

**WHEN PERFORMING
THE ASSAY ALWAYS REFER
TO PACKAGE INSERT
SUPPLIED
WITH THE KIT**



CanAg Freies PSA EIA

Prod. No. 350-10

Arbeitsanleitung

Enzymimmunoassay Kit

2009-11

Für 96 Bestimmungen

ANWENDUNG

Der CanAg Freies PSA EIA Kit wird eingesetzt für die quantitative Bestimmung des freien 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).

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. (4, 5). Der CanAg Freies PSA EIA ist ein Test zur spezifischen Bestimmung des freien PSA ohne Kreuzreaktion mit dem PSA-ACT-Komplex (6).

TESTPRINZIP

Der CanAg Freies PSA EIA ist ein nicht-kompetitiver Festphasen-Immunoassay, der auf der direkten Sandwich-Technik basiert. Kalibratoren, Kontrollen und Patientenproben inkubieren gemeinsam mit biotinyliertem monoklonalen Anti-Freies-PSA Antikörper und einem Meerrettichperoxidase (HRP)–markierten monoklonalen Anti-PSA Antikörper 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 Konzentration des freien PSA in der Probe. Die Farbintensität wird mit einem Mikrotiter-Spektralphotometer bei 450 nm gemessen.

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

REAGENZIEN

- Jeder CanAg Freies 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
--------------------	--------------	---

Freies 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	0	0,3 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	5	5 µg/L	1 x 0,75 mL
CAL	PSA	10	10 µg/L	1 x 0,75 mL

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

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

CONTROL	FPSA	1	1 x 0,75 mL
CONTROL	FPSA	2	1 x 0,75 mL

Humanes freies 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-FPSA
---------------	------------------

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

Monoklonaler Maus-Antikörper Biotin Anti-freies PSA, etwa 1,5 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-FPSA
-------------	------------------

Tracer, HRP Anti-Freies 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-Freies 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 Freies PSA EIA wird Serum eingesetzt. Trennen Sie nach venöser Blutentnahme das Serum ab. Proben können für 24 Stunden bei 2-8°C gelagert werden. Zur längeren Aufbewahrung müssen die Proben bei -70°C tiefgefroren werden. Die Proben sollten nicht in einem Gefrierschrank mit Abtauautomatik gelagert werden. Die Seren sollten auch nicht vor der Analyse aufgetaut und erneut eingefroren 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 Freies 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 Freies PSA-Bestimmung durchgeführt wird (7). Es sollte beachtet werden, dass eine Finasteride-Behandlung bei einer BPH zu verringerten Freies PSA-Werten führen kann (7).

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 450 nm, und einem Absorptionsbereich von 0 bis 3,0.

4. Präzisionspipetten

Mit verworfbaren Plastikspitzen um μL - und mL -Volumina zu pipettieren. Eine 8-Kanal-Pipette oder Multipette mit verworfbaren Plastikspitzen für 100 μL ist nützlich aber nicht notwendig.

5. Destilliertes oder deionisiertes Wasser

Für die Herstellung der Waschlösung.

Anmerkungen zur Testdurchführung

1. Um die korrekte Durchführung des CanAg Freies 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 auf Raumtemperatur gebracht und 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. 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).
6. 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-Freies PSA mit 1 mL Biotin Anti-Freies PSA, (s. Tabelle und Arbeitsprotokoll):

Anzahl der Streifen	Tracer, HRP Anti-Freies PSA (µL)	Biotin Anti-Freies 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-Freies PSA in das Fläschchen des Biotin Anti-Freies 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, Kontrollen 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 50 µL Freies PSA Kalibrator (CAL 0; 0,3; 1; 2; 5; 10), 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 5	Unk1				
B	Cal 0	Cal 5	Unk1				
C	Cal 0,3	Cal 10	Unk2				
D	Cal 0,3	Cal 10	etc.				
E	Cal 1	C1					
F	Cal 1	C1					
G	Cal 2	C2					
H	Cal 2	C2					

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. (\pm 10 min) bei Raumtemperatur (20-25°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 (\pm 5 min) bei Raumtemperatur und gleichmäßigem Schütteln. Nicht direktem Sonnenlicht aussetzen.
9. 100 µL Stopplösung in jedes Well pipettieren und mischen. Die Absorption innerhalb von 15 Min. nach Zugabe der Stopplösung mit einem Mikroplatten-Spektrophotometer bei 450 nm ablesen.

Messbereich

The CanAg Freies PSA EIA mißt Konzentrationen zwischen 0,03 and 10 µg/L. Werden Freies 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 Freies PSA-Konzentration zu bestimmen. (sieh "Berechnung der Ergebnisse").

Qualitätskontrolle

Zur Validierung jeder Testserie sollten die Freies 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 zusätzlich eigene Serumpools mit verschiedenen Bereichen herstellen und als interne Kontrolle verwenden. Damit kann die Präzision des Testansatzes überprüft werden.

Referenzmaterial

Der 1. Internationale Standard 96/668 kann als Referenzstandard eingesetzt werden.

Die Werte für die Freies 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 Freies PSA-Kalibratorfläschchen aufgedruckt sind.

Für die automatische Kalkulation der Freies PSA-Ergebnisse wird empfohlen eine der folgenden Methoden zu verwenden:

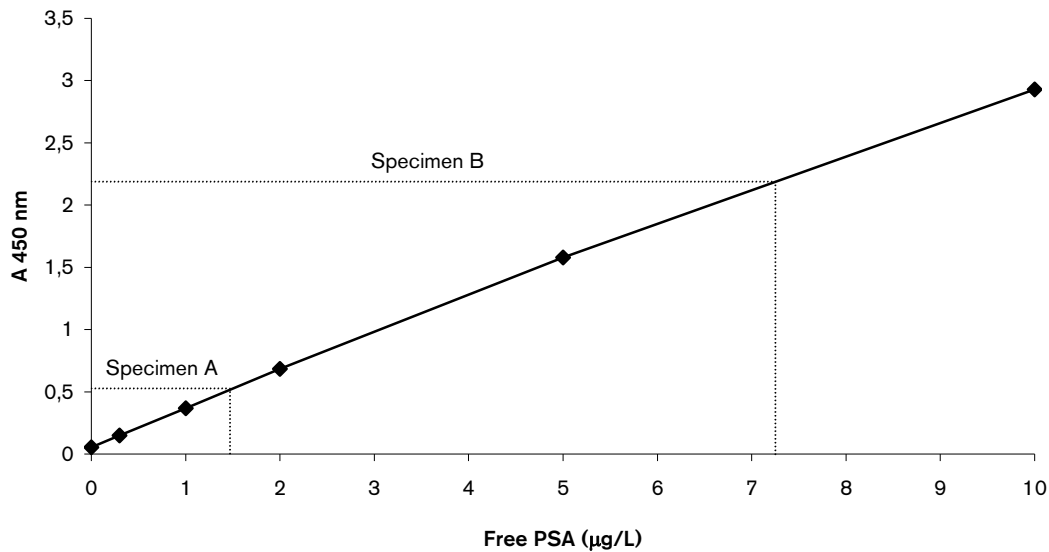
- "Cubic spline curve fit": Kalibrator 0 sollte mit dem Wert 0 µg/L in die Kurve eingesetzt werden.
- "Spline smoothed curve fit": Kalibrator 0 sollte als Blank verwendet werden.
- Interpolation mit "Punkt zu Punkt Auswertung": Kalibrator 0 sollte mit dem Wert 0 µg/L in die Kurve eingesetzt werden.
-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

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

Zur manuellen Berechnung wird eine Kalibrationskurve erstellt. Die Absorptionen (A) für jeden Freies PSA-Kalibrator werden gegen die entsprechende Konzentration an freiem PSA (in µg/L) aufgetragen, (s. folgende Abbildung). Zum Ablesen der unbekanntes freien PSA-Konzentration aus der Kalibrationskurve wird der Mittelwert der Absorptionen jeder Patientenprobe eingesetzt.

Beispiel

Proben	Kalibrator-werte	Absorptions mittelwert (A)	Freies PSA (µg/L)
CAL PSA 0	0 µg/L	0,054	
CAL PSA 0,3	0,3 µg/L	0,148	
CAL PSA 1	1 µg/L	0,369	
CAL PSA 2	2 µg/L	0,683	
CAL PSA 5	5 µg/L	1,580	
CAL PSA 10	10 µg/L	2,930	
Probe A		0,522	1,480
Probe B		2,181	7,147



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

Berechnung der Ergebnisse bei verdünnten Proben

Proben, für die im ersten Testansatz Werte $> 10 \mu\text{g/L}$ Freies PSA ermittelt wurden, sollten 1/10 mit normalem männlichen Humanserum verdünnt werden um exakte Freies PSA Konzentrationen der Proben zu erhalten. **Achtung:** Die Probe, die zur Verdünnung eingesetzt wird, muss ebenfalls gemessen werden, um die endogene freies PSA-Konzentration zu bestimmen.

Die Konzentration an freiem PSA in der unverdünnten Probe wird folgendermaßen berechnet:

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

GRENZEN DES TESTES

Aus der Konzentration an freiem PSA 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 Freies PSA EIA Tests sollten nicht verwendet werden für Wiederfindungsstudien. Für Wiederfindungsstudien sollte eine hochkonzentrierte Patientenprobe 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

Die Bestimmung des freien PSA sollte zusammen mit einem equimolaren Gesamt-PSA-Test wie z.B. CanAg PSA EIA (340-10) durchgeführt werden. Dadurch kann die Ratio von Freiem PSA / Gesamt PSA (TPSA) berechnet werden.

52 Seren von Männern bei denen eine benigne Prostatahyperplasie (BPH) diagnostiziert wurde und 77 Seren von Männern mit Prostatakarzinom (PCa) wurden mit dem CanAg PSA EIA und dem CanAg Freies PSA EIA bestimmt:

Diagnose	n	Median Ratio FPSA/TPSA	Min.	Max.	Mittelwert Ratio FPSA/TPSA	Standardabweichung	95% Vertrauensbereich
BPH	52	0.18	0,04	0.42	0,19	0,08	0,17 – 0,21
PCa	77	0.09	0,02	0.53	0,12	0,09	0,10 – 0,14

Welcher Cut-off in der klinischen Praxis eingesetzt wird, ist abhängig von der klinischen Anwendung, z.B. davon ob eine optimierte Sensitivität oder Spezifität gewünscht wird.

Sensitivitäten (% PCa korrekt bestimmt) and Spezifitäten (% BPH korrekt bestimmt) für verschiedene Cut-offs der Ratio FPSA/TPSA sind unten aufgeführt:

FPSA/TPSA Ratio Cut-off	Klinische Spezifität (% BPH > Cut-off)			Klinische Sensitivität (% PCa ≤ Cut-off)		
	n	%	95% Vertrauensintervall	n	%	95% Vertrauensintervall
0,23	14(52)	27%	16 – 41	69(77)	90%	81 – 95
0,16	36(52)	69%	55 – 81	64(77)	83%	73 – 91
0,08	48(52)	92%	81 – 98	30(77)	39%	28 – 51

TESTCHARAKTERISTIKA

Präzision

Die totale Präzision wurde entsprechend den NCCLS-Richtlinien EP5-A (9) ermittelt. Es wurden 4 Level tiefgefrorener humaner Poolseren verwendet, denen freies PSA zugesetzt wurde. Außerdem wurden 6 verschiedene CanAg Freies 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 %
Freies PSA 1	80	0,38	0,01	1,9	0,01	3,0
Freies PSA 2	80	1,44	0,02	1,6	0,04	2,6
Freies PSA 3	80	3,46	0,05	1,6	0,08	2,3
Freies PSA 4	80	6,91	0,09	1,3	0,12	1,8

Nachweisgrenze

Die Nachweisgrenze des CanAg Freies PSA EIA Tests ist < 0,03 µg/L, definiert als die Konzentration entsprechend dem Absorptionsmittelwert des Freies PSA Kalibrator 0 plus 2 Standardabweichungen. Es wurde folgende Formel verwendet:

$$\frac{2 \times \text{SD CAL 0}}{\text{OD CAL 0,3} - \text{OD CAL 0}} \times 0,3 \mu\text{g/L}$$

Wiederfindung

Angereicherte Serumproben wurden hergestellt, indem männlichem Normalserum anteilig Serum mit hohen Freies PSA-Konzentrationen zugesetzt wurde. Die Wiederfindung des Antigens lag bei $\pm 15\%$ der erwarteten Werte.

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

Hook Effekt

Bei Proben bis zu einer Konzentration von 5000 $\mu\text{g/L}$ wurde kein Hook Effekt festgestellt.

Linearität

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

Spezifität

Der CanAg Freies PSA EIA basiert auf zwei monoklonalen Mausantikörpern, PSA30 und PSA66. Diese sind gegen zwei unabhängige Epitope des freien PSA gerichtet. Diese Antikörper-Kombination ermöglicht einen spezifischen Assay für freies PSA mit einer Kreuzreaktion $< 1\%$ für den PSA-ACT-Komplex (6). Um mögliche Interferenzen zu bestimmen, wurde die NCCLS Richtlinie EP7-P (9) befolgt. Die folgenden Substanzen und Konzentrationen wurden getestet und keine Interferenzen mit dem Test festgestellt.

	Konzentration ohne signifikante ($\pm 10\%$) Interferenz
Lipemia (Intralipid [®])	10 mg/mL
Bilirubin, unkonjugiert	0,4 mg/mL
Hämoglobin	5 mg/mL

Methodenvergleich

Der CanAg Freies PSA EIA (Prod. No. 350-10) wurde mit dem 2-Schritt-CanAg Freies PSA EIA (330-10) verglichen. Einhundertsiebenundzwanzig männliche Humanseren mit einem Bereich von 0-9 $\mu\text{g/L}$ wurden gemessen. Es ergab sich folgende lineare Regressionsanalyse.:

$$[\text{Freies PSA}]_{\text{Prod. No. 350-10}} = 1,02 \times [\text{Freies PSA}]_{\text{Prod. No. 330-10}} - 0,06 \quad r = 0,99$$

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, einschliesslich der gesetzlichen Mängelgewährleistung und Gebrauchstauglichkeit, ab.

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. Haese A., Becker C., Diamandis E., and Lilja H., (2002) Adenocarcinoma of the Prostate In: “Tumor Markers. Physiology, Pathobiology, Technology, and Clinical applications”. Eds. Diamandis et al., AACCC Press, Washington, pp. 193-238.
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. Nilsson O., Peter A. Andersson I., Nilsson K., Grundström B., and Karlsson B. Antigenic determinants of prostatespecific antigen (PSA) and development of assays specific for different forms of PSA. *Br J Cancer* 75(6):789–797, 1997.
7. Price C. P., Allard J., Davies G., Dawnay A., J Duffy M., France M., Mandarino G., Milford Ward A., Patel B., Sibley P. and Sturgeon C. (2001) 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*; 38: 188–216.
8. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices. Approved Guideline EP5-A (1999).
9. 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

