



CanAg PSA EIA

Prod. No. 340-10

Arbeitsanleitung

Enzymimmunoassay Kit

2009-11

Für 96 Bestimmungen

ANWENDUNG

Der CanAg PSA EIA Kit wird eingesetzt für die quantitative Bestimmung des Gesamt-PSA (Prostata-spezifisches Antigen) in humanem Serum.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG DES TESTES

PSA ist ein aus einer Kette bestehendes 32 kDa Glykoprotein, eine Serin-Protease mit einer Chymotrypsin-ähnlichen Spezifität. Es wird ausschließlich im sekretorischen Epithelium der Prostata produziert. (1) PSA wird hauptsächlich in die Samenflüssigkeit sezerniert und spielt eine wichtige Rolle bei der Spaltung von Proteinen in den Samenbläschen und der Verflüssigung von Koagulaten. (2) Im Blut sind normalerweise nur niedrige Konzentrationen an PSA nachweisbar. Ansteigende Serum PSA-Spiegel zeigen pathologische Vorgänge der Prostata an, einschließlich der gutartigen Prostata-Hyperplasie und Prostatakrebs. Die PSA Bestimmung hat sich als anerkannte Methode zur Frühdiagnose von Prostatakrebs und zur Krebsüberwachung etabliert. PSA wird heute als der beste serologische Marker von Prostatakrebs angesehen (3, 8).

PSA bildet stabile Komplexe mit verschiedenen Anti-Proteasen. Der größte Teil des Serum PSA liegt als Komplex mit Alpha-1-Antichymotrypsin (PSA-ACT) vor. (4) Dennoch wurden bei Versuchspersonen erhebliche Abweichungen im Verhältnis zwischen Freiem PSA und PSA-ACT Komplex beobachtet. Neueren Studien zufolge ist der Anteil an Freiem PSA bei gutartiger Prostata Hyperplasie höher als bei Patienten mit Prostatakrebs. (5) Die Antikörper im DRG PSA EIA wurden sorgfältig ausgewählt und getestet. Sie weisen gleiche Spezifität für Freies PSA und für PSA-ACT komplexiertes PSA auf (7). Daher bestimmt der CanAg PSA EIA tatsächlich den equimolaren PSA-Wert der Probe unabhängig von individuellen Variationen im Verhältnis zwischen Freiem und ACT-komplexiertem PSA.

TESTPRINZIP

Der CanAg PSA EIA ist ein nicht-kompetitiver Festphasen-Immunoassay, der auf der direkten Sandwich-Technik basiert. Kalibratoren, Kontrollen und Patientenproben inkubieren gemeinsam mit biotinylierten und Meerrettichperoxidase (HRP)–markierten monoklonalen Anti-PSA Antikörpern in Streptavidin-beschichteten Mikrotiterstreifen.

Nach einem Waschschrift wird ein gepuffertes Substrat-Chromogen-Reagenz (Hydrogenperoxid und 3, 3', 5, 5' Tetra-methylbenzidin) in jede Vertiefung pipettiert. Falls Antigen vorhanden ist, entwickelt sich während dieser Enzymreaktion eine blaue Farbe. Die Intensität der Farbe ist proportional der vorhandenen PSA-Konzentration in der Probe. Die Farbintensität wird mit einem Mikrotiter-Spektralphotometer bei 620 nm gemessen (oder optional nach Zugabe von Stopplösung bei 405 nm).

Für jeden Testansatz wird eine Kalibrationskurve erstellt, indem die Absorptionswerte gegen die Konzentration der Kalibratoren aufgetragen werden. Aus der Kalibrationskurve werden dann die PSA-Konzentrationen der Patientenproben abgelesen.

REAGENZIEN

- Jeder CanAg PSA EIA Kit enthält ausreichend Reagenzien für 96 Bestimmungen.
- Das Verfallsdatum des Kits steht außen auf der Verpackung.
- Keinen Kit nach Ablauf des Verfallsdatums verwenden.
- Keine Reagenzien von verschiedenen Kit-Lots verwenden.
- Kit bei 2–8°C lagern. Nicht einfrieren.
- Geöffnete Reagenzien sind stabil entsprechend der folgenden Tabelle. Vorausgesetzt sie sind nicht kontaminiert, werden in den wieder verschlossenen Originalbehältern gelagert und wie in der Anleitung beschrieben behandelt. Sofort nach Gebrauch wieder bei 2–8°C lagern.

Bestandteil	Menge	Lagerung und Stabilität nach dem ersten Öffnen
MICROPLA Streptavidin-Mikroplatte	1 Platte	2–8°C, bis zum auf der Platte angegebenen Verfallsdatum.

12 x 8 Streptavidin-beschichtete Wells . Nicht benötigte Streifen müssen sofort nach dem Öffnen wieder in den Aluminiumbeutel mit Trocknungsmittel gegeben werden. Sorgfältig verschliessen, um die Streifen trocken zu halten.

Bestandteil	Menge	Lagerung und Stabilität nach dem ersten Öffnen
-------------	-------	--

PSA Kalibratoren 6 Fläschchen 2–8°C, bis zum auf den Fläschchen angegeben Verfallsdatum.

CAL	PSA	0	0 µg/L	1 x 0,75 mL
-----	-----	---	--------	-------------

CAL	PSA	1	1 µg/L	1 x 0,75 mL
-----	-----	---	--------	-------------

CAL	PSA	2	2 µg/L	1 x 0,75 mL
-----	-----	---	--------	-------------

CAL	PSA	10	10 µg/L	1 x 0,75 mL
-----	-----	----	---------	-------------

CAL	PSA	30	30 µg/L	1 x 0,75 mL
-----	-----	----	---------	-------------

CAL	PSA	60	60 µg/L	1 x 0,75 mL
-----	-----	----	---------	-------------

Humanes PSA in Tris-HCl-Puffer, enthält Rinderserumalbumin, einen inerten gelben Farbstoff, und 0,01% Methyl-isothiazolon (MIT) als Konservierungsmittel. Gebrauchsfertig.

PSA Kontrollen 2 Fläschchen 2–8°C, bis zum auf den Fläschchen angegeben Verfallsdatum.

CONTROL	PSA	1	1 x 0,75 mL
---------	-----	---	-------------

CONTROL	PSA	2	1 x 0,75 mL
---------	-----	---	-------------

Humanes PSA in Tris-HCl-Puffer, enthält Rinderserumalbumin und 0,01% Methyl-isothiazolon (MIT) als Konservierungsmittel. Gebrauchsfertig.

Bestandteil	Menge	Lagerung und Stabilität nach dem ersten Öffnen
-------------	-------	---

BIOTIN	Anti-PSA
---------------	-----------------

Biotin Anti-PSA	1 x 15 mL	2–8°C, bis zum auf dem Fläschchen angegeben Verfallsdatum.
------------------------	-----------	--

Monoklonaler Maus-Antikörper Biotin Anti-PSA, etwa 1 µg/mL. Enthält Phosphatpuffer (pH 7,2), Rinderserumalbumin, Rinderimmunglobulin, Blockierungsreagenz, Tween 20, einen blauen inerten Farbstoff und 0,01% Methyl-isothiazolon (MIT) als Konservierungsmittel. Gebrauchsfertig.

CONJ	Anti-PSA
-------------	-----------------

Tracer, HRP Anti-PSA	1 x 0,75 mL	2–8°C, bis zum auf dem Fläschchen angegeben Verfallsdatum.
-----------------------------	-------------	--

Stammlösung mit monoklonalem Maus-Antikörper HRP Anti-PSA, etwa 20 µg/mL. Enthält Konservierungsmittel. Vor Gebrauch mit Biotin Anti-PSA verdünnen.

SUBS	TMB
-------------	------------

TMB HRP-Substrat	1 x 12 mL	2–8°C, bis zum auf dem Fläschchen angegeben Verfallsdatum.
-------------------------	-----------	--

Enthält gepuffertes Hydrogenperoxid und 3,3',5,5' Tetra-methylbenzidin (TMB). Gebrauchsfertig.

STOP

Stopplösung	1 x 15 mL	2–8°C, bis zum auf dem Fläschchen angegeben Verfallsdatum.
--------------------	-----------	--

Enthält 0,12 M HCl. Gebrauchsfertig

Bestandteil	Menge	Lagerung und Stabilität nach dem ersten Öffnen
-------------	-------	---

WASHBUF	25X
---------	-----

Waschkonzentrat	1 x 50 mL	2–8°C, bis zum auf dem Fläschchen angegeben Verfallsdatum.
-----------------	-----------	--

Ein Tris-HCl Puffer mit Tween 20. Enthält Germall II als Konservierungsmittel.

Vor Gebrauch 25fach mit Wasser verdünnen.

Anzeichen für Instabilität

Das TMB-HRP-Substrat muß farblos oder nur leicht bläulich gefärbt sein. Eine blaue Farbe zeigt an, dass das Reagenz kontaminiert ist und verworfen werden muß.

WARNUNGEN UND HINWEISE

Nur für In-vitro Diagnostik

- Nur zur Verwendung durch Fachpersonal.
- Bitte beachten Sie die lokalen und nationalen Vorschriften und Richtlinien um die Sicherheit im Labor zu gewährleisten.
- Behandeln Sie alle Patientenproben als potentiell infektiös.
- Befolgen Sie die lokalen Richtlinien für die Entsorgung sämtlicher Abfälle.

Achtung

Alle verwendeten Bestandteile menschlichen Ursprungs sind auf HIV-1/2 Antikörper, HCV Antikörper and Hepatitis B Surface Antigen (HBsAg) nicht-reaktiv getestet worden. Da es zur Zeit keine Testmethoden gibt, die es ermöglichen, das Vorhandensein infektiöser Erreger mit absoluter Sicherheit auszuschließen, sollten alle Reagenzien humanen Ursprungs, einschließlich der Patientenproben, wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.

VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER PROBEN

Im CanAg PSA EIA wird Serum eingesetzt. Trennen Sie nach venöser Blutentnahme das Serum ab. Proben können für 48 Stunden bei 2-8°C gelagert werden. Zur längeren Aufbewahrung müssen die Proben bei -20°C tiefgefroren werden. Die Proben sollten nicht in einem Gefrierschrank mit Abtauautomatik gelagert werden. Tiefgefrorene Proben sollten langsam über Nacht bei 2-8°C aufgetaut und vor dem Testansatz auf Raumtemperatur gebracht werden.

Nach einer Prostata-Untersuchung können erhöhte PSA-Werte erwartet werden. Aus diesem Grund sollte die Blutentnahme vor der digitalen rektalen Untersuchung erfolgen. Nach einem chirurgischen Eingriff an der Prostata, wie z.B. einer Nadelbiopsie oder einer transurethralen Resektion wird empfohlen mindesten

6 Wochen zu warten, bevor eine PSA-Bestimmung durchgeführt wird (8). Es sollte beachtet werden, dass eine Finasteride-Behandlung bei einer BPH zu verringerten PSA-Werten führen kann (8).

DURCHFÜHRUNG

Erforderliche Materialien, die nicht im Kit enthalten sind

1. Mikroplatten-Schüttler

Das Schütteln sollte mittelmäßig bis kräftig erfolgen. Bei Horizontalschüttlern etwa 200 Bewegungen/min, bei Oszillationsschüttlern 700–900/min.

2. Waschautomat für Mikroplatten

Waschen der Platte wahlweise vollautomatisch durch 1 und 6 Waschzyklen, oder mit einer halbautomatischen Mikroplatten-Waschvorrichtung, die an eine Vakuumpumpe oder eine Wasserstrahl-Vakuumpumpe und ein Auffanggefäß für die abgesaugte Flüssigkeit angeschlossen ist. Wird kein automatisches Mikroplatten-Waschgerät eingesetzt, empfiehlt sich die Verwendung des manuellen Waschgerätes Nunc Immuno-8.

3. Mikroplatten-Spektrophotometer

Mit der Wellenlänge 620 nm und/oder 405 nm, und einem Absorptionsbereich von 0 bis 3,0.

4. Präzisionspipetten

Mit verwerfbaren Plastikspitzen um μL -Volumina zu pipettieren. Eine 8-Kanal-Pipette oder Multipette mit verwerfbaren Plastikspitzen für 100 μL ist nützlich aber nicht notwendig. Milliliter-Pipetten.

5. Destilliertes oder deionisiertes Wasser

Für die Herstellung der Waschlösung.

Anmerkungen zur Testdurchführung

1. Um die korrekte Durchführung des CanAg PSA EIA Kits zu gewährleisten ist das vollständige Verständnis dieser Packungsbeilage notwendig. Die Reagenzien dieses Kits sind nur innerhalb dieses Kits zu verwenden. Komponenten aus Kits mit unterschiedlichen Lotnummern dürfen nicht zusammen verwendet werden. Nach Ablauf des Verfallsdatums (außen auf der Verpackung) dürfen die Kit-Reagenzien nicht mehr verwendet werden.
2. Vor Gebrauch müssen die Reagenzien auf Raumtemperatur (20–25°C) gebracht werden. Um gute Ergebnisse zu erzielen sollte der Test nur bei Temperaturen zwischen 20-25°C durchgeführt werden. Aufgetaute Proben müssen sorgfältig und ohne Schaumbildung gemischt werden.
3. Zur eindeutigen Identifizierung der Proben während und nach der Testdurchführung sollten die Mikrotiterstreifen vor Beginn entsprechend beschriftet werden.

4. Die Notwendigkeit effizienten und gründlichen Waschens zur Trennung von gebundenem und ungebundenem Antigen und von Reagenzien aus den an der Festphase gebundenen Antikörper-Antigen-Komplexen ist einer der wichtigsten Schritte in einem EIA. Damit die Effizienz der Waschschrte sichergestellt ist, müssen Sie darauf achten, dass alle Kavitäten bei jedem Waschzyklus bis zum oberen Rand vollständig mit Waschlösung gefüllt werden, dass die Waschlösung angemessen schnell pipettiert wird, dass die Flüssigkeit zwischen und nach den Waschzyklen vollständig aus den Kavitäten abgesaugt wird und dass die Kavitäten leer sind. Sollten noch Flüssigkeitsreste vorhanden sein, drehen Sie die Platte um und klopfen sie vorsichtig auf saugfähigem Papier aus.
 - Automatische Teststreifen-Waschvorrichtung: Halten Sie die Anweisungen des Herstellers zur Reinigung und Instandhaltung genau ein und führen Sie vor und nach jedem Inkubationsschritt die vorgeschriebene Anzahl an Waschzyklen durch. Es wird dringend empfohlen, den Verarbeitungsmodus „Strip“ (Teststreifen) und den Waschmodus „Overflow“ (Überlauf) mit einem Pipettiervolumen von 800 µl zu verwenden. Die Aspirations-/Waschvorrichtung sollte nicht für längere Zeit mit der Waschlösung stehen gelassen werden, da die Nadeln verstopfen könnten, was dazu führt, dass zu wenig Flüssigkeit abgegeben und wieder abgesaugt wird.
5. Für eine ultrasensitive Messung sollte der

CAL	PSA	1
-----	-----	---

 eingesetzt werden. Bitte beachten Sie Option 2 auf Seite 8 für eine ausführliche Anweisung.
6. Das TMB HRP-Substrat kann sehr leicht kontaminiert werden. Für eine optimale Stabilität des TMB HRP-Substrates füllen Sie nur die benötigte Menge in ein sorgfältig gereinigtes Gefäß oder wenn möglich in ein Einmal-Gefäß, um eine Kontamination des Reagenz zu vermeiden. Verwenden Sie nur saubere Einmal-Pipettenspitzen (oder Combitips).
7. Verwenden Sie nur saubere Einmal-Pipettenspitzen und pipettieren Sie Proben und Reagenzien sorgfältig. Vermeiden Sie Verschleppungen indem Sie die Pipette knapp über der Oberfläche des Wells halten und berühren Sie nicht die Mikrotiterstreifen oder die Flüssigkeitsoberfläche. Eine saubere Pipettiertechnik ist besonders wichtig im Umgang mit der TMB HRP-Substratlösung.

Herstellung der Reagenzien	Stabilität der angesetzten Reagenzien
Waschlösung	2 Wochen bei 2–25°C in einem verschlossenen Behälter
Geben Sie 50 mL Waschkonzentrat in ein sauberes Gefäß und verdünnen Sie es 25fach durch Zugabe von 1200 mL destilliertem oder deionisiertem Wasser. Sie erhalten so eine gepufferte Waschlösung.	

Antikörper-Lösung 3 Wochen bei 2–8°C

Stellen sie die benötigte Menge an Antikörper-Lösung her. Mischen Sie dafür pro Streifen 50 µL Tracer, HRP Anti-PSA mit 1 mL Biotin Anti-PSA, (s. Tabelle und Arbeitsprotokoll):

Anzahl der Streifen	Tracer, HRP Anti-PSA (µL)	Biotin Anti-PSA (mL)
1	50	1
2	100	2
3	150	3
4	200	4
5	250	5
6	300	6
7	350	7
8	400	8
9	450	9
10	500	10
11	550	11
12	600	12

Verwenden Sie saubere Plastik- oder Glasgefäße für die Herstellung der Antikörperlösung.

Alternativ: Füllen Sie den Inhalt des Tracer-Fläschchen HRP Anti-PSA in das Fläschchen des Biotin Anti-PSA und mischen Sie sorgfältig. Der gesamte Inhalt des Tracer-Fläschchens muß in das Biotin-Anti-PSA-Fläschchen überführt werden!

Achtung: Die Antikörperlösung ist bei 2-8°C für 3 Wochen stabil. Setzen Sie nicht mehr Lösung an, als Sie in diesem Zeitraum benötigen und sorgen Sie für die richtige Lagerung.

TESTDURCHFÜHRUNG

Alle Kalibratoren und Patientenproben in Doppelbestimmung ansetzen. Für jeden Testansatz sollte eine Kalibrationskurve erstellt werden. Alle Reagenzien und Proben müssen auf Raumtemperatur (20-25°C) gebracht werden.

1. Waschlösung und Antikörperlösung herstellen. Nur saubere Gefäße verwenden und die Anweisungen sorgfältig befolgen.

2. Benötigte Anzahl der Mikrotiterstreifen in den Rahmen einsetzen. (Nicht benötigte Streifen sofort wieder im Aluminiumbeutel mit Trocknungsmittel verschließen). Jeden Streifen einmal mit Waschlösung waschen. Nicht mehr Streifen waschen, als innerhalb von 30 Minuten abgearbeitet werden können.
3. Je 25 µL PSA Kalibrator (CAL 0, 2, 10, 30, 60), Kontrollen (C1, C2) und Patientenproben (Unbekannte-Unk) in die Vertiefungen pipettieren (entsprechend dem folgenden Schema):

	1	2	3	4	5	6	7 etc
A	Cal 0	Cal 60	Unk2				
B	Cal 0	Cal 60	etc				
C	Cal 2	C1					
D	Cal 2	C1					
E	Cal 10	C2					
F	Cal 10	C2					
G	Cal 30	Unk1					
H	Cal 30	Unk1					

4. 100 µL Antikörper-Lösung in jedes Well pipettieren mit einer 100 µL Präzisionspipette (oder 8-Kanal 100 µL Präzisionspipette). Verschleppung vermeiden indem die Pipette knapp über der Oberfläche des Wells gehalten wird. Mikrotiterstreifen oder die Flüssigkeitsoberfläche nicht mit der Pipettenspitze berühren.
5. Inkubieren für 1 Std. (± 5 min) bei Raumtemperatur (20-22°C) und gleichmäßigem Schütteln. Mikroplatten-Schüttler verwenden.
6. Alle Streifen 6mal waschen, entsprechend der Waschanweisung unter "Anmerkungen zur Testdurchführung" Punkt 4.
7. 100 µL TMB HRP-Substrat in jedes Well pipettieren. Gleiche Pipettiersequenz verwenden wie bei Schritt 4. Das TMB HRP-Substrat sollte so schnell wie möglich in jede Vertiefung pipettiert werden. Das Pipettieren vom ersten bis zum letzten Well sollte 5 Min. nicht überschreiten.
8. Inkubieren für 30 min (± 5 min) bei Raumtemperatur und gleichmäßigem Schütteln. Nicht direktem Sonnenlicht aussetzen.
9. Sofort mit einem Mikroplatten-Spektrophotometer die Absorption bei 620 nm ablesen.

Option 1

Solte im Labor kein Mikroplatten-Spektrophotometer mit 620 nm-Filter vorhanden sein, kann die Absorption, wie folgt, bestimmt werden:

100 µL Stopplösung pipettieren, mischen und die Absorption innerhalb von 15 Min. nach Zugabe der Stopplösung bei 405 nm messen.

Option 2

Für eine ultrasensitive PSA-Messung im unteren Bereich (0 – 10 µg/L) sollte

CAL	PSA	1
-----	-----	---

 (1 µg/L) in die Kalibrationskurve mit eingesetzt werden. Die beiden höchsten Kalibratoren (30 und 60 µg/L) sollen dann nicht mit angesetzt werden.

Die Messung soll dann entsprechend Option 1 durchgeführt werden, aber bei 450 nm.

Messbereich

Der CanAg PSA EIA mißt Konzentrationen zwischen 0,1 and 60 µg/L. Werden PSA Konzentrationen oberhalb des Messbereichs erwartet, sollte die Probe vor der Analyse mit normalem männlichen Humanserum verdünnt werden. **ACTUNG:** Die Probe, die zur Verdünnung eingesetzt wird, muss ebenfalls gemessen werden, um die endogene PSA-Konzentration zu bestimmen. (sieh "Berechnung der Ergebnisse").

Qualitätskontrolle

Zur Validierung jeder Testserie sollten die PSA Kontrollen 1 und 2 verwendet werden. Der zu erwartende Kontrollbereich ist auf dem Etikett der Kontrollfläschchen vermerkt. Liegen die Werte außerhalb der spezifizierten Bereiche müssen alle Reagenzien und die Genauigkeit des Mikroplatten-Lesers überprüft werden. Der Test muss wiederholt werden. Jedes Labor kann auch eigene Serumpools mit verschiedenen Bereichen herstellen und als interne Kontrolle verwenden. Damit kann die Präzision des Testansatzes überprüft werden.

Referenzmaterial

Der 1. Internationale Standard 96/670 kann als Referenzstandard eingesetzt werden.

Die Werte für die PSA-Kalibratoren und Kontrollen wurden bestimmt im Vergleich mit einem "In-house"-Referenzstandard-Set, dessen Werte dem 1. Internationalen Standard entsprechen.

BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

Falls ein Mikroplatten-Leser mit integrierter Datenkalkulation verwendet wird, beachten Sie das Handbuch des Gerätes und erstellen Sie ein Programm mit den aktuellen Konzentrationen, die auf jedem CA125-Kalibratorfläschchen aufgedruckt sind.

Für die automatische Kalkulation der CA125 Ergebnisse wird empfohlen eine der folgenden Methoden zu verwenden:

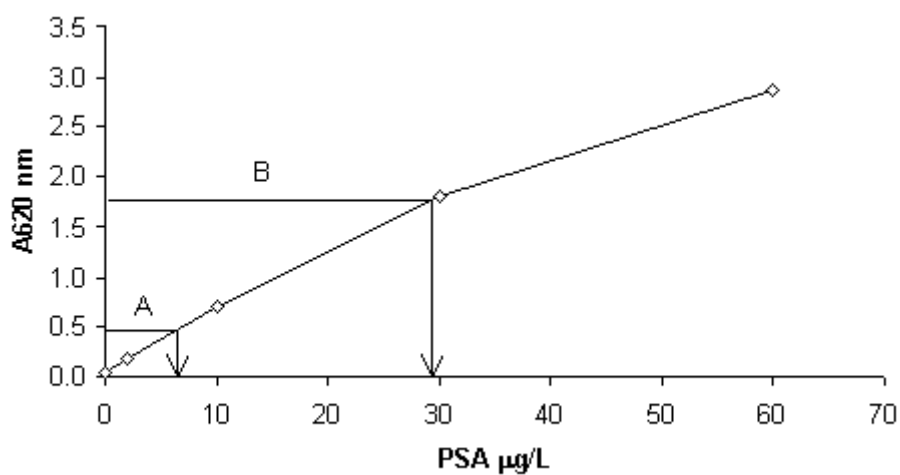
- "Cubic spline curve fit" : Kalibrator 0 sollte mit dem Wert 0 µg/L in die Kurve eingesetzt werden.
- "Spline smoothed curve fit" : Kalibrator 0 sollte als Blank verwendet werden.
- Interpolation mit "Punkt zu Punkt Auswertung": Kalibrator 0 sollte mit dem Wert 0 µg/L in die Kurve eingesetzt werden.
- "Quadratic curve fit" : Kalibrator 0 sollte mit dem Wert 0 µg/L in die Kurve eingesetzt werden.

ACHTUNG: 4-Parameter-Logistik oder lineare Regression sollten nicht angewendet werden.

Zur manuellen Berechnung wird eine Kalibrationskurve erstellt. Die Absorptionswerte (A) für jeden PSA-Kalibrator werden gegen die entsprechende PSA-Konzentration (in $\mu\text{g/L}$) aufgetragen, (s. folgende Abbildung). Zum Ablesen der unbekannt PSA-Konzentration aus der Kalibrationskurve wird der Mittelwert der Absorptionswerte jeder Patientenprobe eingesetzt.

Beispiel

Proben	Kalibrator- werte	Absorptions mittelwert (A)	PSA ($\mu\text{g/L}$)
CAL PSA 0	0 $\mu\text{g/L}$	0,036	
CAL PSA 2	2 $\mu\text{g/L}$	0,174	
CAL PSA 10	10 $\mu\text{g/L}$	0,705	
CAL PSA 30	30 $\mu\text{g/L}$	1,807	
CAL PSA 60	60 $\mu\text{g/L}$	2,864	
Probe A		0,453	6,1
Probe B		1,739	28,6



Beispiel (Tabelle oder Kurve nicht zur Berechnung aktueller Messwerte verwenden).

Berechnung der Ergebnisse bei verdünnten Proben

Proben, für die im ersten Testansatz Werte $> 60 \mu\text{g/L}$ ermittelt wurden, sollten 1/10 mit normalem männlichen Humanserum verdünnt werden um exakte PSA Konzentrationen der Proben zu erhalten.

Achtung: Die Probe, die zur Verdünnung eingesetzt wird, muss ebenfalls gemessen werden, um die endogene PSA-Konzentration zu bestimmen.

Die PSA Konzentration der unverdünnten Probe wird folgendermaßen berechnet:

$$\text{Verdünnung 1/10: } 10 \times ([\text{PSA}]_{\text{Verdünnte Probe}} - (0.9 \times [\text{PSA}]_{\text{Normales männliches Humanserum}}))$$

GRENZEN DER TESTES

Aus der PSA Konzentration ergibt sich keine absolut eindeutige Aussage über das Vorhandensein eines Tumors. Die Testergebnisse sollten nur in Zusammenhang mit den Ergebnissen anderer diagnostischer Methoden interpretiert werden.

Der PSA-Test sollte etablierte klinische Untersuchungen nicht ersetzen.

Die Standards des CanAg PSA EIA Tests sollten nicht verwendet werden für Wiederfindungsstudien. Für Wiederfindungsstudien sollte eine Patientenprobe mit stark erhöhtem PSA verwendet werden.

Humane Anti-Maus-Antikörper (HAMA) oder heterophile Antikörper in der Patientenprobe können möglicherweise mit diesem Test interferieren, obwohl ein spezifisches Blockierungsmittel in den Pufferlösungen enthalten ist.

ERWARTETE WERTE

Gesunde Männer: $< 4 \mu\text{g/L}$

Da die PSA-Werte mit dem Alter steigen, wird empfohlen einen altersabhängigen Referenzbereich zu verwenden. Dadurch kann die Sensitivität bei jungen Männern und die Spezifität bei älteren Männern erhöht werden (6, 8).

Es wird empfohlen, das jedes Labor seinen eigenen Normbereich ermittelt, um regionale Faktoren, wie Diäten, Klima, Lebensbedingungen, Patientenkollektiv, usw. zu berücksichtigen.

TESTCHARAKTERISTIKA

Präzision

Die totale Präzision wurde entsprechend den NCCLS-Richtlinien EP5-A (9) ermittelt. Es wurden 4 Level tiefgefrorener humaner Poolseren verwendet, denen PSA zugesetzt wurde. Außerdem wurden 6 verschiedene CanAg PSA EIA Reagenzkombinationen verwendet. Jede Probe wurde zufällig pipettiert (n=2/Analyse) und über 20 Tage zweimal pro Tag analysiert.

Probe	Replikate	Mittelwert (µg/L)	Intra-assay SD (µg/L)	Intra-assay VK %	Inter-assay SD (µg/L)	Inter-assay VK %
PSA 1	80	1.42	0.04	2.7	0.03	2.2
PSA 2	80	5.92	0.13	2.2	0.06	1.0
PSA 3	80	14.2	0.35	2.5	0.12	0.8
PSA 4	80	39.2	0.60	1.5	0.60	1.5

Nachweisgrenze

Die Nachweisgrenze des CanAg PSA EIA Tests ist < 0,1 µg/L, definiert als die Konzentration entsprechend dem Absorptionsmittelwert des PSA Kalibrator 0 plus 2 Standardabweichungen. Es wurde folgende Formel verwendet:

$$\frac{2 \times \text{SD CAL 0}}{\text{OD CAL 2} - \text{OD CAL 0}} \times 2 \mu\text{g/L}$$

Wiederfindung

Angereicherte Serumproben wurden hergestellt, indem männlichem Normalserum anteilig Serum mit hohen PSA-Konzentrationen zugesetzt wurde. Die Wiederfindung des Antigens lag bei ± 10% der erwarteten Werte.

Achtung: Die Kit-Kalibratoren sollten **nicht** für Wiederfindungsstudien eingesetzt werden.

Hook Effekt

Bei Proben bis zu einer Konzentration von 23000 µg/L wurde kein Hook Effekt festgestellt. **ACHTUNG:**

Bei Proben mit sehr hohen Konzentrationen verändert sich die Farbe des Substrates von blau nach grünlich (und eventuell gelb bei extrem hohen Proben). Dies führt zu einer falsch-niedrigen Absorption bei 620 nm. In extremen Fällen kann die Absorption innerhalb der Kalibrationskurve liegen und als Hook Effekt registriert werden.

Linearität

Patientenproben wurden mit normalem männlichen Humanserum verdünnt und analysiert. Die erhaltenen Werte lagen bei ± 10% der erwarteten Werte.

Spezifität

Der CanAg PSA EIA basiert auf zwei monoklonalen Mausantikörpern, PSA10 und PSA66. Diese sind gegen zwei unabhängige Epitope gerichtet, die beide sowohl im PSA-ACT-Komplex als auch im freien PSA zu finden sind. Diese Antikörper-Kombination ermöglicht eine equimolare Reaktion für freies PSA und den PSA-ACT-Komplex (7). Um mögliche Interferenzen zu bestimmen, wurde die NCCLS Richtlinie EP7-P

(10) befolgt. Die folgenden Substanzen und Konzentrationen wurden getestet und keine Interferenzen mit dem Test festgestellt.

	Konzentration ohne signifikante (± 10%) Interferenz
Lipemia (Intralipid®)	10 mg/mL
Bilirubin, unkonjugiert	0,6 mg/mL
Hämoglobin	5 mg/mL

Methodenvergleich

Der CanAg PSA EIA (Prod. No. 340-10) wurde mit dem 2-Schritt-CanAg PSA EIA (300-10) verglichen. Dreihundertundacht männliche Humanseren mit einem Bereich von 0-53 µg/L wurden gemessen. Es ergab sich folgende lineare Regressionsanalyse.:

$$[\text{PSA}]_{\text{Prod. No. 340-10}} = 0,92 \times [\text{PSA}]_{\text{Prod. No. 300-10}} - 0,036 \quad r = 1,00$$

GEWÄHRLEISTUNG

Zur Ermittlung der oben präsentierten Testcharakteristika wurde der Test entsprechend der hier vorliegenden Arbeitsanleitung durchgeführt. Jede Änderung oder Modifikation der Prozedur, die nicht durch Fujirebio Diagnostics freigegeben wurde, kann die Ergebnisse beeinflussen. In diesem Fall lehnt Fujirebio Diagnostics alle angegebenen oder gesetzlichen Ansprüche und Gewährleistungen ab einschließlich der gesetzlichen Mängelgewährleistung und Gebrauchstauglichkeit.

LITERATUR

1. Wang MC, Valenzuela LA, Murphy GP, Chu TM (1979). Purification of a human prostate specific antigen. *Invest Urol* 17: 159–163.
2. Lilja H. (1985). A kallikrein-like serine protease in prostatic fluid cleaves the predominant seminal vesicle protein. *J Clin Invest* 76: 1899–1903.
3. Oesterling JE (1991). Prostate specific antigen: A critical assessment of the most useful tumor marker for adenocarcinoma of the prostate. *J Urology* 145: 907–923.
4. Lilja H., Christensson A., Dahlén U., Matikainen M-T, Nilsson O., Pettersson K., Lövgren T. (1991). Prostate-specific antigen in serum occurs predominantly in complex with α_1 -antichymotrypsin. *Clin Chem* 37: 1618–1625.
5. Christensson A., Björk T., Nilsson O., Dahlén U., Matikainen M-T., Cockett ATK, Abrahamsson PA, Lilja H. (1993). Serum prostate specific antigen complexed to α_1 -antichymotrypsin as an indicator of prostate cancer. *J Urology* 150: 100–105.
6. Oesterling JE., Cooner WH., Jacobsen SJ., Guess HA., Lieber MM. (1993). The influence of patient age on the serum prostate specific antigen concentration: An important clinical observation. *Urol Clin North Am* 20: 671–80, 1993a.
7. Nilsson O., Peter A. Andersson I., Nilsson K., Grundström B., and Karlsson B. (1997) Antigenic determinants of prostatespecific antigen (PSA) and development of assays specific for different forms of PSA. *Br J Cancer* 75(6): 789–797.
8. P Price C., Allard J., Davies G., Dawnay A., J Duffy M., France M., Mandarino G., Milford Ward A., Patel B., Sibley P. and Sturgeon C. Pre-and post-analytical factors that may influence use of serum prostate specific antigen and its isoforms in a screening programme for prostate cancer. *Ann Clin Biochem* 2001; 38: 188–216.
9. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices. Approved Guideline EP5-A (1999).
10. National Committee for Clinical Laboratory Standards, National Evaluation Protocols for Interference Testing, Evaluation protocol Number 7, Vol. 6, No 13, August (1986)



CanAg® ist eingetragenes Warenzeichen von Fujirebio Diagnostics AB

Fujirebio Diagnostics AB
Elof Lindälvs gata 13
SE-414 55 Göteborg
Sweden
Phone + 46 31-85 70 30
Fax + 46 31-85 70 40
info@fdab.com
www.fdab.com

