

PATHOZYME[®] PROSTATE SPECIFIC ANTIGEN **Ref** OD327

Immunoenzymatyczny test (EIA) do wykrywania PSA w ludzkiej Surowicy. Przechowywać w temp. 2°C - 8°C. NIE ZAMRAŻAĆ. Do diagnostyki "in vitro".

WPROWADZENIE

Ludzki, specyficzny antygen prostaty (PSA) wykazujący aktywność proteazy serynowej, zbudowany jest z pojedynczego łańcucha glikoproteinowego o masie cząsteczkowej ok. 34,000 daltonów i 7% zawartości reszty glikozydowej. PSA jest związkiem immunologicznie specyficznym dla tkanki gruczołu krokowego. Związek ten występuje również w prawidłowych, łagodnych, rozrostowych i złośliwych tkankach gruczołu krokowego, a także w przerzutach nowotworów prostaty oraz w płynie sterczowym i w nasieniu. PSA nie występuje w żadnych innych prawidłowych tkankach pozyskiwanych od mężczyzn, ani nie jest produkowane przez inne nowotwory, np.: piersi, płuc, okrężnicy, odbytu, żołądka, trzustki lub tarczycy. Funkcjonalnie lub immunologicznie jest różny od kwaśnej fosfatazy sterczowej (PAP). Podwyższone stężenie PSA w surowicy obserwuje się u pacjentów z nowotworem prostaty, łagodnym rozrostem prostaty lub w stanach zapalnych innych, przyległych tkanek układu moczowo-płciowego. Nie stwierdzono podwyższonego stężenia PSA u ewidentnie zdrowych mężczyzn, u mężczyzn z innymi, niesterczowymi nowotworami, u zdrowych kobiet i u kobiet z nowotworami. Z doniesień naukowych wynika, że PSA jest najczęściej używanym markerem wykorzystywanym w onkologii. PSA może służyć jako dokładny znacznik do oceny zastosowanej terapii u pacjentów z nowotworem prostaty. Dlatego pomiar stężenia PSA w surowicy może być ważnym czynnikiem wykorzystywanym do monitorowania efektywności potencjalnego i faktycznego zabiegu chirurgicznego lub zastosowanej innej terapii. Aktualne doniesienia wskazują, że oznaczanie PSA może być rówie wykorzystywane do wczesnego wykrywania nowotworu prostaty w połączeniu z badaniem palpacyjnym per rectum.

PRZEZNACZENIE

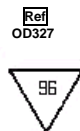
PATHOZYME PSA jest testem, w którym wykorzystano metodę immunoenzymatyczną (EIA) do ilościowego oznaczenia poziomu Specyficznego Antygenu Prostaty (PSA) w ludzkiej surowicy. Do użytku w laboratorium.

ZASADA TESTU

Kubeczki mikropyłki opłaszczane są specyficznymi, króliczymi przeciwciałami anti-PSA. Do testu należy użyć surowicy, która na wstępie jest inkubowana z buforem fosforanowym. Następnie dodawane są monoklonalne przeciwciała anti-PSA znakowane peroksydazą chrzanową (koniugat enzymatyczny). PSA obecne w surowicy badanego pacjenta wiąże się z przeciwciałami opłaszczonymi na ściankach kubeczka. Dodany do kubeczka koniugat enzymatyczny, również ulega przyłączeniu, tworząc tzw. kanapkę. Po inkubacji, nadmiar koniugatu zostaje odpłukany. Dodanie substratu (TMB) inicjuje reakcję barwną, która pojawia się w tych kubeczkach, w których obecny jest związany koniugat enzymatyczny, wskazujący na obecność PSA w badanej próbce. Zatrzymanie reakcji enzymatycznej następuje po dodaniu rozcieńzonego kwasu solnego, a pomiar absorbancji dokonywany jest przy długości fali 450 nm. Stężenie PSA jest wprost proporcjonalne do intensywności powstałego zabarwienia.

Test został wykalibrowany względem wewnętrznego standardu. Nie ma międzynarodowego wzorca dla tego testu.

SKŁAD ZESTAWU



Microtitre Plate				12 X 8 wells x 1
Dzielną mikropyłką z kubeczkami opłaszczonymi koziimi anti- PSA przeciwciałami umieszczoną w foliowej torebce ze środkiem pochłaniającym wilgoć.				
Cal	A	0ng/ml	1 ml	
Standard referencyjny: ludzka surowica pozbawiona PSA. Gotowy do użycia. (Bezbarwny)				
Cal	B	2ng/ml	1ml	
Standard referencyjny: PSA rozpuszczone w ludzkiej surowicy. Gotowy do użycia. (Bezbarwny)				
Cal	C	4ng/ml	1 ml	
Standard referencyjny: PSA rozpuszczone w ludzkiej surowicy. Gotowy do użycia. (Bezbarwny)				
Cal	D	15ng/ml	1 ml	
Standard referencyjny: PSA rozpuszczone w ludzkiej surowicy. Gotowy do użycia. (Bezbarwny)				
Cal	E	60ng/ml	1 ml	
Standard referencyjny: PSA rozpuszczone w ludzkiej surowicy. Gotowy do użycia. (Bezbarwny)				
Cal	F	120ng/ml	1 ml	
Standard referencyjny: PSA rozpuszczone w ludzkiej surowicy. Gotowy do użycia. (Bezbarwny)				
Conj				11ml
Anti-PSA HRP Koniugat: koniugat anti-PSA zawierający monoklonalne przeciwciała znakowane HRP. Gotowy do użycia. (Różowy)				
Buf	AS	7ml		
Bufor fosforanowy zawierający stabilizatory białkowe. Gotowy do użycia. (Zielony)				
Subs	TMB	11ml		
Roztwór substratu: 3,3', 5,5' etrametlobenzydyna w buforze octanowym. Gotowy do użycia. (Bezbarwny)				
Soln	Stop	HCl	1M	11ml
Odczynnik zatrzymujący reakcję: kwas solny rozcieńczony w czystej wodzie. Gotowy do użycia. (Bezbarwny)				
Instrukcja i druk protokołu.				1 + 1

MATERIAŁY WYMAGANE DO WYKONANIA OZNACZENIA, NIE ZAŁĄCZONE DO ZESTAWU

Pipety: 100µl, 200µl i 1000µl.
Końcówki do pipet.
Papier absorbacyjny.
Czynnik mikropyłek z filtrem 450 nm.
Papier milimetrový.
Dokładnie umyte szkło laboratoryjne.

ŚRODKI OSTROŻNOŚCI

Zestaw **PATHOZYME PSA** zawiera materiał pochodzenia ludzkiego. Wykonano badania na obecność przeciwciał HCV, HIV 1 i 2 – wynik negatywny oraz HBsAg zgodnie z zatwierdzonymi przez FDA procedurami. Ponieważ żadne znane procedury nie dają całkowitej pewności, iż pozyskany materiał pochodzenia ludzkiego nie zawiera innych czynników zakaźnych, produkt należy traktować jako potencjalnie zakaźny i zaleca się obchodzić z nim ze szczególną ostrożnością i uwagą. Zaleca się również zachowanie środków ostrożności przy wykonywaniu oznaczenia traktując wszystkie odczynniki jako potencjalnie zakaźne. Nie spożywać.

Zestaw **PATHOZYME PSA** nie zawiera substancji niebezpiecznych sklasyfikowanych przez aktualne, brytyjskie regulacje dotyczące substancji chemicznych. Jednakże zaleca się aby wszystkie odczynniki traktować jako potencjalny materiał niebezpieczny. Wszystkie zalecenia muszą być zgodne z lokalnymi rozporządzeniami.

Zestaw **PATHOZYME PSA** zawiera rozcieńczony kwas solny jako odczynnik zatrzymujący reakcję – środek żrący. Używać z zachowaniem środków ostrożności. W przypadku kontaktu płukać obficie wodą.

Odczynniki wchodzące w skład zestawu **PATHOZYME PSA** zawierają 1% Proclin[™] 300* jako konserwant, który może być środkiem toksycznym jeśli zostanie spożyty. W przypadku kontaktu płukać obficie wodą i udać się po pomoc medyczną.

*Proclin[™] 300 jest chroniony znakiem towarowym firmy ROHM & HAAS Limited.

PRZECHOWYWANIE

Odczynniki muszą być przechowywane w temperaturze 2°C - 8°C.

Test będzie spełniał standardy jakości podane w specyfikacji do końca daty ważności, która jest podana na zestawie i poszczególnych składnikach. Data ważności to ostatni dzień miesiąca podany na buteleczce i etykiecie zestawu. Nie używać odczynników przeterminowanych.

Nie poddawać odczynników działaniu zbyt wysokiej temperatury. Unikać wystawiania na bezpośrednie działanie światła słonecznego.

NIE ZAMRAŻAĆ ODCZYNNIKÓW (z wyjątkiem standardów) – zamrożenie powoduje nieodwracalny rozkład.

PRZYGOTOWANIE I PRZECHOWYWANIE PRÓBK

Pobrać próbkę krwi żyłnej, odstawić do wykrzepnięcia i oddzielenia surowicy. Odwirować wykrzepioną krew i odciągnąć surowicę. Zaleca się używać świeżą surowicę.

Nie używać do badania próbek zhemolizowanych, mętnych lub lipemicznych, powyższe może fałszować wyniki.

Próbki mogą być przechowywane do 48 godzin w temperaturze 2°C - 8°C. W przypadku dłuższego przechowywania, próbkę zamrozić w temp. - 20°C (możliwość przechowywania do 1 roku). Rozmrożoną próbkę wymieszać przed wykonaniem oznaczenia.

Nie używać azydku sodowego jako konserwantu, może hamować aktywność enzymu peroksydazy.

Unikać wielokrotnego zamrażania i rozmrażania próbek, powyższe może fałszować wyniki.

PRZYGOTOWANIE ODCZYNNIKÓW

Przed użyciem wszystkie odczynniki doprowadzić do temperatury pokojowej (20°C - 25°C) i delikatnie wymieszać. Unikać spienienia.

OGRANICZENIA

Test jest nieważny jeżeli do badania użyto innego materiału niż surowica. Żadna modyfikacja procedury nie jest dozwolona. Interpretacja uzyskanych wyników powinna być przeprowadzona w oparciu o wywiad lekarski. Diagnostyka nie może być oparta wyłącznie o jedno badanie kliniczne.

PROCEDURA

- Przed wykonaniem oznaczenia wszystkie odczynniki i próbki badane doprowadzić do temperatury pokojowej (20°C - 25°C).
- Do każdej serii badań należy nastawić nową krzywą kalibracyjną. Umieścić odpowiednią ilość kubeczków w ramce mikroplastyki. Zanotować pozycje standardów i próbek badanych na druku protokołu załączonym do zestawu.
- Nie używane kubeczki umieścić w szczelnie zamkniętej foliowej torebce ze środkiem pochłaniającym wilgoć i ponownie włożyć do lodówki (2°C - 8°C).
- Do odpowiednich kubeczków odpipetować po 50µl standardów i próbek badanych.
- Do każdego kubeczka dodać po 100µl buforu.
- Mieszać delikatnie przez 30 sekund. Ten etap jest ważny dla procedury.
- Inkubować 60 minut w temperaturze pokojowej (20°C - 25°C).
- Po zakończeniu inkubacji wylać zawartość z kubeczków do pojemnika na odpady. Osuszyć kubeczki kładąc je do góry dnem na papierze absorbującym. Upewnić się czy w pojemniku na zlewki znajduje się odpowiedni środek odkażający.
- Ręczne płukanie: napełnić kubeczki wodą destylowaną, do każdego kubeczka nalać minimum 300µl. Wyrząsnąć zawartość z kubeczków do pojemnika na odpady. Osuszyć kubeczki kładąc je do góry dnem na papierze absorbującym. Przemycić puste kubeczki 5-krotnie wodą destylowaną.
- Energicznie uderzać kubeczkami na papierze absorbującym lub papierowym ręczniku, tak aby usunąć resztki wody.
- Płukanie przy użyciu płuczki automatycznej: upewnić się, że płuczka dozuje 300µl płynu na każdy kubeczek oraz czy do pojemnika na zlewki został dodany odpowiedni środek odkażający. Przemycić puste kubeczki 5-krotnie wodą destylowaną. Po zakończeniu płukania usunąć resztki płynu poprzez energiczne uderzenie kubeczkami na papierze absorbującym lub papierowym ręczniku.
- Do każdego kubeczka dodać po 100µl anty-PSA koniugatu i delikatnie mieszać przez 5 sekund.
- Inkubować 60 minut w temperaturze pokojowej (20°C - 25°C).
- Przemycić kubeczki jak podano powyżej.
- Do wszystkich kubeczków dodać po 100 µl roztworu substratu i delikatnie mieszać przez 10 sekund.
- Inkubować 20 minut w ciemnym miejscu w temperaturze pokojowej (20°C - 25°C).
- Zatrzymać reakcję przez dodanie do każdego kubeczka po 100 µl odczynnika zatrzymującego reakcję.
- Delikatnie mieszać przez 30 sekund. Upewnić się, że barwa niebieska całkowicie uległa zmianie na barwę żółtą.
- Natychmiast odczytać wartości absorbancji (w czasie nie dłuższym niż 10 minut) na czytniku mikroplastyki przy długości fali 450 nm.

WYKRYWANIE I USUWANIE BŁĘDÓW

Test jest przeznaczony do użycia przez laboranta z minimum doświadczenia analitycznego.

Nie używać rozłożonych lub zanieczyszczonych odczynników.

Do pipetowania surowic używać jednorazowych końcówek w celu uniknięcia wzajemnego zanieczyszczenia próbek.

Zalecane jest nastawianie kalibratorów i próbek badanych w dubletach, chociaż nie konieczne wymagane.

Próbki badane i kalibratory powinny być pipetowane z zachowaniem jednakowych warunków przeprowadzenia analizy.

Zaleca się nastawianie jednorazowo nie więcej niż 32 kubeczków w przypadku ręcznego pipetowania, pipetowanie standardów i próbek badanych powinno być zakończone w ciągu 3 minut. Nastawienie całej mikroplastyki (96 kubeczków) jest możliwe w przypadku automatycznego pipetowania.

Po użyciu każdego odczynnika natychmiast zamknąć buteleczkę odpowiednią nakrętką.

Unikać wielokrotnego pipetowania (wielokrotnego otwierania) odczynników pobranych z magazynu – może to być przyczyną ich zanieczyszczenia.

Nie mieszać odczynników lub opłaszczonych kubeczków mikroplastyki z różnych zestawów. Zachować szczególną uwagę aby nie dotykać ścian kubeczków w trakcie ich rozdzielania.

Nie dopuścić aby odczynniki podczas pipetowania sływały po ściankach kubeczków. Przed wykonaniem oznaczenia przenieść wszystkie odczynniki do temperatury pokojowej (20°C - 25°C). Delikatnie wymieszać wszystkie odczynniki poprzez delikatne odwracanie lub obracanie.

Raz rozpoczęta procedura powinna być kontynuowana tak, aby podczas wykonywania oznaczenia kubeczki nie zostały wysuszone.

Nie zanieczyszczaj roztworu substratu, może to spowodować, że cały zestaw nie będzie aktywny.

Sprawdź precyzję i dokładność sprzętu laboratoryjnego używanego podczas procedury wykonania oznaczenia tak, aby być pewnym odzwierciedlenia wyników.

Nie używane paski, przed ponownym włożeniem do lodówki (temp. 2°C - 8°C), powinny być szczelnie zamknięte (zamknięcie typu zip-lock) w foliowej torebce ze środkiem pochłaniającym wilgoć

OBLICZANIE WYNIKÓW

Obliczyc średnią wartość absorbancji (A_{450}) dla każdego kalibratora i próbek badanych. Wykreślić krzywą kalibracyjną na papierze milimetrowym odkładając na osi X: stężenia poszczególnych kalibratorów wyrażone w jednostkach ng/ml, a na osi Y: odpowiadające im wartości absorbancji. Z wykresu krzywej kalibracyjnej odczytać wartości PSA dla próbek badanych. Do odczytu użyć wyliczone wartości średnie. Jeżeli wyniki kontroli lub znanych próbek badanych nie dają oczekiwanych wartości test należy uznać za nieważny. Jeżeli do obliczeń używamy aparatury z oprogramowaniem wówczas krzywą kalibracyjną obliczyć w oparciu o krzywą regresji.

WARTOŚCI OCZEKIWANE I CZUŁOŚĆ

Uzyskana krzywa kalibracyjna powinna mieć kształt hiperboliczny zależny proporcjonalnie od uzyskanych wartości absorbancji w stosunku do odpowiednich wartości stężeń kalibratorów. Test można uznać za ważny jeżeli wartość absorbancji kalibratora A jest mniejsza niż 0,75, a wartość absorbancji kalibratora F jest większa niż 1,5.

Stężenie PSA u zdrowych mężczyzn nie powinno przekraczać 4 ng/ml. Minimalne wykrywane testem PATHOZYME PSA stężenie PSA wynosi 0,25 mIU/ml.

Nie stwierdzono wpływu innych czynników na wynik oznaczenia wykonanego powyższym testem do poziomu 1,500 mIU/ml.

OCENA WYNIKÓW

Test kalibrowano względem innych uznanych testów konkurencyjnych oraz względem wewnętrznych standardów. Współczynnik zmienności dla testu PATHOZYME PSA jest mniejszy lub równy 10%.

Dla porównania testów Omega Pathozyme PSA kit i Abbott AxSym PSA kit użyto próbek o wartościach PSA pomiędzy 0.1 a 1410 ng/ml i uzyskano następujące wyniki.

Liczba próbek badanych	161
Współczynnik korelacji	0.987
Wartość nachylenia krzywej	0.958
Punkt przecięcia z osią OY	0.04
Wartość średnia testem Omega	47.72 ng/ml
Wartość średnia testem Abbott	45.78 ng/ml

Dla porównania testów Omega Pathozyme PSA kit i DSL Active PSA kit użyto próbek o wartościach PSA pomiędzy 0.1 a 1320 ng/ml i uzyskano następujące wyniki.

Liczba próbek badanych	161
Współczynnik korelacji	0.993
Wartość nachylenia krzywej	0.951
Punkt przecięcia z osią OY	0.61
Wartość średnia testem Omega	47.72 ng/ml
Wartość średnia testem DSL	45.99 ng/ml

W obu przypadkach testy wykazują dobrą korelację.

PIŚMIENNICTWO

- Hara, M. and Kimura, H. Two prostate specific antigens, gamma-seminoprotein and beta-microseminoprotein. J. Lab. Clin. Med. 113:541-548;1989.
- Yuan, J. J., Coplen, D. E., Petros, J. A., Figneshau, R. S., Ratliff, T. L., Smith, D. S. and Catalona, W. J. Effects of rectal examination, prostatic massage, ultra-sonography and needle biopsy on serum prostate specific antigen levels. J. Urol. 147:810-814;1992.
- Wang, M. C., Papsidero, L. D., Kuriyama, M., Valenzuela, L. A., Murphy, G. P. and Chu, T. M. Prostatic antigen: a new potential marker for prostatic cancer. Prostate 2:89-93;1981.
- Stowell, L. I., Sharnan, I. E. and Hamel, K. An Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for Prostate-specific antigen. Forensic Science Intern. 50:125-138; 1991.
- Frankel, A. E., Rouse, R. V., Wang, M. C., Chu, T. M. and Herzenberg, L. A. Monoclonal Antibodies to a human prostate antigen. Canc. Res. 42:3714;1982.
- Benson, M. C., Whang, I. S., Pantuck, A., Ring, K., Kaplan, S. A., Olsson, C.A and Cooner, W. H. Prostate specific antigen density: a means of distinguishing benign prostatic hypertrophy and prostate cancer. J. Urol. 147:815-816;1992.
- Gorman, C. The private pain of prostate cancer. Time. 10(5):77-80; 1992.
- Walsh, P. C. Why make an early diagnosis of prostate cancer. J. Urol. 147:853-854;1992.
- Labrie, F., Dupont, A., Suburu, R., Cusan, L., Tremblay, M., Gomez, J.-L. and Emond, J. Serum prostate specific antigen as pre-screening test for prostate cancer. J. Urol. 147:846-852; 1992.
- McCarthy, R. C., Jakubowski, H. V. and Markowitz, H. Human prostate acid Phosphatase: purification, characterization, and optimisation of conditions for radioimmunoassay. Clin. Chem. Acta. 132:287-293;1983
- Heller, J. E. Prostatic acid phosphatase: Its current clinical status. J. Urol. 137:1091-1099;1987.
- Fiella, X., Molina, R., Umberto, J. J. B., Bedini, J. L. and Ballesta, A. M. Clinical usefulness of prostate specific antigen. Tumour Biol. 11:289-294; 1990.
- Shin, W. J., Gross, K., Mitchell, B., Collins, J., Wierzbinski, B., Magoun, S. and Ryo, U. Y. Prostate adenocarcinoma using Gleason scores correlates with prostate-specific antigen and prostate acid phosphatase measurements. J. Nat. Med. Assoc. 84:1049-1050; 1992.
- Wirth, M. P. and Frohmuller, H. G. Prostate specific antigen and prostate acid phosphatase in the detection of early prostate cancer and in the prediction of regional lymph node metastases. Eur. Urol. 21:263-268; 1992.
- Campbell, M. L. More cancer found with sensitive PSA assay. Urol. Times. 20:10; 1992.
- Braver, M. K., Chetner, M. P., Beatie, J., Buchner, D. M., Vessella, R. L. and Lange, P.H. Screening for prostatic carcinoma with prostate specific antigen. J. Urol. 147:841-845; 1992.
- Benson, M. C., Whang, I. S., Olsson, C. A., McMahon, D. J. and Cooner, W. H. The use of prostate specific antigen density to enhance the predictive value of intermediate levels of serum prostate specific antigen. J. Urol. 147:817-821; 1992.
- Oesterling, J. E. and Hanno, P. M. PSA still finding niches in cancer diagnosis. Urol. Times. 20:13-18; 1992.
- Babaian, R. J., Fritsche, H. A. and Evans, R. B. Prostate-specific antigen and the prostate gland volume: correlation and clinical application. J. Clin. Lab. Anal. 4:135-137; 1990.
- Vessella, R.L., Noteboom, J. and Lange, P.H. Evaluation of the Abbott IMx Automated Immunoassay of Prostate Specific Antigen. Clin Chem 38: 2044-2054;1992.

SKRÓCONA WERSJA WYKONANIA OZNACZENIA

- Do odpowiednich kubeczków odpipetować po 50µl standardów i próbek badanych. Następnie do każdego kubeczka dodać po 50µl buforu i delikatnie mieszać przez 30 sekund.
- Inkubować 60 minut w temperaturze pokojowej (20°C - 25°C).
- Wylać zawartość z kubeczków i przemycić 5-krotnie wodą destylowaną.
- Do każdego kubeczka dodać po 100µl koniugatu anty-PSA i delikatnie mieszać przez 30 sekund.
- Inkubować 60 minut w temperaturze pokojowej (20°C - 25°C).
- Wylać zawartość z kubeczków i przemycić 5-krotnie wodą destylowaną.
- Do każdego kubeczka dodać po 100µl roztworu substratu i delikatnie mieszać przez 10 sekund.
- Inkubować 20 minut w ciemnym miejscu w temperaturze pokojowej (20°C - 25°C).
- Do każdego kubeczka dodać po 100µl odczynnika zatrzymującego reakcję i delikatnie mieszać przez 30 sekund.
- Natychmiast odczytać wartość absorbancji (w czasie nie dłuższym niż 10 minut) przy użyciu czytnika płytek przy długości fali 450 nm.

8082 ISSUE 6A Revised April 2011
© Omega Diagnostics Ltd., 2011. POLISH



OMEGA DIAGNOSTICS LTD
Omega House, Hillfoots Business Village
Alva, FK12 5DQ, Scotland, United Kingdom
odl@omegadiagnostics.co.uk
www.omegadiagnostics.com
AN ISO 9001 & 13485 CERTIFIED COMPANY