

	Јавна здравствена установа Болница „Свети Врачеви“ Бијељина Српске војске 53			MI-10-049
Упутство за методу испитивања укупног простатичног антигена (tPSA)				
Страна 1 од 7	Издање:	Важи од:	Одобрио	Копија број
	1	2024-12-24	mr ph Анђела Митровић руководилац Службе за хематолошку и биохемијску дијагностику	Е

1. СВРХА ИСПИТИВАЊА

Простата специфични антиген (PSA), члан фамилије хуманих каликреина, је серин протеаза која има активност сличну химотрипсину. Главно мјесто синтезе PSA је жлездани епител простате. Повећане вриједности укупног PSA (tPSA) јављају се код патолошких обољења простате као што су простатитис, бенигна хиперплазија простате и карцином простате. Мјерење концентрације tPSA у серуму веома је значајно у раној детекцији карцинома простате и користан је додаток ректалном и ултразвучном прегледу. Одређивање tPSA има значајну улогу у детекцији метастатске или перзистентне болести код пацијената након хируршког или медикаментног лијечења карцинома простате. Стално повећане вриједности tPSA или скок вриједности tPSA након лијечења указују на повратак или резидуалну болест. Одређивање tPSA је прихваћено као допунски тест у праћењу пацијената са карциномом простате.

2. ПРИНЦИП И МЕТОД ПРОЦЕДУРЕ КОЈА СЕ КОРИСТИ ЗА ИСПИТИВАЊЕ

Одређивање укупног PSA (tPSA) у серуму и плазми се темељи на примјени хемилуминисцентне имунохемијске методе (CMIA-енгл. Chemiluminescent microparticle immunoassay). Ова метода се заснива на имунометријској сендвич конфигурацији у којој молекула tPSA гради мост између два tPSA антителијела.

Узорак се мијеша са парамагнетним микрочестицама обложеним анти-tPSA. tPSA се везује на микрочестице оближене са анти-PSA, које представља сепарационо антителијело. Након испирања додаје и детекционо антителијело, односно акридином обиљежен tPSA коњугат, како би се добила реакциона смјеса. Након још једног циклуса испирања у реакциону смјесу се додаје преактивацијски и активацијски раствор, чиме се активира хемилуминисценција, која се мјери и изражава у реалтивним свјетлосним јединицама (RLU). Количина tPSA у узорку пропорционална је вриједности RLU.

Методологија: Хемилуминисцентно имуно одређивање микро честицама (CMIA)

3. КАРАКТЕРИСТИКЕ ПЕРФОРМАНСИ

3.1. Прецизност

Репрезентативни резултати испитивања унутар лабораторијске прецизности теста помоћу CLSI протокола EP05-A2 приказани су у табели 1.

Табела 1. Резултати прецизности теста

Узорак	n	Средња вриједност (µg/L)	Поновљивост		Унутар- лабораторијска прецизност (Укупна)	
			SD	%KV	SD	%KV
Ниска контрола	118	0,509	0,0157	3,1	0,0166	3,3
Средња контрола	120	3,945	0,1226	3,1	0,1334	3,4
Висока контрола	116	23,889	1,0342	4,3	1,1347	4,7
Узорак 1	117	0,110	0,0039	3,5	0,0041	3,8
Узорак 2	117	45,891	2,6965	5,9	2,7772	6,1

SD-стандардна девијација; %KV-коэффициент варијације

3.2 Линеарност

tPSA тест за узорке серума линеаран је у интервалу од <4,0 µg/L

3.3 Граница детекције (LOD- eng. Limit of Detection)

LOD је најмања количина анализа у узорку која се може детектовати са 95%-ом вероватноћом на основу $n \geq 60$ реплика узорка који су садржали низак ниво анализата LOD за tPSA у серуму је 0,003µg/L.

3.4 Граница квантификације (LOQ)

Граница квантификације (LOQ) је концентрација анализата која се може одредити уз одговарајућу тачност и прецизност. LOQ је одређен помоћу $n \geq 60$ реплика узорка који садрже низак ниво анализата. LOQ за tPSA у серуму је 0,025ng/mL.

3.5 Поређење метода

Резултати добијени одређивањем tPSA у серуму на Alinity ci анализатору упоређени су са резултатима добијеним на ARCHITECT ci анализатору Passing-Bablok регресионом анализом.

Табела 2. Поређење метода Alinity ci tPSA vs ARCHITECT ci tPSA

врста узорка	јединица	n	коэффициент корелације	одсјечак на у ос	нагиб	интервал концентрације
серум	ng/mL	210	1,00	0,00	0,99	0,061-92,207

Болница Бијељина	Страна 3 од 7	Издање:	Важи од:	МП-10-049
		1	2024-12-24	

4. ВРСТА УЗОРКА

Врста узорка: За тестирање се може користити узорак серума.

Чување узорака: Анализа узорака се врши у што краћем временском периоду. Избјегава се вишекратно замрзавање и одмрзавање узорака. Ако се узорци не тестирају у року од 24 сата серум или плазма се одвајају од угрушка или гела у епрувети. Стабилност узорака приказана је у табели 3.

Табела 3. Стабилност узорака

Температура	Максимално вријеме чувања
	серум/плазма
2 до 8 °C	≤24 сата
-20 °C и нижа	>24 дана

Транспорт узорка: Узорке до мјеста обраде је потребно доставити у одговарајућем положају и на сталцима, при чему крв не смије да буде у додиру са чепом. Препоручено вријеме доставе до лабораторије је 2 сата од узимања узорка.

5. ПРИПРЕМА ПАЦИЈЕНАТА

Препорука је да се узорак крви узима наشته, ујутру најмање 12 сати након последњег оброка, као и да вријеме за вађења крви буде између 7 и 10 h. Дан прије вађења крви треба узимати уобичајне оброке, али не премасне. За вечеру конзумирати лакшу храну. Вечера треба да буде најкасније до 19 h. Послије 19 h може се пити течност, изузев алкохола, кафе и претјерано заслађених напитака. Дан прије узимање крви треба избјежавати интензивну физичка активност. На дан узимања крви, ујутру, не треба ништа јести, пити ни пушити.

6. ВРСТА ПОСУДЕ И АДТИВИ

За узорковање крви се користе пластичне епрувете, односно вакутајнери. За добијање серума користе се епрувете са активатором коагулације са или без гела.

7. ОПРЕМА И РЕАГЕНСИ

Од опреме и регенаса за извођење овог теста потребне су: реагенс сет, Alinity ci, Abbott анализатор заштитне рукавице, заштитна одјећа, аутоматска пипета, наставци за пипету, реакционе чашице. Сет реагенаса за одређивање укупног PSA је у течном облику, спреман за употребу и садржи један реагенс, чије су компоненте приказане у табели 3.

Сет реагенаса за одређивање tPSA је у течном облику, спреман за употребу и садржи два реагенса, чије су запремине и компоненте приказане у табели 4.

Табела 4. Компоненте реагенса tPSA

Реактивне компоненте	Минимална концентрација
<i>Microparticles:</i>	0,1 %
• Микрочестице обложене антителима	

Болница Бијељина	Страна 4 од 7	Издање:	Важи од:	МП-10-049
		1	2024-12-24	

на tPSA (мишија мониклонска)

- TRIS пуфер са протеинским стабилизаторима
- Конзерванс-антимикробни агенс

Conjugate:

- Акридином обиљежена антитијела на tPSA коњугат антитијела tPSA у фосфатном пуферу са протеинским стабилизаторима
- Конзерванс- антимикробни агенс

Додатни материјали потребни за извођење теста су: *tPSA Calibrators; Multichem IA plus Controls, Pre-Trigger Solution, Trigger Solution и Wash Buffer.*

8. УПРАВЉАЊЕ УСЛОВИМА СРЕДИНЕ И БЕЗБЈЕДНОШЋУ

Обезбјеђивање услова радне средине представља систем мјера и активности за остваривање услова које захтјевају испитивања која се спроводи прописане су у упутству УП-10-138: *Обезбјеђење и праћење услова средине у процесу испитивања.* У просторији у којој је смјештен апарат, температура је прилагођена условима који су прописани од стране произвођача опреме и захтјевима испитивања. Температура се одржава на вриједностима до 25 °C, што се евидентира у *обрасцу ОБ-10-221: Евиденција температуре.*

Упутством УП-10-137: *Мјере заштите на раду у Служби за хематолошку и биохемијску дијагностику,* прописују се мјере заштите на раду.

Овај тест захтијева руковање хуманим узорцима. Сваки узорак крви или другог биолошког материјала који се достави у лабораторију је потенцијално инфективан, па је неопходно да се са овим материјалом крајње пажљиво рукује. То значи да приликом манипулације узорцима и при раду са апаратом треба користити рукавице за једнократну употребу, као и друга заштитна средства.

Подаци о идентификацији хемикалија, опасности, мјерама прве помоћи и осталим подацима везаним за безбједност примјенереагенса tPSA се налази у Безбједоносном листу везаним за Alinity i tPSA Reagent Kit као и у упутству УП-10-166: *Упутство за безбједно руковање хемикалијама у Служби за хематолошку и биохемијску дијагностику.*

9. ПРОЦЕДУРЕ КАЛИБРАЦИЈЕ (МЕТРОЛОШКА СЛЕДЉИВОСТ)

Калибрацијасеврши 4PLCметодом (енгл.4-parameterlogisticcurvefitdatareductionmethod), гдјесекаокалибраторикористетPSACalibrator.

Калибрација јепотребнанакон сваке промјене серије реагенса (лот) и а косу контролеизванприхватљивихраспонаконцентрација.Калибратори се тестирају у дупликату. Ваљаност калибрације се провјерава спровођењем интерне контроле квалитета.

10. КОРАЦИ ПРОЦЕДУРЕ

1. Прије постављања реагенс сета на анализатор бочице са микрочестицама се добро промјешају, како би се извршило потпуно суспендовање честица.
2. Прије анализе узорака, спроводи се интерна контрола квалитета и по потреби калибрација.
3. Запремина узорака за први тест је 150 µL, запремина узорка за сваки додатни тест који се изводи на узорку из исте чашице је 50 µL.

Болница Бијељина	Страна 5 од 7	Издање:	Важи од:	МП-10-049
		1	2024-12-24	

4. Узорци се стављају у епрувете или чашице са бар кодовима пацијената на носаче, сталке (*carrier*).
5. Након постављања узорака на транспортни модул врши се њихова идентификација скенирањем бар кода, након чега се врше аналитички процеси испитивања узорка.
6. Поступак аналитичког процеса је следећи:
 - a. у реакциону посуду са узорком се пипетирају парамагнетисане честице са антителима на tPSA(сепарациона антителима), након чега се врши мјешање реакционе смјеше
 - b. реакциона смјеша се инкубира, а аналити из узорка се везују за антителима на парамагнетисаним честицама, стварајући имунски комплекс
 - c. магнет привлачи парамагнетисане микрочестице (везане заиспитивани аналит) на зид реакционе посуде
 - d. зона прања вишеструко испира реакциону смјешу како би се уклониле неvezана једињења
 - e. у реакциону смјешу се пипетира хемилуминисцентни коњугат обиљежен акридинијумом, коњугат се веже за имунски комплекс да би довршио реакцију
 - f. реакциона смјеша се инкубира и зона прања вишеструко испира реакциону смјешу како би се уклониле неvezана једињења
 - g. pre-triggerсолуција (натријум хидрокси) обезбјеђује базну средину, спречава рану емисију свјетлости, спречава агрегацију микрочестица и раздваја обиљеживача акридинијум од коњугата
 - h. trigger солуција, активацијски раствор (натријум пероксид), који представља оксидациона средство, у базној средини, доводи до реакције оксидације акридинујма, ексцитирани производи формирани у реакцији оксидације након тога емитују свјетлост-хемилуминисценција

11. ПРОЦЕДУРЕ КОНТРОЛЕ КВАЛИТЕТА

Контрола квалитета спроводи се примјеном контролних материјала које препоручује произвођач, а то су *Technopath Multihem IA Plus* ниво 1, *Technopath Multihem IA Plus* ниво 2 и *Technopath Multihem IA Plus* ниво 3. Интерна контрола квалитета се спроводи континуирано, сваког дана, прије почетка спровођења рутинских анализа. Такође, контрола квалитета се спроводи при промјени серије реагенса или калибратора (лот). Резултати статистичке обраде при интерној провјери аутоматски се приказују на контролној карти која се креира за сваки параметар посебно, чиме се оцијењује значајност разлике између вриједности која се добија анализирањем контролног материјала и очекиване вриједности за тај материјал. Ако је вриједност контролног узорка унутар двије стандардне девијације метода је под контролом и резултати пацијената се могу издати.

12. ИНТЕРФЕРЕНЦЕ (ЛИПЕМИЈА, ХЕМОЛИЗА,БИЛИРУБИНЕМИЈА, ЛИЈЕКОВИ) И УНАКРСНЕ РЕАКЦИЈЕ

Потенцијалнеинтерференцијесахемоглобином, билирубином,триглицеридимаипротеинимаутPSАтесту, при наведеним концентрацијама је <10 %.

Хемоглобин: $\leq 500 \text{ mg/dL}$

Билирубин: $\leq 20 \text{ mg/dL}$

Триглицериди: $\leq 3000 \text{ mg/dL}$

Протеини: $\leq 12 \text{ g/Dl}$

Болница Бијељина	Страна 6 од 7	Издање:	Важи од:	МП-10-049
		1	2024-12-24	

Хитрин $\leq 10 \mu\text{g/mL}$

Проскар $\leq 25 \mu\text{g/mL}$

Фломакс $\leq 1 \mu\text{g/mL}$

Хемотерапијски агенци:

Циклофосфамид $\leq 700 \mu\text{g/mL}$

Диетилстилбестрол $\leq 2 \mu\text{g/mL}$

Доксорубицин-НСI $\leq 16 \mu\text{g/mL}$

Естрамустин фосфат $\leq 200 \mu\text{g/mL}$

Флутамид $\leq 10 \mu\text{g/mL}$

Госерелин ацетат $\leq 100 \text{ ng/mL}$

Лупрон $\leq 100 \mu\text{g/mL}$

Мегестрол ацетат $\leq 90 \mu\text{g/mL}$

Метотрексат $\leq 30 \mu\text{g/mL}$

13. ПРИНЦИПИ ПРОЦЕДУРЕ ЗА ИЗРАЧУНАВАЊЕ РЕЗУЛТАТА, А КАДА ЈЕ ТО РЕЛЕВАНТНО И МЈЕРНА НЕСИГУРНОСТ ИЗМЈЕРЕНИХ КВАНТИТАТИВНИХ ВРИЈЕДНОСТИ

Принцип одређивања и израчунавања концентрације tPSA се заснива на методи 4PLC, гдје анализатор мјери хемилуминисцентну емисију калибратора, мјерењем релативних свјетлосних јединица (RLU) и генерише калибрациону криву, док при анализи мјери хемилуминисцентну емисију анализата, коју анализатор аутоматски конвертује у концентрацију.

Мјерна несигурност за tPSA је 1,14%.

14. БИОЛОШКИ РЕФЕРЕНТНИ ИНТЕРВАЛИ И ВРИЈЕДНОСТИ КЛИНИЧКОГ ОДЛУЧИВАЊА

Референтни интервал за tPSA препоручен од стране произвођача је $<4 \mu\text{g/L}$

15. ИНТЕРВАЛ ИЗВЈЕШТАВАЊА О РЕЗУЛТАТИМА ИСПИТИВАЊА

Интервал извјештавања о резултатима испитивања за tPSA представља: 0.025 до $100 \mu\text{g/L}$.

16. УПУТСТВА ЗА ОДРЕЂИВАЊА КВАНТИТАТИВНИХ РЕЗУЛТАТА КАДА РЕЗУЛТАТ НИЈЕ У ОКВИРУ ИНТЕРВАЛА МЈЕРЕЊА

Узорци у којима су концентрације tPSA изнад $100 \mu\text{g/L}$, могу се разблажити аутоматски или ручно. Анализатор разблажује узорак у односу 1:10 и аутоматски израчунава концентрацију множењем резултата фактором разблаживања. Друга разблажења осим 1:10 треба изводити ручно.

17. АЛАРМАНТНЕ/КРИТИЧНЕ ВРИЈЕДНОСТИ, КАДА ЈЕ ОДГОВАРАЈУЋЕ

Није примјениво.

18. КЛИНИЧКО ТУМАЧЕЊЕ ЛАБОРАТОРИЈЕ

За постављање дијагнозе и праћење тока болести, потребно је узети у обзир карактеристике пацијента, тренутну клиничку слику, ранија и тренутна обољења или патолошка стања,

Болница Бијељина	Страна 7 од 7	Издање:	Важи од:	МП-10-049
		1	2024-12-24	

терапију коју пацијент прима и др., како би се лабораторијски налаз исправно интерпретирао. Одређивање tPSA има значајну улогу у детекцији метастатске или перзистентне болести код пацијената након хируршког или медикаментног лијечења карцинома простате. Стално повећане вредности или скок вриједности tPSA након лијечења указују на повратак или резидуалну болест. Одређивање tPSA је прихваћено као допунски тест у праћењу пацијената са карциномом простате.

Повишеневриједности: >4,0 µg/L

Сниженевриједности: /

19. ПОТЕНЦИЈАЛНИ ИЗВОРИ ВАРИЈАЦИЈА

Егзогени фактори варијабилности за одређивање tPSA су аутоантитијела у хуманом серуму (хумана анти-мишја антитела, НАМА; хетерофилна антитела-пацијенти који су свакодневно у контакту са животињама или производима серума животиња могу да буду склони овој интерференцији) која реагују са имуноглобулинима реагенса, те привидно повећавају tPSA.

20. РЕФЕРЕНЦЕ

1. Total PSA тест, Упутство произвођача за одређивање totalPSA на Alinityci анализаторима - преведено на српски језик, 2023.
2. Мајкић-Синг Н. (2006). Медицинска биохемија, друго допуњено издање. Друштво медицинских биохемичара Србије, Београд
3. Хоновић, Л. (2013). Зашто нам је важна и како проводити квалитетну пријеманалитичку фазу лабораторијске дијагностике? Гласник пулске болнице, 10 (10), 21-25.
4. Architect System Operations Manual. Abbott Laboratories, 2013.
5. Ћорић, Ј. (2014). Контрола квалитете рада у лабораторијској медицини. Факултет здравствених студија. Сарајево.
6. Безбједносни лист-Alinity i Total PSA Reagent Kit. Abbott Laboratories, 2023.