



ELISA

Mikrotitrační metoda

PSA

(prostatický specifický antigen)

REF Z00338

Pro in vitro diagnostické použití

Produktový leták

ELISA pro **kvantitativní** stanovení celkového PSA v lidském séru nebo plazmě



Mikrotitrační metoda – 96 jamková

(12 x 8 jamkových antigenem potažených proužků

Jednotlivě zlomitelné)

1. ÚČEL POUŽITÍ

Tato PSA ELISA se používá pro kvantitativní stanovení celkového prostatického specifického antigenu (PSA) ve vzorcích lidského séra nebo plazmy. Stanovení hladin celkového PSA se používá k určení rizika karcinomu prostaty u mužů ve spojení s digitálním rektálním vyšetřením (DRE) nebo pro sledování efektivity léčby karcinomu prostaty u pacientů.

2. ÚVOD

Rakovina prostaty je nejčastějším typem rakoviny vyskytující se u mužů a je druhou nejčastější příčinou úmrtí z důvodu rakoviny u mužů. Až doposud bylo digitální rektální vyšetření (DRE) často používáno jako jediný způsob diagnostiky pro detekci skorých stádií rakoviny prostaty. Během posledních let se stanovení sérových hladin PSA stalo nejvíce akceptovanou metodou pro zlepšení diagnostické specifity DRE. Přestože je PSA tkáňově specifický protein a není výhradně tumor-specifický, stal se nejvýznamnějším markerem karcinomu prostaty, vykazujíc lepší specifitu jako jiné v tomto kontextu používané biochemické markery (PAP, celková alkalická fosfatáza, karcembryonický antigen atd.).

V roce 1979, Wang a kol. izolovali specifický antigen pro zdravou tkáň prostaty a nazvali ho PSA. Jak bylo prokázáno imunohistologickými studii, PSA je lokalizován v cytoplasmě acinárních buněk prostaty, duktálním epitelu a v sekreci na duktální lamině, je přítomen v normálních, benigně hyperplastických i v maligních tkáních prostaty jako i u metastatické rakoviny prostaty a v seminální plazmě. Když je strukturální integrita prostaty porušena a/nebo je velikost žlázy zvětšena, může se množství PSA v krevní plazmě zvýšit. Zvýšené hladiny PSA k hodnotám vyšším jako 3-4 ng/ml bylo popsáno pro pacienty buď s benigní prostatickou hypertrofií (BPH) nebo s karcinomem prostaty. U této prahové hodnoty se doporučují následná vyšetření, která umožní rozlišení mezi těmito dvěma stavy.

Stanovení sérových hladin PSA není důležité pouze pro skrining pacientů kvůli rakovině prostaty, ale i pro monitoring pacientů, který jsou na tuto chorobu léčeni. Zde jsou pravidelná měření PSA důležitým nástrojem pro vyhodnocení potenciálu a aktuální efektivity operace nebo jiné terapie. Nárůst PSA u pacientů po radikální prostaktómii nebo rádioterapii může umožnit dřívější objevení residuálního nebo rekurentního nádoru.

3. PRINCIPY TESTU

Tato metoda je metodou ELISA založenou na sendvičovém principu. Jamky mikrotitrační destičky jsou potaženy protilátkami proti epitopu na molekule antigenu. Alikvóta patientského séra je inkubována v potažené jamce s enzymem konjugovanou druhou protilátkou (E-Ab), která váže jinou oblast na molekule antigenu. Po inkubaci se nenavázána E-Ab odmyje. Množství navázané E-Ab je úměrné koncentraci antigenu ve vzorku. Po přidání roztoku substrátu je intenzita vzniklé barvy úměrná koncentraci antigenu ve vzorku změřené hodnoty OD kalibrátorů se použijí pro vytvoření kalibrační křivky, z které se vypočtou neznámé vzorky.

4. REAGENCIE

Každý kit obsahuje reagencie postačující pro 96 stanovení.

1. **Mikrotitrační destička:** 12x 8 (zlomitelných) proužků, 96 jamek.
2. **Nulový kalibrátor (A)/rozpouštědlo vzorků:** Připraveno k použití (1X 10 mL), červená kapalina v lahvi s průhledným uzávěrem, obsahuje bez-rtuťový konzervant.
3. **5 PSA kalibrátorů:**

Připraveny k použití (0.50 ml) v následujících koncentracích:

B: 1.56 ng/mL, C: 3,12 ng/mL, D: 6.25 ng/mL, E: 12.5 ng/mL, F: 25.0 ng/mL

Obsahují bez-rtuťový konzervant

Kalibrátory (standardy) jsou kalibrovány proti WHO 96/670.

4. **Spodní & Horní kontrola:** reagentie připraveny k použití, 2 vialky, 0.50 mL každá. Pro hodnoty kontrol, viz prosím certifikát analýzy.
Obsahuje bez-rtuťový konzervant.
5. **Enzymový konjugát:** reagentie připraveny k použití (12 mL), modrá kapalina v láhvi s bílým uzávěrem, anti-PSA protilátka navázaná na křenovou peroxidázu; obsahuje bez-rtuťový konzervant.
6. **Roztok substrátu:** : reagentie připravena k použití (12 mL) v láhvi se žlutým uzávěrem, obsahuje TMB.
7. **Zastavovací roztok:** (14 mL) bezbarvá kapalina v láhvi s červeným uzávěrem obsahuje kyselinu sírovou; vyhněte se kontaktu se zastavovacím roztokem. Může způsobit podráždění kůže nebo popáleniny.

5. POTŘEBNÉ, ALE NEDODÁVANÉ MATERIÁLY

- Přesné mikropipety (objem: 25 µL a 100 µL) s jednorázovými spíčkami.
- Destilovaná voda
- ELISA fotometr se 450 nm a 630 nm filtry.
- Stopky s rozsahem 60 minut nebo delším
- Promývačka mikrotitračních destiček
- Vortex nebo podobné míchací zařízení
- Nádobka pro správnou manipulaci s odpadem a vzorky po jejich použití

6. SKLADOVÁNÍ A STABILITA

- Kit a jeho součásti skladujte při 2-8 °C
- Alespoň 30 minut před použitím přiveďte na pokojovou teplotu (18-25 °C). Po použití vraťte opět do lednice. Vyhněte se delšímu skladování při pokojové teplotě.
- Nepoužívejte kit nebo jeho součásti po datu expirace. Pro datum expirace původního balení viz označení kitu.
- Láhve okamžitě po použití zavírejte.
- Destičku spolu s desikantem skladujte v dodávaném sáčku s rychlouzávěrem. Moduly, které se nepoužijí, musí být pořád skladovány tímto způsobem.
- Zabezpečte, aby součásti kitu nezamrzly.
- Otevřené kity si udržují aktivitu po dobu 2 měsíců, pokud jsou skladovány podle výše uvedeného popisu.

7. OPATŘENÍ

- ELISA kity jsou pouze pro in vitro diagnostické použití odborníky.
- Se vzorky séra a plazmy je třeba zacházet jako s potencionálně infekčním materiálem. Při manipulaci se vzorky noste rukavice a vhodný laboratorní oděv. V prostorech, kde se pracuje se vzorky nebo reagentiemi kitu nejzte, nepijte ani nekuřte. Nepipetujte ústy. V případě styku s pokožkou umyjte germicidní mýdlem a dostatečným množstvím vody. v případě potřeby vyhledejte lékařskou pomoc.
- PSA kalibrátory a kontroly jsou lidského původu. Byly testovány a shledány negativní na HIV, HBsAg a HCV. Nicméně, se všemi kalibrátory je třeba zacházet jako s potencionálně biologicky nebezpečnými.

- Kvůli potenciaálně infekčnímu charakteru vzorků a součástí kitu musí být všechny materiály, které přišly s nimi do kontaktu sterilizovány a likvidovány podle místních nařízeních. Týká se to také kapalného odpadu.
- Reagencie analýzy obsahují konzervanty, TMB, H₂O₂ nebo kyselinu sírovou a mohou být škodlivé po požití. Je třeba se vyhnout přímému styku s pokožkou nebo sliznicemi. V případě styku s pokožkou důkladně umyjte vodou a v případě potřeby vyhledejte lékařskou pomoc.
- Zastavovací roztok obsahuje H₂SO₄. Protože H₂SO₄ použita pro ukončení barevné reakce je korozivní, musí být instrumentace použita k jejímu dávkování důkladně čištěna.
- Nevyměňujte reagencie z různých šarží nebo od různých dodavatelů.
- Zabraňte přenosu reagentů nebo vzorků používáním nových špiček pro roztoky a vzorky.
- Nepoužívejte testovací kit, pokud byly sáček s rychlouzávěrem nebo láhve porušeny.

8. POKYNY PRO ODBĚR, PŘÍPRAVU A SKLADOVÁNÍ VZORKU

8.1 Odběr vzorku

Vzorky krve jsou odebírány ze žíly. Protože různé faktory mohou ovlivnit hladinu PSA v krvi, musí se lékař ujistit, že pacient se vyvaruje následujících stavů před odběrem krve:

Následující podmínky mohou zvýšit hladiny PSA:

- Cyklistika
- Sexuální styk (ejakulace)
- Manipulace prostaty během lékařského vyšetření jako je DRE, trans-rektální prostatický ultrazvuk atd.
- Prostatitida
- Dysfunkce jater

Následující stavy mohou vést k poklesu hladin PSA

- Příjem 5-alfa-reduktázových inhibitorů, antiandrogenů nebo analogů GnRH

8.2 Příprava vzorku

Příprava vzorku séra nebo plazmy se vykonává podle standardních technik. Sérum nebo plazma by měly být připraveny co nejdříve jak je to možné, aby se zabránilo hemolýze a zvýšila se stabilita PSA.

8.3 Skladování vzorků

Pro analýzu je možné použít buď vzorky čerstvého séra nebo plazmy. Pokud se nepoužijí okamžitě, mohou být skladovány při 2-8 °C jeden týden. V případě delšího skladování vzorky zamrazte na -20 °C. Je třeba se vyhnout opakovanému zmrazování a rozmrazování vzorků.

Poznámka:

- Vysoce lipemické nebo hemolytické vzorky mohou poskytovat nesprávné analytické výsledky.
- Vzorky musí být bez mikrobiální kontaminace
- Vzorky obsahující vysoké titry revmatoidních faktorů a lidských protilátek proti lidským protilátkám (HAMA) mohou dávat nesprávné výsledky.

9. POSTUP TESTU

Poznámka: Důrazně se doporučuje vykonávat všechna měření v duplikátech. Pro každou sadu měření je třeba vytvořit nezávislou standardní křivku. Pro nejlepší výsledky je důležité, aby se roztoky přidávaly pořád v stejném pořadí pro minimalizaci variací inkubační doby.

1. Před použitím přiveďte všechny reagenty, kalibrátory, kontroly a vzorky na pokojovou teplotu (18-25 °C).
2. Zkontrolujte, zda jsou všechny komponenty v expirační době a zda láhve a destička (včetně sáčku) nejsou poškozeny.
3. Nastavte potřebné mikrotitrační jamky. Myslete na to, že všechna měření je třeba vykonat v duplikátech. Zaznamenejte pozici jamek a příslušných vzorků, kalibrátorů a kontrol pro pozdější identifikaci. Jakékoli nepoužité mikrotitrační proužky vložte zpět spolu s desikantem do sáčku s rychlouzávěrem, sáček zavřete a skladujte při 2-8 °C.
4. Do každé jamky napipetujte 25 µL kalibrátorů, kontrol nebo vzorků. Vzorky s očekávanou hodnotou vyšší jako 25 ng/mL je třeba zředit rozpouštědlem vzorků.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
a	SA	SE	P1									
b	SA	SE	P1									
c	SB	SF	P2									
d	SB	SF	P2									
e	SC	C1	P..									
f	SC	C1	P..									
g	SD	C2										
h	SD	C2										

Kalibrátor	Konc. ng/mL	Pro přesné hodnoty viz štítky označení
SA	0.0	
SB	1.56	
SC	3.12	
SD	6.25	
SE	12.50	
SF	25.00	

5. Inkubujte 5 minut při pokojové teplotě (18-25 °C).
6. Do každé jamky přidejte 100 µL enzymového konjugátu.
7. Zamíchejte pohybováním destičky na stole (10 sekund).
8. **Inkubujte 1 hodinu při pokojové teplotě (18-25 °C).**
9. Odstraňte roztoky z jamek nasáním kapaliny nebo její dekantací. Při dekantaci destičku oklepejte o absorpční papír pro odstranění zbytkové kapaliny.
10. Pro promývání naplňte destičku destilovanou vodou a vyčkejte 15 sekund před odstraněním destilované vody; promyjte 5 až 6 krát.
Doporučujeme následující postup: jamky promyjte 6-krát 250 µL destilované vody. Nejlépe použijte automatický postup promývání, resp. zabezpečte, aby byl promývací roztok v každé jamce stejnou dobu. Je to nezbytné pro získání co nejnižších hodnot variačního koeficientu!
11. Do každé jamky napipetujte 100 µL roztoku substrátu.
12. **Inkubujte 20 minut při pokojové teplotě (18-25 °C).**
13. Přidejte 100 µL zastavovacího roztoku (ve stejném pořadí jako roztok substrátu).
14. Změřte absorbanci při 450 nm (blankování při 630 nm).

9.1 Výpočet výsledků

1. Vypočtete průměrnou hodnotu absorbance každou sadu standardů, kontrol a patientských vzorků.
2. Pomocí lineárního papíru pro kreslení grafů sestrojte standardní křivku vynesením absorbance získané z každého standardu proti jeho koncentraci s hodnotami absorbance na vertikální ose (Y) a koncentracemi na horizontální ose (X).
3. S použitím průměrné hodnoty absorbance pro každý vzorek stanovte příslušnou koncentraci ze standardní křivky.
4. Automatická metoda: Výsledky v návodu na použití byly vypočteny automaticky s použitím 4 PL (4 parametrické logistické) proložení křivky. 4 parametrické logistické metoda je preferovanou metodou. Jiné funkce redukce dat mohou dávat mírně odlišné výsledky.
5. Koncentraci vzorků je možné odečíst přímo z této standardní křivky. Vzorky s koncentracemi vyššími jako je hodnota nejvyššího standardu je třeba dále zředit nebo je oznamovat jako > 25 ng/mL. Při výpočtu koncentrace je třeba potom zohlednit tento faktor ředění.

9.2 Příklad typické kalibrační křivky

Následující údaje jsou pouze pro demonstraci a **není** možné je použít pro výpočet údajů při analýze.

Standard	Optické jednotky (450 nm)
Nulový standard (0 ng/mL)	0.05
Standard 1 (1.56 ng/mL)	0.24
Standard 2 (3.12 ng/mL)	0.39
Standard 3 (6.25 ng/mL)	0.74
Standard 4 (12.5 ng/mL)	1.27
Standard 5 (25.00 ng/mL)	2.01

10. KONTROLA KVALITY

- Doporučuje se použití interních kontrol během každé analýzy v duplikátech. Výsledky kontrol by měly vyjít v určeném rozmezí a měly by preferenčně představovat nízké, střední a vysoké koncentrace.
- Riziko pro pacienta představují hlavně falešně negativní výsledky kolem hraniční hodnoty (cut-off) PSA < 4 ng/mL. Proto se důrazně doporučuje validovat kit a laboratoř pomocí externích zkoušek (např. DGKC)

11. OČEKÁVANÉ HODNOTY

Obecně doporučená hraniční hodnota pro následující zkoumání je:

Cut-off hodnota: 3.0 – 4.0 ng/mL PSA

Zdraví muži mají většinou koncentraci PSA nižší jako 4.0 ng/mL. Pokud je koncentrace PSA rovná nebo vyšší jako 4.0 ng/mL, jsou důrazně doporučovány další vyšetření. Tato koncentrace PSA naznačuje zvýšené riziko rakoviny prostaty, ale může být také způsobena BPH.

PSA

Mějte na paměti prosím, že hraniční hodnota 4 ng/mL je pouze doporučená hodnota. V literatuře se uvádí, že může být vhodné tuto hodnotu upravit podle věku a etnického pozadí, např. pro mladší muže má být hraniční hodnota nižší jako pro starší muže. Pokud je to možné, doporučuje se pro každou laboratoř, aby si zavedla vlastní specifické hodnoty, které berou v úvahu populaci vlastní oblasti, ve které se laboratoř nachází.

Je důležité mít na paměti, že některé tumory prostaty nezpřičinují zvýšené hladiny PSA, takže měření PSA by neměla nikdy nahradit DRE ale měla by se používat ve spojení s DRE.

Protože zvýšené hladiny PSA mohou být také zapříčiněny nerakovinovými stavy, **další testy** mohou zkoušet zvýšit diagnostickou specificitu hodnot t-PSA. V literatuře jsou diskutovány hustota PSA, rychlost PSA, a poměr f-PSA k t-PSA pro zlepšení rozlišení mezi rakovinovými a nerakovinovými stavy a mohou být použity pro snížení nepotřebných biopsií prostaty. Ale pouze biopsie prostaty může definitivně prokázat, zda je karcinom prostaty přítomen nebo ne.

Poznámka: Hodnoty PSA mohou být použity pouze k určení rizika rakoviny. Měly by být pořád interpretovány ve spojení s jinými klinickými nálezy a neměly by být použity jako jediné kritérium pro diagnostiku rakoviny prostaty.

12. CHARAKTERISTIKY ČINNOSTI

12.1 Limit detekce

Limit detekce kitu je 0.2 ng/mL.

12.2 Preciznost

Byla stanovena preciznost v rámci analýzy a mezi analýzami změřením třech patientských sér s různými koncentracemi PSA. Výsledky jsou uvedeny v tabulkách 1 a 2.

Tabulka 1: Preciznost v rámci analýzy

Pacienti	Počet replikátů	průměrná ng/ml	SD ng/ml	CV %
1	24	12.52	0.65	6.0
2	24	3.44	0.13	3.9
3	32	0.83	0.07	8.8

Tabulka 2: Preciznost mezi analýzami

Pacienti	Počet replikátů	průměrná ng/ml	SD ng/ml	CV %
1	4	12.52	0.65	6.0
2	4	3.44	0.13	3.9

12.3 Výtěžnost

Znamé množství PSA bylo přidáno do tří patientských sér a byly změřeny získané hodnoty. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 3.

Tabulka 3: Výtěžnost

Vzorek	Očekávaná hodnota (ng/mL)	Změřená hodnota (ng/mL)	SD ng/ml	Výtěžnost
1	6.30	6.40	0.65	100
2	4.67	4.56	0.13	98
3	10.10	10.91	0.07	108

12.4 Specificita

Protilátky použité v tomto kitu jsou vysoce specifické pro celkový PSA (volný PSA & komplex PSA-ACT) s relativně nízkou křížovou reaktivitou k jiným proteinům a polypeptidům, lipidům nebo chemoterapeutickým látkám přítomným u pacientů.

Tabulka 4: Specificita

Antigeny	Přidané množství	Křížová reaktivita
Proteiny	10 µg/mL	Ne
AFP	10 µg/mL	Ne
CEA	10 µg/mL	Ne
HCG	10 µg/mL	Ne
Laktalbumin	10 µg/mL	Ne
PAP	1 µg/mL	Ne
Interferující látky		
Bilirubin	0.2 mg/mL	Ne
Hemoglobin*	0.1 mg/mL	Ne
Triglyceridy	15 mg/mL	Ne
Chemoterapeutické látky		
Cyklofosfamid	800 µg/mL	Ne
Doxorubicin * HCl	20 µg/mL	Ne
Diethylstilbestrol	2 µg/mL	Ne
Flutamid	10 µg/mL	Ne
Metotrexát	50 µg/mL	Ne

* při vyšších koncentracích dává hemoglobin příliš vysoké hodnoty OD, proto je třeba se vyhnout hemolytickým vzorkům

12.5 Hook efekt vysoké dávky

Analýza byla testována pro hook efekt vysoké dávky. Až do koncentrací PSA 2000 ng/mL nebyl pozorován žádný hook efekt. Povšimněte si, že pokud je hodnota OD mimo standardního rozsahu pro vysoce koncentrované vzorky, musí být vzorek pro získání správných výsledků před měřením zředěn.

12.6 Korelace

Elisa pro celkový PSA byla porovnána s Roche ElecSys total PSA:

$$Y = 0.9644x + 0.0741$$

V druhé studii byla Elisa pro celkový PSA porovnána s jinou CE registrovanou PSA ELISOU:

$$Y = 1.001x, R^2 = 0.9704$$

12.7 Kalibrace

Elisa pro celkový PSA je kalibrována proti WHO Standardu 96/670

13. PRÁVNÍ ASPEKTY

13.1 Spolehlivost výsledků

Test musí být vykonán přesně podle pokynů k použití výrobce. Dále musí uživatel důsledně dodržovat pravidla GLP (správné laboratorní práce) nebo jiné použitelné národní standardy a/nebo zákony. Je to zvláště důležité pro použití kontrolních reagensů. Je důležité během postupu testu pořad zahrnout dostatečný počet kontrol pro validaci přesnosti a preciznosti testu.

Výsledky testu jsou platné, pouze pokud jsou všechny kontroly v rámci specifických rozsahů a pokud všechny jiné parametry testu v rámci daných specifikací metody. V případě jakýchkoli pochybností nebo obav kontaktujte prosím svého lokálního distributora.

13.2 Terapeutické důsledky

Terapeutické důsledky nemají být nikdy založeny pouze na laboratorních výsledcích, i když jsou všechny výsledky ve shodě s položkami uvedenými nahoře. Jakýkoli laboratorní výsledek je pouze částí celkového klinického obrazu pacienta.

Pouze v případech kde jsou laboratorní výsledky v přijatelné shodě s celkovým klinickým obrazem pacienta, měly by být vyvozovány terapeutické důsledky.

Samotný výsledek testu by neměl být jediným determinanem pro odvození jakýchkoli terapeutických důsledků.

13.3 Odpovědnost

Jakákoli změna testovacího kitu a/nebo výměna nebo smíchání jakýchkoli složek různých šarží z jednoho kitu do jiného může negativně ovlivnit očekávané výsledky a platnost celého testu. Taková úprava a/nebo výměny zneplatní jakýkoli nárok na výměnu.

Nároky podány kvůli nesprávné interpretaci laboratorních výsledků zákazníkem jsou také neplatné. Přesto, v případě jakéhokoli nároku, nepřesahuje odpovědnost výrobce hodnotu kitu. Jakékoli poškození testovacího kitu během přepravy nepodléhá odpovědnosti výrobce.

LITERATURA

1. Fritsche H.A. a R.J. Babalian, Clin Chem (1993) Vol. 39: 1529-1529: Analytical performance goals for measuring prostate-specific antigen.
2. Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaft (AWMF): Leitlinien der Deutschen Urologen: PSA-Bestimmung in der Prostatakarzinomdiagnostik (2003) <http://www.uni-duesseldorf.de/WWW/AWMF/II/urol-36v.htm> (Stand Juli 2003).
3. Hammerer P a Huland H., Der Onkologe (1996), Vol. 2: 218-223: Früherkennung des Prostatakarzinoms. Onkologe.
4. Milford Ward A et al., Ann Clin Biochem (2001) Vol. 38: 633-651: Prostate specific antigen: biology and available commercial assays.
5. Price C.P. et al., Ann Clin Biochem (2001), Vol. 38: 188-216: Pre-and post-analytical factors that may influence use of serum prostate specific antigen and its isoforms in a screening programme for prostate cancer.
6. Lange P. et al., J. Urol. (1989) Vol. 141: 873: The value of serum prostate-specific antigen determinations before and after radical prostatectomy.
7. Akdas et al., J. Urol. (1989) Vol. 79: 920-923: The role of free prostate specific antigen in the diagnosis of prostate cancer.
8. Thomas L. (2008), Labor und Diagnose, TH-Books Verlagsgesellschaft 1342-1351.

POUŽITÉ SYMBOLY

IVD

In vitro diagnostický kit

Cont.

Obsah

LOT

Číslo šarže



Nevystavujte slunečnému světlu



Datum expirace



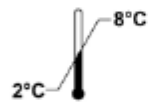
Teplota skladování



Důsledně si přečtěte pokyny k použití

PSA

ELISA



DIALAB
www.dialab.at



DIALAB Produktion und Vertrieb von chemisch – technischen Produkten
und Laborinstrumenten Gesellschaft m.b.H.
A – 2351 Wiener Neudorf, Austria, IZ-NÖ Süd, Hondastrasse, Objekt M55
Phone: ++43 (0) 2236 660910-0, Fax: ++43 (0) 2236 660910-30
e-mail: office@dialab.at