

SERATEC[®] PSA SEMIQUANT

Art.-Nr. PSM400F

Test diagnostyczny in vitro do profesjonalnego użytku w celu stwierdzenia obecności nasienia poprzez półilościowe wykrywanie PSA (swoistego antygenu sterczowego)**Zastosowanie**

Test SERATEC[®] PSA SEMIQUANT służy do szybkiego wykrywania PSA w nasieniu. Odczyt wyników następuje wizualnie po pojawieniu się linii barwnej dla próbek zawierających PSA. W razie potrzeby intensywność zabarwienia linii może być porównana ze standardem wewnętrznym, którego zabarwienie odpowiada stężeniu PSA wynoszącemu 4 ng/ml.

Podstawy teoretyczne

PSA (swoisty antygen sterczowy) jest glikoproteiną podlegającą syntezie w prostaty i wydzielaną do płynu nasiennego. Jej podstawową funkcją jest upłynnianie płynu nasiennego, a osiągnięte przez nią stężenie może wynosić od 0,2 do 3 mg/mL. Te wysokie wartości i fakt, że PSA występuje w wydzielinie pochwowej jedynie w niewielkich ilościach (odpowiednio 0,4-0,9 ng/mL i 0,0-1,25 ng/mL)^{2,3} czynią PSA interesującym wskaźnikiem mającym zastosowanie w medycynie sądowej (przestępstwa na tle seksualnym) jako dowód wystąpienia najmniejszych nawet ilości nasienia. Zalety wykrywania PSA:

- Potwierdzenie obecności spermy może być przeprowadzone nawet w przypadku niewystępowania plemników (np. w wypadku mężczyzn po wazektomii).
- Rozpoznane mogą zostać nawet minimalne ilości spermy. Badania Macaluso i współautorów (1999) wykazały, że już znikoma ilość (10 µl) nasienia powoduje ok. 200-krotne podniesienie poziomu PSA w wydzielinie pochwowej.
- PSA charakteryzuje się wysoką stabilnością. W wymazach z pochwy można go wykryć do 14 – 47 godzin po stosunku⁵. Nawet 30 letnie ślady spermy zawierają jeszcze PSA w wykrywalnym stężeniu¹.
- PSA jest dokładniejszym wskaźnikiem niż tzw. test na kwaśną fosfatazę.

Na wyniki testu może wpływać fakt występowania PSA w innych płynach fizjologicznych takich jak krew lub moczu. Podczas gdy koncentracja PSA w surowicy krwi mężczyzny jest w zasadzie niska (< 4 ng/ml) i tylko w przypadku chorób prostaty podnosi się do wartości 200 ng/ml, ilość PSA występująca w moczu zdrowego mężczyzny może wynosić do 800 ng/ml (wartość szacunkowa)⁴. W razie wątpliwości możliwe jest odróżnienie płynu nasiennego od moczu poprzez zbadanie stężenia PSA. Najwyższy współczynnik rozcieńczenia męskiego moczu, dla którego stwierdzono pozytywny wynik testu na obecność PSA to 1:200. Próbkę spermy natomiast wykazują zwykle pozytywny wynik testu na obecność PSA nawet przy rozcieńczeniu w stosunku 1:200.000, tzn. 1000-krotnie większym⁴. Badania wykazują, że niewielkie ilości PSA są wykrywalne już w moczu 11-letnich chłopców.⁴

Pozostałe płyny fizjologiczne mogące zawierać PSA wymienione są w załączniku 6. Zwykle stężenia PSA w innych płynach fizjologicznych są tak znikome, że, o ile preparat zostanie odpowiednio wyekstrahowany i rozcieńczony, wynik testu nie powinien zostać zaburzony.

Opis produktu

Test SERATEC[®] PSA SEMIQUANT był pierwotnie opracowany w celu wykrywania PSA w surowicy krwi, co umożliwiłoby wczesną diagnozę raka prostaty; z tego względu jest to test półilościowy. Przy wykrywaniu obecności nasienia wyniki testu interpretowane są w sposób jakościowy. Możliwe jest jednak oszacowanie poziomu PSA w próbce poprzez porównanie intensywności zabarwienia linii wynikowej ze standardem wewnętrznym.

Zasada działania testu

SERATEC[®] PSA SEMIQUANT jest chromatograficznym testem immunologicznym (Chromatographic Immunoassay, CIA) służącym do szybkiego półilościowego wykrywania PSA w płynach fizjologicznych. Jego działanie opiera się na obecności dwóch rodzajów monoklonalnych mysich przeciwciał anty-PSA.

W rejonie wynikowym na membranę naniesione jest jedno z przeciwciał. Położony powyżej rejon kontrolny oraz rejon wewnętrznego standardu (pośrodku) zawierają unieruchomione poliklonalne kozie przeciwciała antymysie. Ilość przeciwciał w wewnętrznym rejonie

standardowym jest tak dobrana, by zabarwienie linii standardowej odpowiadało intensywności zabarwienia linii wynikowej przy koncentracji PSA wynoszącej 4 ng/ml. Próbkę umieszczoną jest na znajdującej się poniżej membrany podkładce z włókna szklanego, a następnie kierowana na podkładkę zawierającą drugie, wyznakowane cząsteczkami złota, mysie monoklonalne przeciwciała anty-PSA, wiążące się z PSA zawartym w preparacie.

Po nałożeniu próbki przenoszona jest dzięki siłom kapilarnym membrana do różnych rejonów. Niezależnie od zawartości PSA w próbce wyznakowane złotem mysie przeciwciała oraz anty-mysie przeciwciała znajdujące się w rejonach kontrolnym i wewnętrznego standardu tworzą kompleks, co objawia się powstaniem dwóch barwnych linii w górnej części okienka wynikowej. Linie te stanowią informację o prawidłowym przeprowadzeniu testu.

Jeśli badana próbka zawiera PSA, wyznakowany złotem kompleks PSA-anty-PSA wiąże się z unieruchomionymi w rejonie wynikowym monoklonalnymi mysimi przeciwciałami anty-PSA, które rozpoznają inny epitop antygenu sterczowego. Doprowadza to do pojawienia się następnej linii. W ten sposób dla próbki **zawierającej PSA** w okienku wynikowym pojawiają się **trzy** barwne linie. Intensywność zabarwienia środkowej z nich (standard wewnętrzny) odpowiada przy tym stężeniu 4 ng PSA/ml, co może zostać wykorzystane do oszacowania poziomu PSA w próbce.

Materiały

Zawartość opakowania: pipeta plastikowa i instrukcja obsługi. Opakowanie jednostkowe zawiera 40 kaset testowych. 50 mL roztwór buforowy

Dodatkowo niezbędne: stoper lub timer.

Przechowywanie i przydatność do użycia

Test powinien być przechowywany w chłodzie (od +4 do +8 °C) lub w temperaturze pokojowej (nie przekraczającej 30 °C) w zamkniętym opakowaniu, z zachowaniem podanego terminu przydatności do użycia.

Właściwości testu**Czułość**

Test wykrywa PSA w stężeniach mieszczących się co najmniej w zakresie od 2 ng/ml do 100 µg/ml. Warto zauważyć, że często także w przypadku próbek o niższej zawartości PSA (od ok. 0,5 ng/ml) antygen może zostać wykryty, co powoduje pojawienie się słabej linii barwnej. Przy stężeniu wynoszącym 500 µg/ml i wyższym wynik testu może być zaburzony przez efekt prozony (tzw. "high dose hook effect" – efekt zahamowania reakcji serologicznej wskutek nadmiaru antygenu lub przeciwciał).

Dokumentacja

Skuteczność testu została potwierdzona podczas kontroli jakości przy użyciu standardu WHO Prostate Specific Antigen (90:10), First International Standard, NIBSC Code 96/670.

Skuteczność

Dla stężenia 2 ng PSA/ml (najniższy gwarantowany poziom wykrywalności testem SERATEC[®] PSA SEMIQUANT) zaobserwowano następujące parametry:

czułość testu:	100 %
specyficzność testu:	100 %
dodatnia wartość predykcyjna:	100 %
ujemna wartość predykcyjna:	100 %
powtarzalność wyników:	100 %

Dla odróżnienia stężeń PSA < i ≥ 4ng/mL PSA w surowicy krwi, koniecznego w diagnozowaniu nowotworów, dwa niezależne badania kliniczne wykazały następujące parametry (wartości uśrednione):

czułość testu:	90,0 %
specyficzność testu:	88,7 %
dodatnia wartość predykcyjna:	83,3 %
ujemna wartość predykcyjna:	96,5 %
powtarzalność wyników:	90,2 %

Specyficzność

Test nie wykazuje reakcji krzyżowych z innymi proteinami występującymi w płynie nasiennym. Na immunoblocie białek płynu nasiennego z wykorzystaniem odpowiednich przeciwciał widoczny jest jeden prążek na wysokości odpowiadającej masie molekularnej PSA. Nie zaobserwowano reakcji krzyżowych z płynem nasiennym innych ssaków (psa, kota, konia, świni, bydła)¹ z wyjątkiem małych czelakosształtnych.

Test nie wykazuje reakcji krzyżowych z innymi białkami występującymi w surowicy krwi ludzkiej. Nie zaobserwowano także jakiegokolwiek reakcji w przypadku krwi żeńskiej, w której zawartość PSA leży poniżej granicy wykrywalności.

Przeprowadzanie testu

Zasady bezpieczeństwa

Próbki spermy mogą być potencjalnie zakaźnym materiałem, obchodzenie się z którym wymaga szczególnej staranności. Badanie powinno być przeprowadzane z zachowaniem środków ostrożności (rękawiczki, odzież laboratoryjna). Materiały wykorzystywane do testu, jako potencjalnie zakaźne, powinny przed ich wyrzuceniem poddać autoklawowaniu.

- Test przeznaczony jest wyłącznie do jednorazowego badania *in vitro*.
- Nie stosować po upływie terminu przydatności do użycia lub w wypadku uszkodzenia opakowania zabezpieczającego.
- W teście wykorzystywane są potencjalnie zakaźne materiały (np. przeciwciała). Przy odpowiednim obchodzeniu się z testem nie stanowią one jednak zagrożenia.
- Kasetę testową należy otwierać dopiero bezpośrednio przed użyciem.

Przygotowanie preparatu

Ze względu na wyjątkowo wysoką zawartość PSA w płynie nasiennym sugeruje się rozcieńczenie go przed użyciem w stosunku przynajmniej 1:500 (można wykorzystać standardowe bufony o neutralnym pH lub wodę destylowaną). Płyny nasienia mogą zostać wyekstrahowane buforem poprzez dwugodzinną inkubację z wstrząsaniem w temperaturze 4°C. Supernatant po trzyminutowym wirowaniu może być wykorzystany jako próba¹.

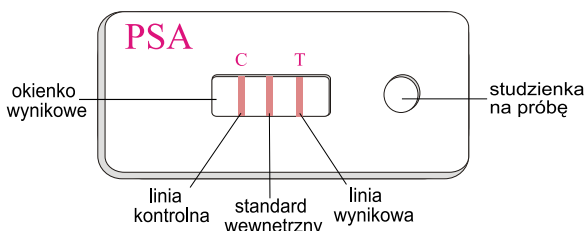
Nie zaobserwowano interferencji z cząsteczkami tkaniny w próbce.

Uwaga

- Zbyttna lepkość preparatu może utrudniać migrację za pomocą sił kapilarnych
- Przed przeprowadzeniem testu preparat powinien zostać ogrzany do temperatury pokojowej

Początek testu

Kasetka testowa



- Za pomocą dołączonej pipety plastikowej odmierzyć 5 kropli (ok. 200µl) z próby i umieścić w okrągłym zagłębieniu (studzience na próbę). Rozpocząć odmierzanie czasu. Pozostały płyn zachować w celu ewentualnego zbadania innych rozcieńczeń.
- Wynik można odczytać po 10 minutach inkubacji w temperaturze pokojowej. Płyn w studzience powinien zostać do tego czasu całkowicie wchłonięty. Jeśli planowany jest odczyt ilościowy, należy dokładnie stosować się do podanego powyżej czasu próby, gdyż w przeciwnym razie może dojść do zmian intensywności zabarwienia linii standardu wewnętrznego i linii wynikowej.

Odczytanie wyników

W przypadku prób nie zawierających PSA w okienku wynikowym pojawiają się 2, a dla próbek zawierających PSA - 3 linie:

Linia wynikowa (T): Widoczna jedynie dla próbek zawierających PSA, odzwierciedla stężenie PSA w preparacie.

Standard wewnętrzny: Intensywność zabarwienia linii odpowiada stężeniu PSA na poziomie około 4 ng/ml.

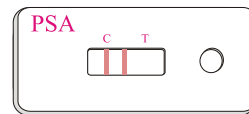
Linia kontrolna (C):

Kontrola możliwych nieprawidłowości w przeprowadzeniu testu oraz integralności jego elementów.

Interpretacja wyników

Wynik negatywny (brak PSA w próbce lub jego stężenie jest zbyt niskie, by mogło zostać wykryte)

Linia wynikowa (T) nie jest widoczna. Pojawienie się linii wewnętrznego standardu oraz linii kontrolnej (C) świadczy o prawidłowym przeprowadzeniu testu.



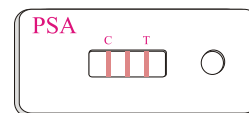
W tym przypadku można z dużym prawdopodobieństwem wykluczyć obecność PSA w próbce.

Uwagi:

Należy upewnić się, że poziom rozcieńczenia próby nie wykracza poza przedział mierzalnych wartości. Zbyt niskie (np. przy niewystarczającym wyekstrahowaniu) i zbyt wysokie (np. przy niedostatecznym rozcieńczeniu; stężenie $\geq 500\mu\text{g/mL}$ prowadzi do powstania efektu prozyny) stężenia PSA zaburzają pojawianie się linii wynikowej.

Wynik pozytywny (obecność PSA w próbce)

Pojawia się linia wynikowa (T), linia standardu wewnętrznego oraz linia kontrolna (C).



W tym przypadku można stwierdzić, że próba z dużym prawdopodobieństwem zawiera PSA.

Uwagi:

Inne płyny fizjologiczne mogą zawierać PSA, w mniejszych jednak stężeniach. W przypadku wątpliwości jednoznaczny wynik testu można uzyskać posługując się bardziej rozcieńczonym preparatem.

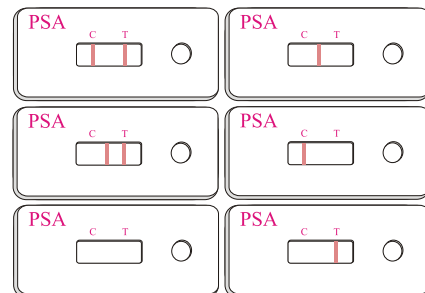
Wynik nieważny

Linia standardu wewnętrznego i/lub linia kontrolna (C) są niewidoczne.

W tym przypadku test należy powtórzyć stosując nową kasetę testową.

Uwagi:

W przypadku szczególnie wysokiej zawartości PSA w próbce linia kontrolna może być bardzo słabo widoczna.



Literatura

- Hochmeister et al. (1999) Evaluation of Prostate-Specific Antigen (PSA) Membrane Test Assays for the Forensic Identification of Seminal Fluid: J Forensic Sci Vol 44: 1057-1060
- Lawson et al. (1998) Objective markers of condom failure. Sex Transm Dis 25: 427-423
- Macaluso et al. (1999) Prostate-specific antigen in vaginal fluid as a biologic marker of condom failure. Contraception 59: 195-201
- Sato et al. (2002) Use of the „SMITEST” PSA card to identify the presence of prostate-specific antigen in semen and male urine. Forensic Sci Int 127: 71-74
- Hochmeister et al. (1997) Evaluation of Prostate-Specific Antigen (PSA) Membrane Tests for the Forensic Identification of Semen. 8th International Symposium on Human Identification www.promega.com/geneticidproc/ussymp8proc/33.html
- Laux et al., Forensic Detection of Semen III. Detection of PSA Using Membrane Based Tests: Sensitivity Issues with Regards to the presence of PSA in other Body Fluids. <http://mafs.net/pdf/forensicdetectionsemen3.pdf>
- Laux et al., Forensic Detection of Semen II. Comparison of the Abacus Diagnostics OneStep ABA card p30 Test and the Seratec PSA Semiquant Kit for the Determination of the Presence of Semen in Forensic Cases. <http://mafs.net/pdf/laux2.pdf>
- Gartside et al., Estimation of Prostate-Specific Antigen (PSA) Extraction Efficiency from Forensic Samples Using the Seratec PSA Semiquant Semiquantitative Membrane Test. Forensic Science Communications 2003 April; 5 (2). <http://www.fbi.gov/hq/lab/fsc/backissu/april2003/gartside.htm>