

Instructions for use
PAP ELISA

Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit

PAP ELISA

English

NAME AND INTENDED USE

The PAP ELISA is a solid phase enzyme-linked immuno-sorbent assay. This test provides quantitative measurement of human prostatic acid phosphatase (PAP) in serum.
(For Professional Use Only)

SUMMARY AND EXPLANATION OF TEST

The phosphatases include two main types. The alkaline phosphatase has a pH optimum of about 9 while acid phosphatase (AcP) has its optimal activity at a pH of about 5^{1, 2}. The AcP, first demonstrated in the urine in 1925, was found to be much more prevalent in male than in female urine². Prostatic acid phosphatase (PAP) enzyme activity was found to be localized in organs of the male genital tract^{2, 3}. The presence of PAP in sera of patients with prostatic cancer was first demonstrated by Gutman⁴. It was shown that PAP concentration was elevated in many men with primary prostatic carcinoma and metastatic lesions of the prostate^{4, 5}.

The release of PAP into the blood stream by primary or metastatic carcinoma of the prostate may provide the clinician with a means of following remission or relapse of a prostatic malignancy^{5, 6}. Therefore, sensitive and accurate measurement of serum PAP is essential in monitoring the effectiveness of various therapeutic treatments^{5, 9}.

Because moderate elevation of serum PAP is observed to accompany many nonprostatic diseases, a specific assay for determination of PAP is established⁷. The current methodologies for determination of PAP activity using the colorimetric methods^{8, 9} and immunochemical methods¹⁰ have many limitations.

This PAP ELISA provides an enzyme immunoassay system and establishes an ELISA method for quantitative measurement of PAP in human serum¹¹.

PRINCIPLE OF THE ASSAY

The PAP ELISA is a solid phase enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The wells are coated with specific anti-PAP antibodies. The Samples, Standards and Controls are incubated in the wells and bound with enzyme conjugate which is a mixture of anti-PAP antibodies with different affinity toward epitopes of PAP molecule and chemically conjugated with horseradish peroxidase. Unbound enzyme conjugate is washed off. The amount of bound peroxidase is proportional to the concentration of the PAP present in the Samples, Standards and Controls. Upon addition of the TMB substrate, the intensity of color developed is proportional to the concentration of PAP.

MATERIAL PROVIDED

W 96

TM E-4231 Coated Wells

Rabbit anti-PAP antibodies coated wells, 96 wells.

C ONJUGATE

TM E-4240 Enzyme Conjugate

(11 ml) Mouse IgG (anti-PAP) conjugated to horseradish peroxidase

D ILUENT

TM E-4260 Sample Diluent/Standard A

(11 mL)

The sample diluent is also used as zero standard (standard A)

Standards

	Cat. no.	Standard	Concentration	Volume/Vial
S TANDARD B	TM E-4202	Standard B	1 ng/ml	0.75 ml
S TANDARD C	TM E-4203	Standard C	3 ng/ml	0.75 ml
S TANDARD D	TM E-4204	Standard D	5 ng/ml	0.75 ml
S TANDARD E	TM E-4205	Standard E	15 ng/ml	0.75 ml
S TANDARD F	TM E-4206	Standard F	30 ng/ml	0.75 ml

In BSA-containing diluent

S USTRATE

TM E-0055 TMB Solution

(11 mL): Buffer solution containing hydrogen peroxide and TMB.

W ASH-CONC

TM E-0030 Wash Conc.

(Wash Buffer concentrate 100X) (10 mL): Prepare working washing solution by adding 10 mL wash buffer concentrate into 990 mL distilled water.

S TOP-SOLN

TM E-0080 Stopping Reagent:

(Stop Solution) (6 mL) 2 M HCl

Well holder: for securing wells.

Package Insert.

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

1. Micro-well reader.
2. Disposal tips and pipettor of 25 µL and 100 µL.
3. Quality controls such as Bio-Rad Lyphocheck were recommended

WARNING AND PRECAUTION

1. PAP ELISA is designed for in Vitro Diagnostic Use only.
2. The Components in the kits are intended for usage as an integral unit. The components from different lots should not be mixed, and not be used beyond expiration date.
3. The material should be used in a designated work area, the bench surface should be cleaned with detergent and the contaminated materials should be disposed properly.
4. Some components have been tested using FDA-approved methods and has been found negative for antibody to human immuno-deficiency virus (HIV-I, HIV-II), antibody to Hepatitis C and Hepatitis B surface antigen (HBsAg). No known test method can offer total assurance that HIV-I, HIV-II, Hepatitis B & C virus or other infectious agents are absent. Handle these reagents as if they were potentially infectious. Information on handling human serum is provided in the CDC/NIH manual ABiosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories@ (U.S.A. HHS publication No. (NIH 88-8395.)
5. Avoid microbial contamination of reagents when removing aliquots from the vials.

STORAGE AND STABILITY

1. Store the kits at 2 - 8 °C in a refrigerator.
2. Keep micro-wells in a dry bag with desiccants.
3. The reagents are stable until expiration of the kit.
TMB Solution should be colorless; if the solution turns blue, it must be replaced.
Do not expose these reagents to strong light during storage usage.
If reagent is turbid or contains precipitates, contact the technical support.

SPECIMEN AND COLLECTION

Collect blood by venipuncture, allow to clot, and separate the serum by centrifugation at room temperature. Serum is required for the PAP ELISA, and do not add sodium azide as preservative. PAP is unstable at 4 °C and 20 °C⁸. Samples should not be stored at room temperature or 4 °C for more than 24 hours. Serum samples are recommended to be frozen for longer storage. Avoid repeated freezing and thawing of serum samples.

PREPARATION FOR ASSAY

1. Bring all reagents and samples to room temperature (24 °C ± 3 °C) and shake gently before beginning the test. Have all reagents and samples ready before the start of the assay. Once the test is begun it must be performed without any interruption to get the most reliable and consistent results.
2. Use new disposable tips for each specimen.

ASSAY PROCEDURE

1. Secure the desired number of coated wells in the holder.
2. Dispense 25 µL of standards, controls or serum samples into the appropriate wells.
3. Dispense 100 µL of enzyme conjugate into wells. Incubate for 60 minutes at room temperature.
4. Remove incubation mixture and rinse the wells 5 times with wash buffer (300 µL/well /each rinse).
5. Dispense 100 µL of TMB Solution into each well and incubate for 30 minutes at room temperature.
6. Stop reaction by adding 50 µL of Stop Solution into each well.
7. Read O.D. at 450 nm with a microwell reader in 5 minutes .

PROCEDURE NOTE

1. Wash the microwells and remove washing buffer thoroughly.
2. Pipet all reagents and samples into bottom of the well. Vortex-mixing or shaking is not required.
3. Absorbance is a function of the time and temperature of incubations. It is recommended to have reagents, samples and needed wells ready for ensure the equal elapsed time for each pipetting without interruption.
4. For the same reason run no more than 20 patient samples with a set of reference standards in duplicate for each assay.
5. If a serum specimen contains greater than 30 ng/ml of PAP, the sample must be diluted with sample diluent and re-assayed as described in the assay procedure.

QUALITY CONTROL

Good laboratory practices include the use of control specimens to ensure that all reagents and protocols are performing properly. PAP ELISA does not include serum controls. Bio-Rad Lyphocheck series control serum is recommended.

CALCULATION OF RESULTS

1. Plot the concentration (X) of each reference standards against its absorbance (Y) on a full logarithmic graph paper.
2. Obtain the PAP value of patient by reference to the standard curve as follows: (These data are for demonstration purpose only and must not be used in place of data generated for each assay).

Well No.	Description (ng/mL)	Absorbance 450 nm	PAP (ng/mL)
A1	0	0.000	
B1	(Blank)	0.000	
A2	1	0.102	
B2		0.089	
A3	3	0.215	
B3		0.241	
A4	5	0.371	
B4		0.383	
A5	15	1.019	
B5		1.039	
A6	30	2.054	
B6		2.060	
A7	PATIENT A	1.653	23.19
B7		1.455	

EXPECTED VALUE

1. Normal serum concentrations of prostatic acid phosphatase in men have been reported to range from zero to 5 ng/mL¹². Elevated serum concentrations have been observed frequently in patients with prostatic carcinoma and metastatic lesions of the prostate^{4, 5, 12}.
2. A clinical study of the PAP ELISA was conducted and results are summarized as following:
 - a. Serum samples from 100 apparently healthy men were assayed, and 99% of the observations were less than 3 ng/mL.
 - b. Serum samples from 82 patients with benign Hypertrophy (BPH) were assayed and 79% of observations were less than 3 ng/mL.
 - c. Serum samples from 51 patients with prostatic carcinoma (PC) were assayed and 80% of observations were higher than 3 ng/mL.
3. Elevated PAP levels can be an indication of the presence of prostate cancer, they can also be the result of some other prostate diseases such as BPH; therefore, the test must be used in conjunction with a digital rectal examination (DRE) and that if either test is positive. Confirmatory testing with transrectal ultrasound and biopsy is needed to diagnose prostate cancer. Conversely, low PAP levels do not necessarily indicate an absence of prostate cancer.

LIMITATION

1. For diagnostic purpose, the PAP values should be used as an adjunct to other data available to the physician.
2. The ELISA kit is designed to avoid "hook effect" up to 1000 ng/mL.
3. Samples with PAP level above 30 ng/mL should be diluted to obtain accurate value.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

ACCURACY

Recovery studies were performed by mixing an aliquot of pooled serum and PAP Standards. The PAP values were measured and percentage of recovery determined.

Initial Values ng/mL	Concentration Spiked ng/mL	Expected Value ng/mL	Observed Values ng/mL	Recovery (%)
A: 6.5	5	5.7	5.8	102
B: 6.5	30	18.2	18.1	99
C: 21	5	13	12.9	99
D: 21	30	25.5	25.8	101

PRECISION

Intra-assay and inter-assay coefficient of variation were evaluated at three different pooled serum samples.

Intra-assay	Pool A	Pool B	Pool C
N	10	10	10
Mean (ng/mL)	1.01	17.2	29.1
S.D. (ng/mL)	0.09	0.99	1.8
C.V. (%)	8.9	5.7	6.2

Inter-assay	Pool A	Pool B	Pool C
N	10	10	10
Mean (ng/mL)	1.11	18.7	30.1
S.D. (ng/mL)	0.06	0.98	1.91
C.V. (%)	5.4	5.2	6.3

SPECIFICITY













The test is specific for human PAP.

Cross-reactivity with other serum proteins, human hormones and the tumor makers were not found.

MINIMAL DETECTABLE CONCENTRATION

The minimal detectable concentration of PAP is defined as that concentration of prostatic acid phosphatase which corresponds to the absorbance that is two standard deviations greater than the mean absorbance value of 20 replicate determinations of the zero diluent.

Symbols:

 Storage temperature	 Manufacturer	 Contains sufficient for <n> tests
 Expiry date	 Batch code	 For in-vitro diagnostic use only!
 Consult instructions for use	 Content	 CE labelled
 Caution	 Catalogue number	 For research use only!

VERWENDUNG

Der PAP ELISA dient der quantitativen Bestimmung von humaner prostataspezifischer saurer Phosphatase (PAP) in Serum

Deutsch

KLINISCHE BEDEUTUNG

Die Prostataspezifische saure Phosphatase (PAP) ist Bestandteil der exokrinen Funktion der Prostata. Die Enzymaktivität der PAP wurde daher zuerst im Urin von Männern gemessen und in den Organen des männlichen Genitalapparates (2) lokalisiert.

Gutmann und seine Mitarbeiter sehen in der PAP einen wichtigen Tumormarker bei Patienten mit Prostatakrebs, da Untersuchungen erhöhte Serum-PAP-Konzentrationen bei vielen Männern mit primärem Prostatakarzinom und metastatischen Läsionen der Prostata (4) ergeben hatten. Im Rahmen der malignen Transformation von Drüsenzellen der Prostata kommt es zu einem vermehrten oder überhaupt dem erstmaligen Auftreten der PAP in die periphere Blutbahn.

TESTPRINZIP

Es handelt sich um einen Solid-Phase-Test. Die Vertiefungen sind mit Anti-PAP-Antikörpern beschichtet. Standards, Kontrollseren und Patientenproben werden in die beschichteten Vertiefungen pipettiert und inkubiert mit Enzymkonjugat (mit Meerrettichperoxidase konjugierte -Anti-PAP-Antikörper, die eine hohe Affinität für unterschiedliche Epitope des PAP-Moleküls aufweisen). Ungebundenes Enzymkonjugat wird durch ein Waschverfahren entfernt.

Nach Hinzufügen von Substrat und Chromogen entwickelt sich eine blaue Farbe. Die Intensität der Farbentwicklung in den einzelnen Vertiefungen ist proportional zur jeweiligen PAP-Konzentration. Durch Hinzugabe einer Stopplösung wird die Enzymreaktion gestoppt.

Dann wird die Extinktion bei 450 nm spektrophotometrisch gemessen. Anhand der Extinktionswerte der Standards wird eine Eichkurve erstellt, aus der die PAP-Konzentration der Patientenproben durch Interpolation ermittelt werden kann.

BESTANDTEILE DES KITS

WELLS 96

TM E-4231 Coated Wells

Mit PAP-Antikörpern beschichtet, 96 Vertiefungen.

CONJUGATE

TM E-4240 Enzyme Conjugate

Maus IgG (anti-PAP), mit Meerrettichperoxidase konjugiert

DILUENT

TM E-4260 Sample Diluent/Standard A

(11 mL), Probenverdünner

Der Probenverdünner wird gleichzeitig auch als Null-Standard verwendet

Standards

	Cat. no.	Standard	Konzentration	Volumen/Flasche
STANDARD B	TM E-4202	Standard B	1 ng/ml	0.75 ml
STANDARD C	TM E-4203	Standard C	3 ng/ml	0.75 ml
STANDARD D	TM E-4204	Standard D	5 ng/ml	0.75 ml
STANDARD E	TM E-4205	Standard E	15 ng/ml	0.75 ml
STANDARD F	TM E-4206	Standard F	30 ng/ml	0.75 ml

in BSA

SUBSTRATE

TM E-0055 TMB Solution

(11 mL): Pufferlösung, die Wasserstoffperoxid und TMB enthält.

WASH-CONC

TM E-0030 Wash Conc.

(Waschpufferkonzentrat 100X) (10 mL): Den 100-fach konzentrierten Wash Buffer (10 mL) mit 990 mL destilliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 1000 mL verdünnen.

STOP-SOLN

TM E-0080 Stopping Reagent:

(Stopplösung) (6 mL) 1 Fläschchen, gebrauchsfertig; enthält 2 M HCl

Plattenhalter

Gebrauchsanweisung

ERFORDERLICHE MATERIALIEN, DIE NICHT IM KIT ENHALTEN SIND

- 1. Mikrotiterplattenlesegerät mit 450 nm Filter
- 2. Präzisionspipetten für 25 und 100 µL
- 3. Kontrollen (z.B. Biorad Lyphocheck)

VORSICHTSMAßNAHMEN UND EMPFEHLUNGEN

- NUR FÜR DEN GEBRAUCH ALS IN-VITRO-DIAGNOSTIKUM
- Die Bestandteile dieses Kits sind zur Verwendung als Einheit bestimmt und sollten nicht mit Bestandteilen von anderen Chargen ausgetauscht werden.
- Die zur Herstellung der Kontrollseren verwendeten Humanblutkomponenten sind getestet worden und reagierten für HbsAG und HIV I negativ. Da keine bekannte Testmethode die absolute Gewissheit bieten kann, dass aus menschlichem Blut hergestellte Produkte Viruskrankheiten nicht übertragen, sollten diese Kontrollseren wie potentiell infektiöses Material gehandhabt werden.

LAGERUNG

Alle Kitkomponenten bei 2 °C – 8 °C lagern.

Röhrchen stets gut verschlossen halten, da sonst die Gefahr einer Kontamination oder Konzentrationsänderung durch Verdunstung oder Verdünnung besteht.

Mikrotiterstrips gut verpackt mit Trockenmittel lagern.

Die Reagenzien bleiben bis zu dem auf dem Kit vermerkten Haltbarkeitsdatum stabil.

Die *TMB Solution* sollte farblos sein. Nimmt die Lösung eine blaue Farbe an, muss sie ersetzt werden.

Diese Reagenzien vor starker Lichteinwirkung schützen.

VORBEREITUNG UND AUFBEWAHRUNG DER PROBEN

Serum

Blut durch Venenpunktion entnehmen, gerinnen lassen. Um Hämolyse zu vermeiden, das Serum möglichst rasch durch Zentrifugation bei Raumtemperatur abtrennen. In Aliquots aufteilen.

PAP ist bei 4 °C und bei 20 °C instabil. Die Proben sollten deshalb nicht länger als 24 Stunden bei 4 °C oder bei 20 °C gelagert werden.

Bei längerer Aufbewahrung Proben sofort nach Entnahme in Aliquots aufteilen und bei -20 °C tiefgefrieren.

Wiederholtes Einfrieren und Auftauen ist zu vermeiden.

VORBEREITUNG DES TESTES

Alle Reagenzien vor Gebrauch auf Raumtemperatur (24 °C ± 3 °C bringen und gut durchmischen.

Sobald der Test begonnen wurde, sollten alle Schritte ohne Unterbrechung durchgeführt werden, um zuverlässige und beständige Ergebnisse zu erhalten.

Für jede Probe eine neue Pipettenspitze verwenden.

TESTDURCHFÜHRUNG

1.	Die benötigte Anzahl an beschichteten Strips in der Halterung befestigen.
2.	25 µL Standards, Kontrollen und Patientenproben in die entsprechenden Vertiefungen pipettieren.
3.	100 µL <i>Conjugate</i> in alle Vertiefungen geben. 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
4.	Die Inkubationslösung abschütten. Die Vertiefungen 5-mal mit <i>Washing Conc</i> waschen (300 µL/Well).
5.	100 µL <i>TMB Solution</i> in jede Vertiefung geben. 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
6.	Die Enzymreaktion durch Hinzufügen von 50 µL <i>Stopping Reagent</i> in jede Vertiefung stoppen.
7.	Extinktion innerhalb 5 Minuten bei 450 nm bestimmen.

ANMERKUNGEN ZUR TESTDURCHFÜHRUNG

Um optimale Resultate zu erzielen, ist es sehr wichtig, dass die Mikrovertiefungen gründlich gespült und auch die letzten Reste der Waschlösung entfernt werden.

Alle Reagenzien und Proben auf den Boden der Vertiefungen pipettieren.

Alle Kontrollseren und Proben sollten doppelt bestimmt werden.

Die Extinktion hängt von der Inkubationszeit und -temperatur ab. Ehe man die Tests beginnt, sollten alle Reagenzien bereitgestellt, Verschlüsse entfernt sein, usw.

Wenn sich beim ersten Test zeigt, dass eine Serumprobe mehr als 30 ng/mL PAP enthält, muss die Probe mit Nullstandard verdünnt und neu analysiert werden.

QUALITÄTS-KONTROLLE

Es wird empfohlen, Kontrollproben gemäß den nationalen gesetzlichen Bestimmungen einzusetzen. Durch die Verwendung von Kontrollproben wird eine Tag-zu-Tag Überprüfung der Ergebnisse erzielt. Es sollten Kontrollen sowohl mit normalem als auch pathologischem Level eingesetzt werden.

Wir empfehlen die Verwendung von Bio-Rad Lyphochek-Kontrollen.

BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

1. Tragen Sie die Extinktionsmittelwerte der einzelnen Standards (y-Achse) gegen die entsprechende PAP-Konzentration (x-Achse) graphisch auf (logarithmisches bzw. semilogarithmisches Millimeterpapier).
2. Tragen Sie den mittleren Extinktionswert jeder Patientenprobe ein und bestimmen Sie die entsprechende PAP-Konzentration durch einfache Interpolation.

Sie können auch automatische Datenverarbeitungsprogramme verwenden.

Beispiel:

Well No.	Identifikation	OD 450 nm	PAP (ng/mL)
A1	0	0.000	
B1	(Blank)	0.000	
A2	1 ng/mL	0.102	
B2		0.089	
A3	3 ng/mL	0.215	
B3		0.241	
A4	5 ng/mL	0.371	
B4		0.383	
A5	15 ng/mL	1.019	
B5		1.039	
A6	30 ng/mL	2.054	
B6		2.060	
A7	PATIENT A	1.653	23.19
B7		1.455	

ERWARTETE WERTE

Jedes Labor sollte seinen eigenen Normalbereich festlegen.

1. In der Literatur finden sich Normwerte im Bereich von 0 – 5 ng/mL¹². Erhöhte Konzentrationen wurden teilweise bei Patienten mit Prostata-Karzinom und metastatischen Bereichen in der Prostata beobachtet^{4, 5, 12}.
2. Es wurde eine klinische Untersuchung des PAP ELISA durchgeführt. Die Ergebnisse werden nachfolgend zusammengefasst:
 - a. Getestet wurden Serumproben von 100 gesunden Männern. 99% der Werte lagen unter 3 ng/mL.
 - b. Proben von 82 Patienten mit leichter Prostatahypertrophie (BPH) wurden getestet. 79% der Werte lagen unter 3 ng/mL
 - c. Proben von 51 Patienten mit Prostatakarzinom (PC) wurden getestet. 80% der Werte lagen über 3 ng/mL.

- Erhöhte PAP-Werte können ein Hinweis sein auf ein Prostatakarzinom. Sie können aber ebenso auftreten bei anderen Prostata-Erkrankungen (z.B. BPH). Aus diesem Grund kann das Ergebnis immer nur ein Teil der Gesamtdiagnostik (Digitale rektale Untersuchung, Ultraschall, Biopsie) sein. Auf der anderen Seite bedeutet ein niedriger PAP-Wert nicht zwingend die Abwesenheit eines Prostata-Karzinoms.

GRENZEN DES TESTES

- Therapeutische Konsequenzen sollten keinesfalls nur aufgrund von Laborergebnissen erfolgen, Jedes Laborergebnis ist nur ein Teil des klinischen Gesamtbildes eines Patienten.
- Der Test ist so angelegt, dass bei PAP-Konzentrationen bis zu 1000 ng/mL kein „High Dose Hook“-Effekt auftritt.
- Proben mit einem PAP-Spiegel oberhalb des Referenzbereiches (30 ng/mL) sollten verdünnt werden, um genaue Werte zu erhalten.

LEISTUNGSMERKMALE

Genauigkeit

Ausgangskonz. ng/mL	zugegegen Konz. ng/mL	Erwartet ng/mL	Gemessen ng/mL	Wiederfindung (%)
A: 6.5	5	5.7	5.8	102
B: 6.5	30	18.2	18.1	99
C: 21	5	13	12.9	99
D: 21	30	25.5	25.8	101

Präzision







Inter-Assay- und Intra-Assay-Variationskoeffizient wurden durch drei verschiedene gepoolte Proben ermittelt.

Intra-Assay	Pool A	Pool B	Pool C
N	10	10	10
Mittelwert (ng/mL)	1.01	17.2	29.1
S.D. (ng/mL)	0.09	0.99	1.8
V.K. (%)	8.9	5.7	6.2
Inter-Assay	Pool A	Pool B	Pool C
N	10	10	10
Mittelwert (ng/mL)	1.11	18.7	30.1
S.D. (ng/mL)	0.06	0.98	1.91
V.K. (%)	5.4	5.2	6.3

Spezifität

Der ELISA ist spezifisch für humanes PAP. Kreuzreaktionen mit anderen Serumproteinen, humanen Hormonen und Tumormarkern konnten nicht nachgewiesen werden.

Symbole:

	Lagertemperatur		Hersteller		Enthält Testmaterial für <n> Teste
	Verwendbar bis	LOT	Chargennummer	IVD	In vitro Diagnostikum
	Vor Gebrauch Packungsbeilage lesen	CONT	Inhalt	CE	CE gekennzeichnet
	Achtung	REF	Katalog-Nummer	RUO	Nur für Forschungszwecke