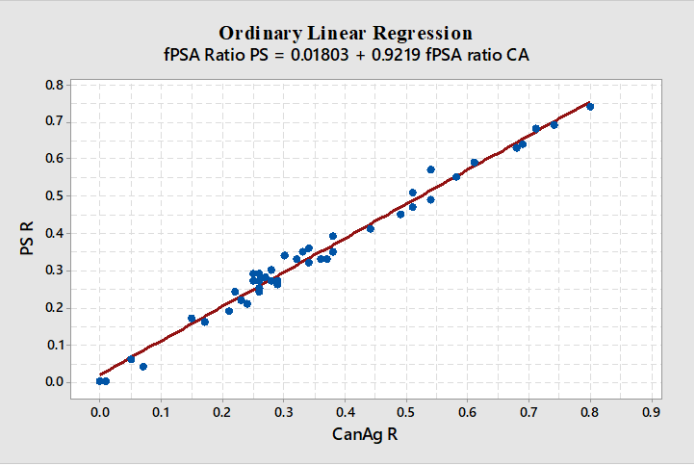
نتایج این ارزیابی در جدول زیر خلاصه شده است:

Sample	Original Concentration (ng/mL)	1.86 ng/mLadded	
		Recovery %	Bias
1	1.48	116.41%	9.03%
2	2.54	99.64%	-0.15%
3	3.52	111.42%	3.87%
4	4.22	115.05%	4.51%

۵-۲- ارزیابی مقایسه ای(Method comparison)

بدلیل اهمیت سنجش همزمان tPSA و fPSA سنجش برروی ۴۷ نمونه بیمار با استفاده از کلیه معرف های کیت fPSA و tPSA پیشگامان و کیت های fPSA روش *CanAg Free PSA Ref 350-10* و *CanAg PSA ref340-10* (*n=47 PSA range 0.26-7.64*)مطابق با راهنمای EP 09-A2 مؤسسه استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی(CLSI) انجام و کسر fPSA/tPSA بدست آمده با هر دو جفت روش به روش رگرسیون خطی با یکدیگر مقایسه گردید. خلاصه نتایج و نمودار رگرسیون خطی، در ادامه آورده شده است:

$$PSI = 1.0681 CanAg + 0.0106$$
$$r = 0.991457$$
$$r^2 = 0.982987$$



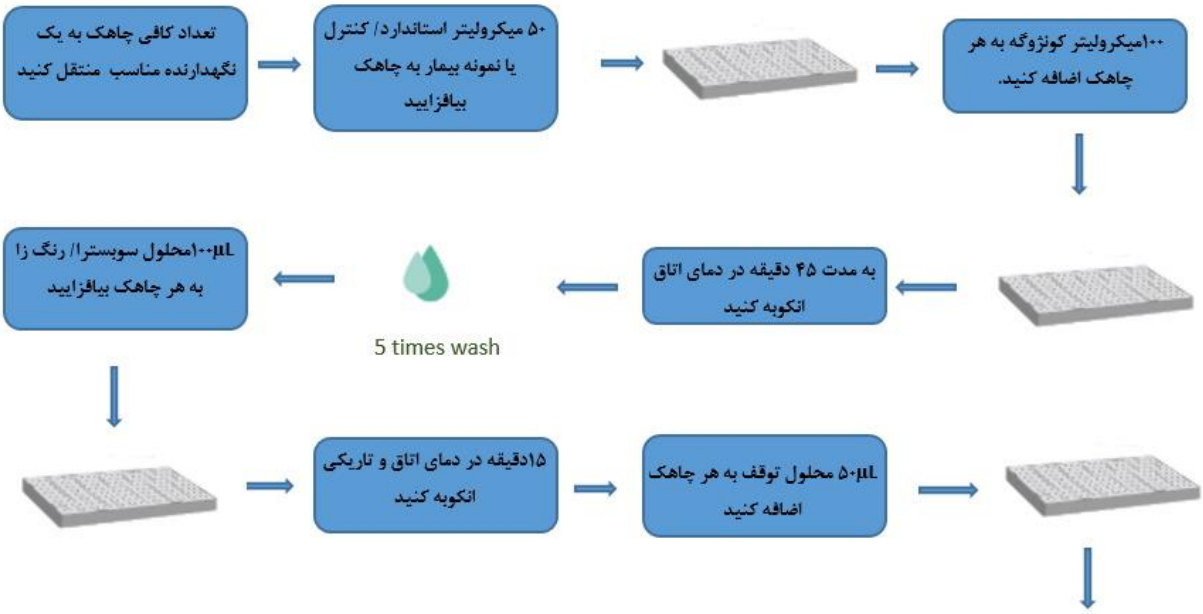
۶- پدیده هوک

در این کیت ، اثر هوک تا غلظت fPSA 150 ng/mLدیده نشد.

منابع و مراجع

1. Catalona W.J. et al. (1995). Evaluation of percentage of free serum prostate-specific antigen to improve specificity of prostate cancer screening. JAMA. 274(15):1214-20.
2. 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.
3. CLSI. Evaluation of precision of quantitative measurement procedures; approved guideline. CLSI document EP 05-A3. McEnroe R.J. Clinical and Laboratory Standard Institute, 2014.
4. CLSI. Interference Testing in clinical chemistry; approved guideline.2nd ed. CLSI document EP07-A23. McEnroe R.J. Clinical and Laboratory Standard Institute, 2005.
5. CLSI. User Protocol for Evaluation of qualitative test performance; Approved guideline 2nd ed. CLSI document EP 12-A2. Garrett P.E. Clinical and Laboratory Standard Institute, 2008.
6. Desirable Specifications for Total Error, Imprecision, and Bias, derived from intra- and inter-individual biologic variation, https://www.westgard.com/biodatabase1.htm
7. Gatalon, W.J. et al. (1991). Measurement of prostate specific antigen in serum as a screening test for prostate cancer. The England Journal of Medicine Anthropological Research, 324(17), 1156-61
8. Kasper D.L. et al. (2015). Harrison's principles of internal medicine.19th ed.(pp. 580-84). Mc Graw Hill Education
9. McPherson R.A. et al (2017). Henry's Clinical Diagnosis and management by Laboratory Methods.23rd ed. (pp.1442-43) Elsevier Inc.
10. Pagana K.D. et al. (2018). Mosby's Manual of diagnostic and Laboratory tests.6th ed. (pp. 378-81) Elsevier Inc.
11. Rifai Nader. et al. (2018). Clinical chemistry and molecular diagnostics.6th ed. (pp.472-75) Elsevier Inc.

خلاصه روش انجام آزمایش



درطول موج
۴۵۰/۶۳۰ نانومتر
قرائت کنید

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	دمای آزمایشگاه و تایمر را چک کرده و تست را تکرار کنید قبل از شروع آزمایش کیت و نمونه بیماران به دمای اتاق برسد
	PH نامناسب و یا غلظت بالای Wash Buffer، شستشوی نامناسب و یا خشک شدن چاهک ها	PH آب مقطر را چک کنید و تست را با Wash Buffer جدید تکرار کنید پس از شستشوی کامل و تخلیه چاهک ها بلافاصله تست را ادامه دهید
	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
	طول موج خوانش نامناسب (۴۰۵ nm بجای ۴۵۰ nm)	تست را با دستگاه کالیبر شده بخوانید طول موج دستگاه را دوباره چک کنید
صحیح نبودن نمودار استانداردها	آلودگی استانداردها	از سری استاندارد جدید استفاده کنید
	پیپتینگ نامناسب	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 نوک سمپلر نشود
	PH نامناسب و یا غلظت بالای Wash Buffer، شستشوی نامناسب و یا خشک شدن چاهک ها	PH آب مقطر را چک کنید و تست را با Wash Buffer جدید تکرار کنید 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	عدم آلودگی آب مقطر با موادی مانند وایتکس را چک کنید و تست را با Wash Buffer جدید تکرار کنید تمام سوزن های 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 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	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

عدم تکرار پذیری مناسب		توجه کنید جداره خارجی نوک سمپلر حاوی محلول نباشد 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