



DCM137-2
Ed. 01/2015

Total PSA

per analisi di routine

Saggio immunoenzimatico per la determinazione quantitativa della PSA (Prostata Specific Antigen) totale in siero e plasma umano

IVD



LOT

Vedere etichetta esterna

2°C 8°C



$\Sigma = 96$ test

REF DKO137

DESTINAZIONE D'USO

Il kit Diametra Total PSA ELISA è utilizzato per la determinazione quantitativa dell'antigene prostatico specifico totale (tPSA) in siero o plasma umano. La misura dei livelli di PSA totale è utilizzata per stimare il rischio di carcinoma della prostata negli uomini, in combinazione con l'esplorazione rettale digitale (DRE), o per monitorare l'efficacia del trattamento nei pazienti con carcinoma della prostata.

1. SIGNIFICATO CLINICO

Il cancro alla prostata è il tipo più frequente di tumore scoperto nell'uomo ed è la seconda causa di morte per tumore nei maschi. Fino a poco tempo fa, l'esplorazione rettale digitale (DRE) è stata spesso utilizzata come unica modalità di diagnosi per l'individuazione del tumore alla prostata nelle fasi iniziali. Negli ultimi anni la determinazione dei livelli sierici di PSA è diventato il metodo più accettato per migliorare la specificità diagnostica del DRE. Anche se è una proteina tessuto-specifica e non è solo tumore-specifica, la PSA è diventata il marcatore più importante per il carcinoma alla prostata, mostrando una specificità migliore di altri marcatori biochimici utilizzati in questo contesto (PAP, fosfatasi alcalina totale, l'antigene carcinoembrionario, ecc).

Nel 1979, Wang et al isolarono un antigene specifico per il tessuto prostatico normale e chiamarono questa proteina PSA. Come dimostrato da studi immunoistologici, la PSA è localizzata nel citoplasma delle cellule acinose della prostata, dell'epitelio duttale e nella secrezione del lumina duttale, presente nei tessuti della prostata normali, benigni iperplastici e maligni, così come nel cancro metastatico della prostata e nel liquido seminale. Se l'integrità strutturale della prostata è alterata e/o le dimensioni della ghiandola aumentano, la quantità di PSA nel plasma sanguigno può diventare elevata. Un aumento dei livelli di PSA a valori superiori di 3-4 ng/mL è stato riportato per i pazienti con ipertrofia prostatica benigna (BPH) o con carcinoma alla prostata. A questa soglia, sono consigliati esami di follow-up che permettono di distinguere tra queste due condizioni.

La determinazione dei livelli sierici di PSA non è importante solo per lo screening dei pazienti con cancro alla prostata, ma anche per monitorare i pazienti che sono stati trattati per questa patologia. In questo caso, le regolari misurazioni di PSA sono un importante strumento per esaminare l'efficacia potenziale e reale della chirurgia o di altre terapie. Un aumento di PSA nei pazienti dopo prostatectomia radicale o radioterapia possono consentire un precoce rilevamento di carcinoma residuo o ricorrente

2. PRINCIPIO DEL METODO

Questo kit è un saggio immunoenzimatico in fase solida (ELISA), basato sul principio del sandwich.

I pozzetti della micropiastro sono rivestiti con un anticorpo diretto verso un epitopo della PSA antigenica. Un'aliquota di siero del paziente viene incubato nei pozzetti coattati insieme ad un secondo anticorpo coniugato ad un enzima (E-Ab), diretto verso un'altra regione della molecola di antigene. Dopo incubazione, la frazione E-Ab non legata è lavata via. La quantità di E-Ab legato è proporzionale alla concentrazione di antigene nel campione. Dopo aver aggiunto la soluzione di substrato, l'intensità del colore sviluppato è proporzionale alla concentrazione di antigene presente nel campione. Le densità ottiche dei calibratori misurate sono utilizzate per costruire una curva di calibrazione contro la quale vengono calcolate le concentrazioni sconosciute dei campioni.

3. REATTIVI, MATERIALI E STRUMENTAZIONE

3.1. Reattivi e materiali forniti nel kit

1. PSA Calibrators (6 flaconi, 0.5 mL ciascuno)

CAL0 / Sample Diluent (10 mL) REF DCE002/13706-0

CAL1 REF DCE002/13707-0

CAL2 REF DCE002/13708-0

CAL3 REF DCE002/13709-0

CAL4 REF DCE002/13710-0

CAL5 REF DCE002/13711-0

Contengono un preservante privo di mercurio.

2. Controlli (2 flaconi, 0.5 mL ciascuno)

La concentrazione è indicata sul Certificato di Analisi.

Contiene un preservante privo di mercurio.

Low Control REF DCE045/13701-0

High Control REF DCE045/13702-0

3. Coated Microplate (1 micropiastro breakable)

Anticorpo monoclonale anti PSA assorbito sulla micropiastro

REF DCE002/13703-0

4. Enzyme Conjugate (1 flacone, 12 mL)

Anticorpo anti PSA coniugato a perossidasi di rafano (HRP). Contiene un preservante privo di mercurio.

REF DCE002/13702-0

5. Substrate Solution (1 flacone, 12 mL)

Contiene TMB (tetramethylbenzidine) e H₂O₂

REF DCE004/13704-0

6. Stop Solution (1 flacone, 14 mL)

Contiene acido solforico (H₂SO₄) 0.5M (evitare il contatto, può causare irritazioni e bruciature)

REF DCE005/13705-0

3.2. Reattivi necessari non forniti nel kit

- Acqua distillata.
- Micropipette di precisione (volume: 25 µL e 100 µL) con puntali monouso.
- Fotometro ELISA con filtri a 450 nm e 630 nm.
- Timer con range a 60 minuti o superiore.
- Lavatore di micropiastre (opzionale).
- Vortex o strumenti di miscelazione simili.
- Contenitore per la corretta gestione dei rifiuti e dei campioni dopo l'uso.

4. CONSERVAZIONE E STABILITA'

- Conservare il kit e i componenti a 2-8°C
- Portare a temperatura ambiente (18-25°C) almeno 30 minuti prima dell'uso. Dopo l'uso rimettere in frigorifero. Evitare la conservazione a temperatura ambiente per molto tempo.
- Non utilizzare il kit o i componenti dopo la data di scadenza. Per la data di scadenza del kit originale imballato vedere l'etichetta del kit.
- Chiudere le bottiglie subito dopo l'uso.
- Conservare la piastra incluso l'essiccante nell'apposita busta con zip-lock. Le strip non utilizzate devono essere sempre conservate in questa condizione.
- Assicurarsi che i componenti del kit non congelino.

5. PRECAUZIONI

- I kit ELISA sono solo per uso diagnostico in vitro da parte di professionisti.
- I campioni di siero e plasma devono essere trattati come materiali potenzialmente infettivi. Indossare guanti ed indumenti da laboratorio quando si maneggiano i campioni. Non mangiare, bere o fumare nelle aree in cui vengono gestiti i campioni o i reagenti del kit. Non pipettare con la bocca. In caso di contatto con la pelle, lavare con un sapone germicida e acqua abbondante. Consultare un medico se indicato.
- Gli Standard di PSA ed i controlli sono di origine umana. Essi sono stati testati e confermati negativi per HIV, HBsAg e HCV. Tuttavia, tutti i Calibratori dovrebbero essere trattati come materiali potenzialmente infetti.
- Dato il carattere potenzialmente infettivo dei campioni e dei componenti del kit, tutti i materiali che sono venuti a contatto con queste componenti dovrebbero essere sterilizzati e smaltiti secondo le normative locali. Questo include anche i rifiuti liquidi.
- I reagenti del kit contengono conservanti, TMB, H₂O₂ o acido solforico e possono essere dannosi se ingeriti. Il contatto diretto con la pelle o la mucosa dovrebbe essere evitato. In caso di contatto con la pelle, lavare abbondantemente con acqua e consultare un medico se necessario.
- La Stop Solution contiene H₂SO₄. Poiché l'H₂SO₄ utilizzata per bloccare la reazione del colore è corrosiva, la strumentazione utilizzata per la dispensazione deve essere accuratamente pulita dopo l'uso.
- Non scambiare i reagenti di lotti o fornitori diversi.
- Evitare la contaminazione di reagenti o campioni usando puntali usa e getta.
- Non utilizzare il kit se la confezione della micropiastra o le bottiglie sono state danneggiate.

6. GUIDA PER LA RACCOLTA, LA PREPARAZIONE E LA CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

6.1. Raccolta del campione

I campioni di sangue vengono raccolti per venipuntura. Poiché diversi fattori possono influenzare il livello di PSA nel sangue, i medici devono assicurarsi che il paziente abbia evitato le seguenti condizioni prima di prendere il campione di sangue.

Le seguenti condizioni possono portare ad un aumento dei livelli di PSA:

- bicicletta
- rapporto sessuale (eiaculazione)
- manipolazione della prostata durante le visite mediche come DRE, ecografia prostatica transrettale, ecc
- prostatite
- disfunzione epatica

Le seguenti condizioni possono portare ad una diminuzione dei livelli di PSA:

- assunzione di inibitori per la 5-alfa-reduttasi, antiandrogeni, o GnRH- analoghi

6.2. Preparazione del campione

La preparazione dei campioni di siero o plasma viene eseguita secondo le tecniche standard. Siero o plasma deve essere preparati al più presto per evitare l'emolisi e migliorare la stabilità della PSA.

6.3. Conservazione dei campioni

Per il dosaggio possono essere utilizzati siero o plasma freschi.

Se non si utilizzano immediatamente, i campioni possono essere conservati a 2-8°C per 1 settimana. In caso di conservazione prolungata, congelare a -20°C. Evitare cicli ripetuti di congelamento e scongelamento dei campioni.

Nota

- I campioni fortemente lipemici o emolitici possono dare risultati analitici errati.
- I campioni devono essere esenti da contaminazioni microbiche.
- I campioni contenenti alti titoli di fattore reumatoide ed anticorpi umani anti-topo (HAMA) potrebbero fornire risultati errati.

7. PROCEURA DEL SAGGIO

7.1. Preparazione dei Calibratori (C₀...C₅)

I Calibratori sono calibrati contro il WHO 96/670 ed hanno le seguenti concentrazioni:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅
ng/mL	0	1,56	3,12	6,25	12,50	25,00

Contengono un conservante.

7.2. Procedura

Nota: si consiglia di effettuare tutte le misurazioni in duplicato. Per ogni serie di misurazioni dovrebbe essere eseguita una curva di calibrazione indipendente. Per ottenere i migliori risultati, è importante che le soluzioni siano sempre aggiunte ai pozzetti nello stesso ordine, al fine di minimizzare le variazioni nei tempi di incubazione.

- Prima dell'uso, portare tutti i reagenti, i Calibratori, i controlli e i campioni a temperatura ambiente (18-25°C).
- Verificare che tutti i componenti non siano scaduti e verificare che le bottiglie e la piastra (busta compresa) non siano danneggiate.

- Prelevare le strip necessarie, tenendo presente che tutte le misurazioni devono essere effettuate in duplicato. Documentare la posizione dei pozzetti e dei rispettivi campioni, Calibratori e controlli per garantire l'identificazione dopo il saggio. Riporre tutte le strip inutilizzate nella busta con la zip-lock insieme al sacchetto essiccante, sigillare e conservare a 2-8°C.
- I campioni con un valore previsto di PSA superiori a 25 ng/mL devono essere diluiti con il sample diluent.

Reagenti	Calibratore	Campione	Controlli
Calibratore C ₀ -C ₅	25 µL		
Controlli			25 µL
Campione		25 µL	
Incubare 5 minuti a temperatura ambiente (18-25°C).			
Enzyme Conjugate	100 µL	100 µL	100 µL
Miscelare bene muovendo la piastra sul tavolo (10 sec). Incubare 1 h a temperatura ambiente (18-25°C). Rimuovere la soluzione dai pozzetti per aspirazione o decantazione; per la decantazione, battere leggermente la piastra su carta assorbente per rimuovere il liquido residuo. Per il lavaggio riempire i pozzetti con acqua distillata e aspettare 15 secondi prima di rimuovere l'acqua; lavare 5 o 6 volte. <u>Procedura raccomandata:</u> lavare i pozzetti 6 volte con 250 µL di acqua distillata per pozzetto. Preferibilmente utilizzare una procedura di lavaggio automatizzata. Se si lava manualmente, fare attenzione che la soluzione di lavaggio rimanga in ogni pozzetto lo stesso tempo. Questo è necessario per ottenere valori di CV il più bassi possibile.			
Substrate Solution	100 µL	100 µL	100 µL
Incubare 20 minuti a temperatura ambiente (18-25°C) al buio.			
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL
Agitare delicatamente la micropiastra. Leggere l'assorbanza (OD) a 450 nm (azzerando a 630nm)			

8. CALCOLO DEI RISULTATI

1. Calcolare la media dei valori di assorbanza per ogni set di Calibratori, controlli e campioni dei pazienti.
2. Usando carta millimetrata, costruire una curva di calibrazione riportando l'assorbanza media ottenuta da ogni Calibratore contro la sua concentrazione, con il valore di assorbanza sull'asse verticale (Y) e la concentrazione sull'asse orizzontale (X).
3. Utilizzando il valore medio di assorbanza per ciascun campione, determinare la concentrazione corrispondente dalla curva di calibrazione.
4. Metodo automatico: i risultati nella IFU sono stati calcolati automaticamente utilizzando una curva 4 PL (4 parametri logistici). Il metodo 4 parametri logistici è il più idoneo. Altre funzioni di analisi dei dati possono dare risultati leggermente diversi.
5. La concentrazione dei campioni possono essere lette direttamente da questa curva di calibrazione. I campioni con concentrazione superiore a quella del calibratore più alto devono essere diluiti o refertati come > 25 ng/mL. Per il calcolo della concentrazione

deve essere preso in considerazione anche il fattore di diluizione.

8.1. Esempio di una tipica curva di calibrazione

I dati seguenti sono solo illustrativi e non devono essere utilizzati durante i dosaggi.

Calibratori	Densità ottiche (450 nm)
Calibratore 0 (0 ng/mL)	0.05
Calibratore 1 (1,56 ng/mL)	0.24
Calibratore 2 (3,12 ng/mL)	0.39
Calibratore 3 (6,25 ng/mL)	0.74
Calibratore 4 (12.5 ng/mL)	1.27
Calibratore 5 (25,0 ng/mL)	2.01

9. CONTROLLO QUALITÀ

- Si raccomanda che i controlli interni vengano utilizzati in duplicato in ogni analisi. I risultati dei controlli devono essere entro i limiti stabiliti e preferibilmente dovrebbero rappresentare livelli di concentrazione bassi, medi ed alti.
- Il rischio per il paziente è dovuto principalmente a risultati falsamente negativi intorno al valore di cut-off di PSA < 4,0 ng/mL. È quindi altamente consigliato convalidare il kit e il laboratorio attraverso processi esterni (ad es DGKC).

10. VALORI ATTESI E LIMITAZIONI DEL TEST

La soglia generalmente raccomandata per gli esami di follow-up è la seguente:

Valore di cut-off: 3,0-4,0 ng PSA / mL

Uomini in buona salute hanno in genere una concentrazione di PSA inferiore a 4,0 ng/mL. Se la concentrazione di PSA è pari o superiore a 4,0 ng/mL sono altamente raccomandati esami di follow-up. Questa concentrazione di PSA indica un rischio elevato di cancro alla prostata, ma potrebbe anche essere causato da BPH. Si prega di notare che la soglia di 4 ng/mL è solo un valore indicativo. In letteratura è riportato che le modifiche dovute a età e background etnologico potrebbero essere utili: ad esempio per uomini più giovani il limite dovrebbe essere inferiore a quello degli uomini anziani. Se possibile, è consigliabile per ogni laboratorio di stabilire i propri valori specifici che tengano in considerazione una popolazione indigena della zona dove si trova il laboratorio.

È importante tenere a mente che alcuni tumori della prostata non causano elevati livelli di PSA, pertanto le misurazioni di PSA non dovrebbero mai sostituire il DRE, ma devono essere usate solo in combinazione con il DRE.

Poiché elevati livelli di PSA potrebbero anche essere causati da condizioni non cancerose, seguire gli esami potrebbero aumentare la specificità diagnostica dei valori di t-PSA. In letteratura vengono indagate la densità della PSA, la velocità della PSA e la percentuale di f-PSA per t-PSA per migliorare la discriminazione tra le condizioni cancerose e non-cancerose, e ciò potrebbe essere utilizzato per ridurre biopsie prostatiche non necessarie. Ma solo una biopsia prostatica può chiaramente mostrare se un carcinoma della prostata è presente o meno.

Nota: i valori di PSA possono essere utilizzati solo per stimare il rischio di cancro. Essi devono sempre essere interpretati in combinazione con altri risultati

clinici e non devono essere utilizzati come unica base per la diagnosi del carcinoma prostatico.

11. CARATTERISTICHE DI PRESTAZIONE

11.1. Limite di deteazione

Il limite di deteazione per questo kit è 0.2 ng/mL.

11.2. Precisione

La precisione intra- ed inter-assay è stata stabilita analizzando tre sieri di pazienti con diverse concentrazioni di PSA. I risultati sono mostrati nelle Tabelle 1 e 2.

Tabella 1. *Intra-assay*

Pazienti	Numero di replicati	Media ng/mL	SD ng/mL	CV %
1	24	12.52	0.65	6.0
2	24	3.44	0.13	3.9
3	32	0.83	0.07	8.8

Tabella 2. *Inter-assay*

Pazienti	Numero di replicati	Media ng/mL	SD ng/mL	CV %
1	4	12.28	0.82	6.7
2	4	3.33	0.266	7.98

11.3. Recupero

Una quantità nota di PSA è stata aggiunta a tre sieri di pazienti ed è stata poi misurata la quantità recuperata. I risultati sono mostrati nella Tabella 3.

Tabella 3. *Recupero*

Campione	Valore atteso (ng/mL)	Valore osservato (ng/mL)	Recupero %
1	6.30	6.40	102
2	4.67	4.56	98
3	10.10	10.91	108

11.4. Specificità

Gli anticorpi utilizzati in questo kit sono altamente specifici per la PSA totale (PSA libera e PSA-ACT-complesso), con una reattività crociata relativamente bassa per altre proteine e polipeptidi, lipidi o agenti chemioterapici che potrebbero essere presenti nei campioni dei pazienti

Tabella 4. *Specificità*

Antigeni	Quantità aggiunta	Cross-reazione
Proteinse		
AFP	10 µg/mL	No
CEA	10 µg/mL	No
HCG	10 µg/mL	No
Lattoalbumina	10 µg/mL	No
PAP	1 µg/mL	No
Sostanze interferenti		
Bilirubina	0.2 mg/mL	No
Emoglobina*	0.1 mg/ml	No
Trigliceridi	15 mg/mL	No
Agenti chemioterapici		
Ciclofosfamide	800 µg/mL	No
Doxorubicina * HCl	20 µg/mL	No
Dietilstilbestrolo	2 µg/mL	No
Flutamide	10 µg/mL	No
Metotrexato	50 µg/mL	No

* a più alta concentrazione l'emoglobina dà valori di OD troppo elevati, pertanto i campioni emolitici dovrebbero essere evitati.

11.5. Effetto Hook

Il dosaggio è stato testato per verificare l'effetto gancio. Fino ad una concentrazione di PSA di 2000 ng/mL non è stato osservato nessun effetto gancio. Si prega di notare che se l'OD è fuori della gamma standard per i campioni ad alta concentrazione, per ottenere risultati corretti il campione deve essere diluito prima della misura successiva.

11.6. Correlazione

Il kit Diametra Total PSA ELISA è stato comparato con il kit Roche ElecSys Total PSA:

$$Y = 0.9644 \cdot X + 0.0741$$

In un secondo studio il kit Diametra Total PSA ELISA è stato comparato con un altro kit ELISA per la PSA marcato CE:

$$Y = 1.001 \cdot X, R^2 = 0.9704$$

12. ASPETTI GIURIDICI

12.1. Affidabilità dei risultati

Il test deve essere eseguito esattamente secondo le istruzioni del produttore per l'uso. Inoltre l'utente deve rigorosamente rispettare le regole GLP (Good Laboratory Practice) o di altre norme nazionali e/o leggi vigenti.

Questo è particolarmente rilevante per l'uso di reagenti di controllo. All'interno della procedura di prova, è importante includere sempre un numero sufficiente di controlli per validare l'accuratezza e la precisione del test.

I risultati del test sono validi solo se tutti i controlli sono all'interno del range specificato e se tutti gli altri parametri di prova sono anche all'interno delle specifiche del saggio. In caso di qualsiasi dubbio o preoccupazione contattare Diametra.

12.2. Conseguenze terapeutiche

Le conseguenze terapeutiche non dovrebbero mai essere basate solamente sui risultati di laboratorio, neanche se tutti i risultati sono in accordo con quanto indicato al punto 12.1. Ogni risultato di laboratorio è solo una parte del quadro clinico complessivo di un paziente.

Solo nei casi in cui i risultati di laboratorio sono in accettabile accordo con il quadro clinico complessivo del paziente devono essere decise conseguenze terapeutiche. Il risultato del test stesso non dovrebbe mai essere l'unico fattore determinante per decidere trattamenti terapeutici.

12.3. Responsabilità

Qualsiasi modifica del kit di prova e/o lo scambio o miscelazione di componenti di lotti diversi da un kit ad un altro potrebbe influenzare negativamente i risultati attesi e la validità della prova generale. Tali modifiche e/o scambi annullano qualsiasi tipo di richiesta di sostituzione.

I reclami presentati a causa di un'errata interpretazione dei risultati di laboratorio da parte dei clienti e soggetti al punto 12.2 sono anch'essi non validi. Indipendentemente da ciò, in caso di qualsiasi reclamo, la responsabilità del produttore non supera il valore del kit. Eventuali danni arrecati al kit per il test durante il trasporto non sono soggetti alla responsabilità del produttore.

13. BIBLIOGRAFIA

- Fritsche HA und RJ. Babalan Clin Chem (1993) Vol: 39: 1529-1529 Analytical performance goals for measuring prostate-specific antigen:
- Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaft (AWMF): Leitlinien der Deutschen Urologen: PSA-Bestimmung in der Prostatakarzinomdiagnostik (2003) <http://www.uni-duesseldorf.de/WWW/AWMF/II/uro1-36v.htm> (Stand Juli 2003)
- Hammerer P. and Huland H., Der Onkologe (1996), Vol 2: 218-223 Früherkennung des Prostatakarzinoms. Onkologe
- Milford Ward A. et al., Ann Clin Biochem (2001), Vol 38: 633-651 Prostate specific antigen: biology, biochemistry and available commercial assays.
- Price C. P. et al., Ann Clin Biochem (2001), Vol 38: 188-216 Pre-and post-analytical factors that may influence use of serum prostrate specific antigen and its isoforms in a screening programme for prostate cancer.
- Lange P et al., J Urol (1989) Vol 141:873 The value of serum prostate-specific antigen determinations before and after radical prostatectomy,
- Akdas et al. British J Uro (1997) Vol 79: 920-923 The role of free prostate specific antigen in the diagnosis of prostate cancer
- Thomas L (2008) Labor und Diagnose, TH-Books Verlagsgesellschaft 1342-1351

Ed. 01/2015

DCM137-2

DiaMetra S.r.l. Headquater: Via Calabria 15,
20090 SEGRATE (MI) Italy
Tel. +39-02-2139184
Fax +39-02-2133354

Manufactory: Via Pozzuolo 14
06038 SPELLO (PG) Italy
Tel. +39-0742-24851
Fax +39-0742-316197
E-mail: info@diametra.com



DCM137-2
Ed. 01/2015

Total PSA

for routine analysis

Enzyme immunoassay for the quantitative determination of total PSA (Prostate Specific Antigen) in human serum and plasma

IVD



LOT

See external label

2°C 8°C



Σ = 96 test

REF DKO137

INTENDED USE

Diametra Total PSA ELISA is used for the quantitative determination of total Prostate Specific Antigen (t-PSA) in human serum or plasma samples. The determination of total PSA levels is used to estimate the risk of prostate carcinoma in men in conjunction with digital rectal examination (DRE) or to monitor the effectiveness of prostate carcinoma treatment in patients.

1. CLINICAL SIGNIFICANCE

Prostate cancer is the most frequent type of cancer found in man and is the second cause of death due to cancer in males. Until recently, digital rectal examination (DRE) was frequently used as only diagnostic modality for the detection of early stages of prostate cancer. In the recent years the determination of serum PSA levels has become the most accepted method to improve the diagnostic specificity of DRE. Although PSA is a tissue specific protein and is not solely tumor specific, it has become the most important marker for prostate carcinoma, showing a better specificity than other biochemical markers used in this context (PAP, total alkaline phosphatase, carcinoembryonic antigen, etc.).

In 1979, Wang et al isolated a specific antigen for normal prostate tissue and called this protein PSA. As demonstrated by immunohistological studies, PSA is localized in the cytoplasm of prostate acinar cells, ductal epithelium and in the secretion on the ductal lumina, present in normal, benign hyperplastic and malignant prostate tissues as well metastatic prostate cancer and in seminal plasma. If the structural integrity of the prostate is disturbed and/or the gland size is increased, the amount of PSA in the blood plasma may become elevated. An elevation of PSA levels to values higher than 3-4 ng/ml has been reported for patients with either benign prostatic hypertrophy (BPH) or prostate carcinoma. At this threshold follow-up examinations that allow to differentiate between these two conditions are recommended.

The determination of PSA serum levels is not only important for the screening of patients for prostate cancer, but also for monitoring patients that have been treated for this disease. Here regular PSA measurements are an important tool to examine the potential and actual effectiveness of surgery or other therapies. An increase of PSA in patients after radical prostatectomy or radiotherapy may allow an earlier discovery of residual or recurrent carcinoma.

2. PRINCIPLE OF THE METHOD

This assay is a solid phase enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) based on the sandwich principle.

The microtiter wells are coated with an antibody, directed towards an epitope of an antigenic PSA. An aliquot of patient serum is incubated in the coated well with enzyme conjugated second antibody (E-Ab), directed towards a different region of the antigen molecule. After incubation the unbound E-Ab is washed off. The amount of bound E-Ab is proportional to the concentration of antigen in the sample. After adding the substrate solution, the intensity of colour developed is proportional to the antigen concentration in the sample. The measured ODs of the Calibrators are used to construct a calibration curve against which the unknown samples are calculated.

3. REAGENTS, MATERIALS AND INSTRUMENTATION

3.1. Reagents and materials supplied in the kit

1. PSA Calibrators (6 vials, 0.5 mL each)

CAL0 / Sample Diluent (10 mL) REF DCE002/13706-0

CAL1 REF DCE002/13707-0

CAL2 REF DCE002/13708-0

CAL3 REF DCE002/13709-0

CAL4 REF DCE002/13710-0

CAL5 REF DCE002/13711-0

Contain non-mercury preservative.

2. Controls (2 vials, 0.5 mL each)

For concentration see the Certificate of Analysis.

Contains non-mercury preservative.

Low Control REF DCE045/13701-0

High Control REF DCE045/13702-0

3. Coated Microplate (1 breakable microplate)

Monoclonal antibody anti PSA adsorbed on microplate

REF DCE002/13703-0

4. Enzyme Conjugate (1 vial, 12 mL)

Monoclonal antibody anti PSA conjugated to horseradish peroxidase. Contains non-mercury preservative.

REF DCE002/13702-0

5. Substrate Solution (1 vial, 12 mL)

Contains TMB (tetramethylbenzidine) and H₂O₂

REF DCE004/13704-0

6. Stop Solution (1 vial, 14 mL)

Contains sulphuric acid (H₂SO₄) 0.5M (avoid contact with the Stop Solution, it may cause skin irritations and burns)

REF DCE005/13705-0

3.2. Material required but not provided

- Distilled water.
- Precision micropipettes (volume: 25 µL and 100 µL) with disposable tips.
- ELISA photometer with 450 nm and 630 nm filters.
- Timer with 60 min. range or higher.
- Microplate washer (optional).
- Vortex or similar mixing tools.
- Container for the proper handling of waste and samples after use.

4. STORAGE AND STABILITY

- Store the kit and components at +2 to + 8°C
- Bring to room temperature (18-25°C) at least 30 minutes before use. After use put back into the refrigerator. Avoid long time storage at room temperature.
- Do not use the kit or components after the expiry date. For expiry date of the original packed kit see kit label.
- Close the bottles immediately after use.
- Store the plate incl. desiccant in the provided zip-lock pouch. Modules that are not used should always be stored under this condition.
- Ensure that kit components do not freeze.

5. PRECAUTIONS

- ELISA kits are only for in vitro diagnostic use by professionals.
- Serum and plasma samples should be treated as potentially infectious materials. Wear gloves and proper laboratory attire when handling sample materials. Do not eat, drink or smoke in areas where specimen or kit reagents are handled. Do not pipette with the mouth. In case of skin contact, wash with a germicidal soap and copious amounts of water. Seek medical advice if indicated.
- The PSA Calibrators and controls are of human origin. They have been tested and confirmed negative for HIV, HBsAg and HCV. However, all Calibrators should be treated as potential biohazards.
- Due to the potentially infectious character of samples and kit components all materials that have come in contact with these materials should be sterilized and disposed of according to local regulations. This also includes the liquid waste.
- The assay reagents contain preservatives, TMB, H₂O₂ or sulphuric acid and may be harmful if ingested. A direct skin or mucosa contact should be avoided. In case of skin contact, wash thoroughly with water and seek medical attention if required.
- The stop solution contains H₂SO₄. Since the H₂SO₄ used to terminate the color reaction is corrosive, the instrumentation employed to dispense it should be thoroughly cleaned after use.
- Do not interchange reagents from different lots or different suppliers.
- Avoid reagent or sample carry-over by using fresh tips for solutions and samples.
- Do not use test kit if zip lock pouch or bottles have been damaged.

6. GUIDELINE FOR SAMPLE COLLECTION, PREPARATION AND STORAGE

6.1. Sample collection

Blood samples are collected by venipuncture. As different factors could influence the PSA level in blood, doctors should ensure that the patient has avoided the following conditions before taking the blood sample.

The following conditions may lead to an increase of PSA levels:

- biking
- sexual intercourse (ejaculation)
- Manipulation of the prostate during medical examinations like DRE, transrectal prostatic ultrasound etc.
- Prostatitis
- Liver dysfunction

The following conditions may lead to a decrease of PSA levels:

- Intake of 5-alpha-reductaseinhibitors, antiandrogens, or GnRH analogs

6.2. Sample preparation

The preparation of serum or plasma samples is performed according to standard techniques. Serum or plasma should be prepared as soon as possible to avoid hemolysis and to improve the stability of PSA.

6.3. Storage of samples

For the assay either fresh serum or plasma samples can be used.

If not used immediately they can be stored at 2-8°C for 1 week. In case of longer storage, freeze at -20°C. A repeated freezing and thawing of samples should be avoided.

Note

- Highly lipemic or hemolytic samples can give incorrect analytical results.
- Samples must be free of microbial contaminations.
- Samples containing high titers of rheumatoid factor and human anti-mouse antibodies (HAMA) could give erroneous results.

7. ASSAY PROCEDURE

7.1. Preparation of the Calibrators (C₀...C₅)

The Calibrators are calibrated against the WHO 96/670 and have the following concentrations:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅
ng/mL	0	1.56	3.12	6.25	12.50	25.00

Contain a preservative.

7.2. Procedure

Note: It is highly recommended to perform all measurements as duplicates. An independent calibration curve should be made for each series of measurements. For best results it is important that the solutions are always added to the wells in the same order to minimize variations in incubation times.

- Prior to use bring all reagents, Calibrators, controls, and samples to room temperature (18-25°C).
- Check that all components are not expired and take care that bottles and plate (inclusive pouch) are not damaged.
- Format the required microplate wells. Keep in mind that all measurements should be performed as duplicate. Document position of wells and respective samples, Calibrators and controls to ensure later identification.

Put any unused microwell modules back into the zip lock bag with the desiccant, seal bag and store at 2-8 °C.

- Samples with an expected PSA value higher than 25 ng/mL should be diluted with the sample diluent.

Reagent	Calibrator	Sample	Control
Calibrator C0-C5	25 µL		
Control			25 µL
Sample		25 µL	
Incubate 5 minutes at room temperature (18-25°C).			
Enzyme Conjugate	100 µL	100 µL	100 µL
Mix by moving plate on the table (10 sec) Incubate 1 hour at room temperature (18-25°C). Remove solution from the wells by aspirating the liquid or by decanting it. If decanting, tap plate on adsorbent paper to remove residual liquid. For washing fill plate with distilled water and wait 15 sec before removing the distilled water; wash 5x to 6x. <u>We recommend the following procedure:</u> wash wells 6-times with 250 µL / well distilled water. Preferably use an automated washing procedure. If washing manually take care that the washing solution remains in each well for the same time. This is necessary to receive lowest possible CV-values.			
Substrate Solution	100 µL	100 µL	100 µL
Incubate 20 minutes at room temperature (18-25°C) in the dark.			
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL
Shake the microplate gently. Read absorbencies (OD) at 450 nm (blanking 630 nm)			

8. CALCULATION OF RESULTS

1. Calculate the average absorbance values for each set of Calibrators, controls and patient samples.
2. Using linear graph paper, construct a calibration curve by plotting the mean absorbance obtained from each Calibrator against its concentration with absorbance value on the vertical (Y) axis and concentration on the horizontal (X) axis.
3. Using the mean absorbance value for each sample determine the corresponding concentration from the calibration curve.
4. Automated method: The results in the IFU have been calculated automatically using a 4 PL (4 Parameter Logistics) curve fit. 4 Parameter Logistics is the preferred method. Other data reduction functions may give slightly different results.
5. The concentration of the samples can be read directly from this calibration curve. Samples with concentrations higher than that of the highest Calibrator have to be further diluted or reported as > 25 ng/mL. For the calculation of the concentrations this dilution factor has to be taken into account.

8.1. Example of Typical Calibration Curve

The following data is for demonstration only and **cannot** be used in place of data generations at the time of assay.

Calibrator	Optical Units (450 nm)
Calibrator 0 (0 ng/mL)	0.05
Calibrator 1 (1,56 ng/mL)	0.24
Calibrator 2 (3,12 ng/mL)	0.39
Calibrator 3 (6,25 ng/mL)	0.74
Calibrator 4 (12.5 ng/mL)	1.27
Calibrator 5 (25,0 ng/mL)	2.01

9. QUALITY CONTROL

- It is recommended that internal controls are used in every assay in duplicate. Control results should be within established ranges and should preferably represent low, medium, and high concentrations.
- The risk for the patient is mainly due to false negative results around the reshild (cut-off) value of PSA < 4.0 ng/mL. It is therefore highly recommended to validate the kit and laboratory via external trials (e.g. DGKC).

10. EXPECTED VALUES AND LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

The generally recommended threshold for follow-up examinations is:

Cut-off value: 3.0-4.0 ng PSA /mL

Healthy men generally have a PSA concentration lower than 4.0 ng/mL. If the PSA concentration is equal or higher than 4.0 ng/ml follow-up examinations are highly recommended. This PSA concentration indicates an elevated risk for prostate cancer but might also be caused by BPH.

Please note that that the 4 ng/ml threshold is only a guideline value. In the literature it is discussed that modifications according to age and ethnological background might be useful e.g. that for younger men the threshold should be lower than for older men. If possible, it is recommended for each laboratory to establish its own specific values that take into consideration a population indigenous to the area where the laboratory is located.

It is important to keep in mind that some prostate tumors do not cause elevated PSA levels so that PSA measurements should never replace DRE but should only be used in conjunction with DRE.

As elevated PSA levels might also be caused by non-cancerous conditions follow examinations might try to increase the diagnostic specificity of t-PSA values. In the literature PSA density, PSA velocity and the ratio of f-PSA to t-PSA are discussed to improve discrimination between cancerous and non-cancerous conditions and might be used to reduce unnecessary prostate biopsies. But only a prostate biopsy can finally show if a prostate carcinoma is present or not.

Note: PSA values can only be used to estimate the cancer risk. They should always be interpreted in conjunction with other clinical findings and should not be used as a sole basis for prostate cancer diagnosis.

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

11.1. Detection limit

The limit of detection for this kit is 0.2 ng/mL.

11.2. Precision

Intra- and inter-assay precisions were established by analysing three patient sera of different PSA concentrations. The results are shown in Tables 1 and 2.

Table 1. Intra-assay precision

Patients	Number of replicates	Mean ng/mL	SD ng/mL	CV %
1	24	12.52	0.65	6.0
2	24	3.44	0.13	3.9
3	32	0.83	0.07	8.8

Table 2. Inter-assay precision

Patients	Number of replicates	Mean ng/mL	SD ng/mL	CV %
1	4	12.28	0.82	6.7
2	4	3.33	0.266	7.98

11.3. Recovery

A known amount of PSA was added to three patient sera and the quantities recovered were measured. The results are shown in Table 3.

Table 3. Recovery

Sample	Expected value (ng/mL)	Observed value (ng/mL)	Recovery %
1	6.30	6.40	102
2	4.67	4.56	98
3	10.10	10.91	108

11.4. Specificity

The antibodies used in this kit are highly specific for total PSA (free PSA & PSA-ACT-complex), with a relatively low cross-reactivity to other proteins and polypeptides, lipids or chemotherapeutic agents that might be present in patient samples.

Table 4. Specificity

Antigens	Amount added	Cross reaction
Proteins		
AFP	10 µg/mL	No
CEA	10 µg/mL	No
HCG	10 µg/mL	No
Lactalbumin	10 µg/mL	No
PAP	1 µg/mL	No
Interfering substances		
Bilirubin	0.2 mg/mL	No
Hemoglobin*	0.1 mg/ml	No
Triglyceride	15 mg/mL	No
Chemotherapeutic Agents		
Cyclophosphamide	800 µg/mL	No
Doxorubicin * HCl	20 µg/mL	No
Diethylstilbestrol	2 µg/mL	No
Flutamide	10 µg/mL	No
Methotrexate	50 µg/mL	No

* at higher concentration hemoglobin results in too high OD values, hemolytic samples should thus be avoided.

11.5. High dose hook effect

The assay was tested for a high dose hook effect. Up to a PSA concentration of 2000 ng/mL no hook effect was observed. Please note that if the OD is out of the standard range for highly concentrated samples, the sample must be diluted before the next measurement to obtain correct results.

11.6. Correlation

Diametra Total PSA ELISA was compared with the Roche ElecSys total PSA:

$$Y = 0.9644 \cdot X + 0.0741$$

In a second study Diametra Total PSA ELISA was compared to another CE registered PSA ELISA:

$$Y = 1.001 \cdot X, R^2 = 0.9704$$

12. LEGAL ASPECTS

12.1. Reliability of Results

The test must be performed exactly as per the manufacturer's instructions for use. Moreover the user must strictly adhere to the rules of GLP (Good Laboratory Practice) or other applicable national standards and/or laws. This is especially relevant for the use of control reagents. It is important to always include, within the test procedure, a sufficient number of controls for validating the accuracy and precision of the test.

The test results are valid only if all controls are within the specified ranges and if all other test parameters are also within the given assay specifications. In case of any doubt or concern please contact Diametra.

12.2. Therapeutic Consequences

Therapeutic consequences should never be based on laboratory results alone even if all test results are in agreement with the items as stated under point 12.1. Any laboratory result is only a part of the total clinical picture of a patient.

Only in cases where the laboratory results are in acceptable agreement with the overall clinical picture of the patient should therapeutic consequences be derived.

The test result itself should never be the sole determinant for deriving any therapeutic consequences.

12.3. Liability

Any modification of the test kit and/or exchange or mixture of any components of different lots from one test kit to another could negatively affect the intended results and validity of the overall test. Such modification and/or exchanges invalidate any claim for replacement.

Claims submitted due to customer misinterpretation of laboratory results subject to point 12.2. are also invalid. Regardless, in the event of any claim, the manufacturer's liability is not to exceed the value of the test kit. Any damage caused to the test kit during transportation is not subject to the liability of the manufacturer.

13. BIBLIOGRAPHY

- Fritsche HA und RJ. Babalan Clin Chem (1993) Vol: 39: 1529-1529 Analytical performance goals for measuring prostate-specific antigen:
- Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaft (AWMF): Leitlinien der Deutschen Urologen: PSA-Bestimmung in der Prostatakarzinomdiagnostik (2003) <http://www.uni-duesseldorf.de/WWW/AWMF/II/uro1-36v.htm> (Stand Juli 2003)
- Hammerer P. and Huland H., Der Onkologe (1996), Vol 2: 218-223 Früherkennung des Prostatakarzinoms. Onkologe
- Milford Ward A. et al., Ann Clin Biochem (2001), Vol 38: 633-651 Prostate specific antigen: biology, biochemistry and available commercial assays.
- Price C. P. et al., Ann Clin Biochem (2001), Vol 38: 188-216 Pre-and post-analytical factors that may influence use of serum prostate specific antigen and its isoforms in a screening programme for prostate cancer.
- Lange P et al., J Urol (1989) Vol 141:873 The value of serum prostate-specific antigen determinations before and after radical prostatectomy,
- Akdas et al. British J Uro (1997) Vol 79: 920-923 The role of free prostate specific antigen in the diagnosis of prostate cancer
- Thomas L (2008) Labor und Diagnose, TH-Books Verlagsgesellschaft 1342-1351

Ed. 01/2015

DCM137-2

DiaMetra S.r.l. Headquater: Via Calabria 15,
20090 SEGRATE (MI) Italy
Tel. +39-02-2139184
Fax +39-02-2133354

Manufactory: Via Pozzuolo 14
06038 SPELLO (PG) Italy
Tel. +39-0742-24851
Fax +39-0742-316197
E-mail: info@diametra.com

Total PSA

para análisis diagnóstico

Prueba inmunoenzimática para la determinación cuantitativa del PSA (Antígeno Prostático Específico) total en suero o plasma humano.

IVD



LOT

Ver etiqueta externa

2°C  8°C $\Sigma = 96$ test

REF DKO137

USO PREVISTO

EL Kit Diametra Total PSA se utiliza para la determinación cuantitativa del antígeno prostático específico en suero o plasma humano. La cuantificación de los niveles de PSA total se utiliza, en los hombres, para estimar el riesgo de un carcinoma prostático en conjunto con la técnica del tacto prostático o bien para monitorear la eficiencia del tratamiento en pacientes con carcinoma de la próstata.

1. IMPORTANCIA CLINICA

EL cancer de la prostata es el más frecuente tipo de tumor en el hombre y es el segundo causante de mortalidad en el hombre entre los tumores.

Hasta hace poco el tacto rectal ha sido utilizado como única modalidad de diagnóstico del tumor prostático en la fase inicial. En los últimos años la determinación de los niveles séricos del PSA se convirtió la metodología mas aceptada para mejorar la especificidad diagnostica del tacto rectal. Aun siendo una proteína tejido especifica y no solamente tumor especifica el PSA se ha convertido en el marcador más importante del carcinoma prostático, demostrando una especificidad mejor de otros marcadores bioquímicos utilizados en este contexto (PAP, fosfatasa alcalina total, CEA, etc.)

En el 1979, Wang et al. Aislaron un antígeno específico y lo llamaron PSA. Como quedó demostrado por estudios inmunohistologicos el PSA se localiza en el citoplasma de las células prostáticas, en el epitelio del ducto y en la secreción de la lamina ductal, todos tejidos normales de la próstata así como en los tejidos hiperplásicos benignos o malignos y en el cáncer metastáticos. Si la integridad estructural de la próstata se altera y/o las dimensiones de la glándula aumentan, la cantidad de PSA circulante se puede elevar. Un aumento de la concentración de PSA a valores superiores de 3-4ng/mL se ha reportado en pacientes con hipertrofia prostática benigna (HPB) o en pacientes con carcinoma prostático. A partir de este umbral se aconsejan exámenes de seguimiento que permiten diferenciar entre estas dos condiciones.

La determinación de los niveles séricos de PSA es importante también para monitorear pacientes que han sido tratados por esta patología. Las mediciones periódicas del PSA se vuelven un importante instrumento para examinar la eficacia de la cirugía o bien otras terapias. Un aumento del PSA en pacientes tratados puede permitir un precoz diagnóstico de un carcinoma residual o recurrente.

2. PRINCIPIO DEL METODO

Este kit es un ensayo inmunoenzimático en fase sólida (ELISA) basado sobre la metodología de "sandwich".

Los pozos de la microplaca son revestidos con un anticuerpo dirigido hacia un epítipo del PSA. Una alícuota del suero del paciente se incuba en los pozos junto a un segundo anticuerpo conjugado a una enzima (E-Ab) dirigido hacia otra región de la molécula de PSA. Después de la incubación la fracción E-Ab no ligada se lava y la cantidad de E-Ab ligada es proporcional a la concentración sérica del PSA. Después de añadirse la solución sustrato, la intensidad de color desarrollado es proporcional a la concentración de PSA presente en la muestra. Las densidades ópticas de los Calibradores se utilizan para trazar una curva de calibración contra la cual se calculan las concentraciones de las muestras.

3. REACTIVOS, MATERIALES E INSTRUMENTACION

3.1. Reactivos y materiales provistos en el kit

1. Calibradores de PSA (6 viales, 0.5 mL cada uno)
CAL0/Diluyente de muestra(10 mL) REF DCE002/13706-0
CAL1 REF DCE002/13707-0
CAL2 REF DCE002/13708-0
CAL3 REF DCE002/13709-0
CAL4 REF DCE002/13710-0
CAL5 REF DCE002/13711-0

Contienen conservante sin mercurio

2. Controles (2 flacone, 0.5 mL cada uno)
La concentración se indica en el certificado de análisis.

Contienen conservante sin mercurio.

- Control bajo REF DCE045/13701-0
Control alto REF DCE045/13702-0

3. Microplaca revestida (1 microplaca)
Anticuerpo monoclonal anti PSA absorbido en la microplaca
REF DCE002/13703-0

4. Enzima Conjugado (1 vial, 12 mL)
Anticuerpo anti PSA conjugado con peroxidasa de rábano (HRP). Contienen conservante sin mercurio.
REF DCE002/13702-0

5. Solución Sustrato (1 vial, 12 mL)
Contiene TMB (tetramethylbenzidine) y H₂O₂
REF DCE004/13704-0

6. Solución de Parada (1 vial, 14 mL)
Contiene ácido sulfúrico (H₂SO₄) (evitar el contacto, puede causar irritación y quemaduras)
REF DCE005/13705-0

3.2. Reactivos necesarios no incluidos en el Kit

- Agua destilada.
- Pipetas automaticas (volumén: 25 µL e 100 µL) con puntas desechables.
- Lector ELISA con filtros de 450 nm y 630 nm.
- Cronometro.
- Lavador microplacas (opcional).
- Vortex o instrumento para mezclar.
- Contenedor para el correcto manejo de los desechos.

4. ALMACENAJE Y ESTABILIDAD

- Almacenar el Kit y sus componentes a 2-8°C.
- Llevar a temperatura ambiente (18-25°C) el kit por lo menos 30 minutos antes de usarse. Después del uso volver a refrigerar. Evitar exponer el kit a temperatura ambiente por periodos largos.
- No usar el kit o sus componentes después de la fecha de vencimiento indicada en la etiqueta de la caja.
- Después de su uso cerrar correctamente los viales.
- Conservar la microplaca y su desecante en la bolsa (zip-lock). Los pozos no utilizados deberán conservarse siempre en las condiciones descritas.
- Asegurarse que los componentes del kit no se congelen.

5. PRECAUCIONES

- Los Kits ELISA son diseñados solamente para usarse en el diagnostico in vitro por parte de profesionales en el área de la diagnostica.
- Las muestras de suero y/o plasma humano deben ser tratadas como potencialmente infectocontagiosas. Utilizar guantes. No comer, beber o fumar en las áreas del laboratorio en las cuales se manejan los kits. No pipetear con la boca, en caso de contacto con la piel lavar con un jabón germicida y abundante agua, consultar un medico si fuera necesario.
- Sea los Calibradores que los controles de este kit son de origen humana. Han sido probados y confirmados negativos para HIV, HBsAg y HCV. De toda forma deben ser manejados como materiales potencialmente infectocontagiosos.
- Debido al carácter potencialmente infectivo de las muestra y de los componentes del kit, todos los desechos deberán manejarse según la normativa que la autoridad sanitaria local disponga al respeto.
- Los reactivos de kit contienen conservantes, TMB, H₂O₂ y ácido sulfúrico y pueden ser dañinos si ingeridos. Evitarse el contacto directo con la piel, en caso de contacto lavase con abundante agua de ser necesario consulte su médico
- La solución de parada contiene H₂SO₄, sustancia corrosiva, por lo tanto es conveniente limpiar la instrumentación utilizada para la dispensación.
- No intercambiar los reactivos de lotes o proveedores distintos.
- Úsele únicamente puntas desechables para evitar contaminaciones.
- No utilice el kit si la confección de la microplaca o de los viales luzcan dañados.

6. GUIA PARA LA EXTRACCION, PREPARACION Y CONSERVACION DE LAS MUESTRAS.

6.1. Extracción de la muestra

Las muestra de sangre se extraen por punción venosa, debido a que los niveles de PSA se ven afectados por una variedad de factores, el médico debe asegurarse que el paciente observe ciertas indicaciones antes del muestreo. Las siguientes condiciones pueden alterar los reales niveles de PSA aumentándolos:

- Ciclismo

- Sexo (eyaculación)
 - Tacto prostático, ecografía prostática transrectal, etc.
 - Prostatitis
 - Disfunción hepática.
- Las siguientes condiciones pueden alterar los reales valores de PSA disminuyéndolos:
- Terapia con inhibidores de la 5-alfa-reductasa, anti andrógenos o bien análogos de la GnRH.

6.2. Preparación de la muestra

La preparación de las muestras séricas o plasmáticas se realiza según la técnica estándar por centrifugación, la separación de la muestra debe realizarse a la brevedad para evitar hemolisis y mejorar la estabilidad del PSA.

6.3. Conservación de las muestras

Para la prueba pueden usarse suero o plasma recién extraídos, si la prueba no se realiza inmediatamente las muestras pueden almacenarse a 2-8°C por 1 semana. Si se requiere conservar la muestra por periodos prolongados congelar a -20°C. Evitar congelar y descongelar repetidas veces.

Nota

- Las muestras fuertemente lipemicas o hemolíticas pueden producir resultados erróneos.
- Las muestras deben ser exentes de contaminación microbiológica.
- Las muestras con valores elevados de Factor Reumatoide y/o anticuerpos anti-topo pueden producir resultados erróneos.

7. PROCEDIMIENTO

7.1. Preparación de los Calibradores (C₀...C₅)

Los Calibradores han sido calibrados contra el WHO 96/670 y tienen las siguientes concentraciones:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅
ng/mL	0	1,56	3,12	6,25	12,50	25,00

Contienen conservante.

7.2. Procedimiento

Nota: se aconseja trabajar en duplicado, en cada medición debería realizarse una curva de calibración. Para obtener mejores resultados y más reproducibles es importante que las soluciones se añadan siempre en el mismo orden.

- Antes del uso llevar todos los reactivos a temperatura ambiente (18-25°C).
- Verificar que ningún componente este vencido o dañado.
- Tomar los pozos necesarios, teniendo presente que las mediciones deberían ser efectuadas en duplicado. Documentar la posición de los Calibradores, controles y muestras y devolver al sobre los pozos sobrantes cerrar bien, controlar que el desecante este en el sobre y almacenar a 2-8°C.
- Las muestras con un valor de PSA superior de 25ng/mL deben ser diluidas con el diluyente de muestra.

Reactivos	Calibrador	Muestra	Control
Calibrador C ₀ -C ₅	25 µL		
Control			25 µL
Muestra		25 µL	
Incubar 5 minutos a temperatura ambiente (18-25°C).			
Enzyme Conjugado	100 µL	100 µL	100 µL
Mezclar bien agitando con movimientos rotativos la placa sobre la mesa de trabajo. (10 sec). Incubar 1 hora a temperatura ambiente (18-25°C). Descartar la solución de los pozos por aspiración o decantación; si utiliza la decantación remover el remanente de líquido del pozo golpeando la placa sobre una servilleta. Lavar llenando los pozos con agua destilada durante 15 segundos, repetir 5 o 6 veces. <u>Procedimiento recomendado:</u> lavar los pozos 6 veces con 250µL de agua destilada, preferiblemente utilice un lavador automático. Si lava manualmente cuide de dejar la solución de lavado el mismo tiempo en cada pozo esto para minimizar el coeficiente de variación.			
Solución Substrato	100 µL	100 µL	100 µL
Incuba 20 minutos a temperatura ambiente (18-25°C) en oscura.			
Solución de Parada	100 µL	100 µL	100 µL
Agite delicadamente la microplaca. Leer la absorbancia (OD) a 450 nm (contra referencia a 630 nm)			

8. CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

- Calcular la media de los valores de absorbancia obtenida por cada set de calibradores, controles y muestras.
- Usando papel milimetrado trazar una curva de calibración graficando la absorbancia promedio de cada calibrador versus su concentración. El valor de absorbancia en el eje Y y el de concentración en el eje X.
- Utilizando el valor promedio de absorbancia de cada muestra, determine la concentración interpolando el dato sobre la curva obtenida.
- Método automático: los resultados pueden calcularse automáticamente utilizando un tratamiento logístico de 4 parámetros. Esta forma de tratar los datos es la más idónea, otros análisis de datos pueden producir resultados ligeramente distintos.
- La concentración de las muestras pueden ser leídas a partir de esta curva estándar. Las muestras con concentraciones superiores a 25 ng/mL deben ser diluidas o bien reportadas como >25 ng/mL. Recuérdese tomar en cuenta el factor de dilución en el cálculo de la concentración cuando la muestra ha sido previamente diluida.

8.1. Ejemplo de una curva de calibración típica

Los datos a continuación son ejemplificativos no deben utilizarse para el cálculo de sus resultados.

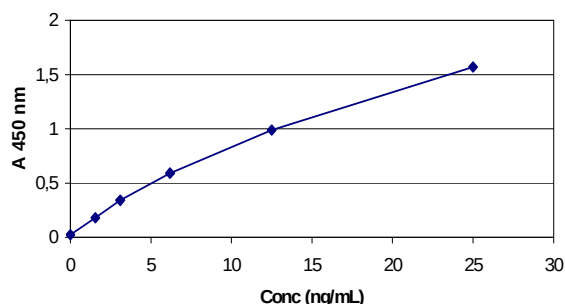
Calibrador	ABS (450 nm)
Calibrador 0 (0 ng/mL)	0.05
Calibrador 1 (1,56 ng/mL)	0.24
Calibrador 2 (3,12 ng/mL)	0.39
Calibrador 3 (6,25 ng/mL)	0.74
Calibrador 4 (12.5 ng/mL)	1.27
Calibrador 5 (25,0 ng/mL)	2.01

9. Validación de la prueba

- La absorbancia del Calibrador 0 a 450nm debe ser menor a 0.150, valores superiores indican una contaminación cromógeno/sustrato. En este caso repetir la prueba controlando el reactivo.
- La absorbancia del Calibrador 25 ng/mL a 450nm debe ser superior a 0.700. Valores menores indican decaimiento del kit. Controlar la fecha de vencimiento del kit antes de repetir la prueba.
- EL suero control incluido en el kit no debe variar más del 15% de la concentración declarada en la etiqueta, si se trabajó por lo menos en duplicado
- Hoja de trabajo y curva de calibración de una corrida típica (no se utilice para el cálculo de muestras reales):

Pozo	Contenido	A 450 nm		Conc. ng/mL
1-2	St 0 ng/mL	0.022	0,023	
3-4	St 1,56 ng/mL	0.178	0.180	
5-6	St 3,12 ng/mL	0.337	0.342	
7-8	St 6,20 ng/mL	0.611	0.568	
9-10	St 12,50 ng/mL	0.990	0.984	
11-12	St 25,00 ng/mL	1.574	1.562	
13-14	control	0.421	0.400	3.98

PSA



Nótese que los valores absolutos de absorbancia para los Calibradores pueden variar debido a cambios de temperatura y por el envejecimiento del conjugado. Los resultados de PSA de las muestras son válidos mientras los valores de absorbancia de los Calibradores cumplan con los intervalos permitidos y las concentraciones de los sueros controles cumplan con los rangos esperados.

9. Control de Calidad

- Se recomienda que los controles internos se utilicen en duplicado en cada análisis. Los resultados obtenidos deben estar en el rango permitido. Es recomendable utilizar controles en los niveles bajos, medianos y altos.
- El riesgo para el paciente se da con valores falsamente negativos limítrofes al valor de cut off de PSA

<4.0ng/mL. Por lo tanto es aconsejable validar el kit con procedimientos externos (por ejemplo DGKC).

10. Valores esperados y limitaciones del test

El límite generalmente recomendado para solicitar análisis de seguimiento es:

Valor de cut-off: 3,0-4,0 ng PSA / mL

Hombres saludables presentan por lo general una concentración de PSA menor de 4.0ng/mL. De presentarse una concentración superior es altamente recomendable realizar exámenes de seguimiento. Concentraciones de PSA superiores a 4.0ng/mL pueden indicar un cáncer a la próstata o una hiperplasia prostática benigna. Tome en cuenta que el valor umbral de 4 es únicamente indicativo en la literatura se reportan correcciones debidas a la edad y grupos étnicos que pueden resultar útiles. Por ejemplo en hombres jóvenes el límite debería ser menor que el de hombres ancianos, de ser posible es aconsejable que el laboratorio fije sus límites dependiendo de los factores locales. Es importante recordar que algunos cánceres prostáticos no producen aumentos elevados del PSA y por lo tanto la prueba nunca debería sustituir el tacto prostático sino que utilizada en combinación.

Debido a que pueden encontrarse niveles de PSA aumentados sin que se trate de cáncer, ulteriores exámenes podrían incrementar el valor diagnostico de la t-PSA. La literatura cita que la densidad de PSA, la velocidad de PSA y la relación entre f-PSA/t-PSA aumentan la capacidad de discriminación entre procesos cancerosos y no cancerosos y que estas técnicas podrían utilizarse para reducir el número de biopsias innecesarias. Pero solo una biopsia prostática puede claramente discriminar si el carcinoma es presente o no.

Nota: los valores de PSA pueden utilizarse únicamente para estimar el riesgo de cáncer. Se deben siempre interpretar en combinación con otros resultados clínicos y nunca se deben utilizar como único diagnostico del carcinoma prostático.

11. PRESTACIONES CARACTERISTICAS

11.1. Limite de detección

El limite de detección de este kit es: 0.2 ng/mL.

11.2. Precisión

La precisión inter y entre ensayo ha sido establecida utilizando tres sueros de pacientes con diferentes concentraciones de PSA, los resultados se resumen en las tablas 1 y 2.

Tabla 1. Entre -ensayo

Paciente	N. de replicados	Media ng/mL	SD ng/mL	CV %
1	24	12.52	0.65	6.0
2	24	3.44	0.13	3.9
3	32	0.83	0.07	8.8

Tabla 2. Inter-ensayo

Paciente	N. de replicados	Media ng/mL	SD ng/mL	CV %
1	4	12.28	0.82	6.7
2	4	3.33	0.266	7.98

11.3. Recuperación

Una cantidad conocida de PSA se agregó a tres sueros de pacientes y luego ha sido medida la cantidad recuperada. Los resultados se muestra en la tabla 3.

Tabla 3. Recuperación

Muestra	Valor esperado (ng/mL)	Valor Observado (ng/mL)	Recuperación%
1	6.30	6.40	102
2	4.67	4.56	98
3	10.10	10.91	108

11.4. Especificidad

Los anticuerpos utilizados en este kit son altamente específicos para la PSA total (PSA libre y PSA-ACT-complejo), con una reactividad cruzada baja con otras proteínas, polipéptidos, lípidos o agentes quimioterapicos que podrían estar presente en el suero de los pacientes.

Tabla 4. Especificidad

Antigenos	Cantidad Agregada	Reacción Cruzada
Proteínas		
AFP	10 µg/mL	No
CEA	10 µg/mL	No
HCG	10 µg/mL	No
Lactoalbumina	10 µg/mL	No
PAP	1 µg/mL	No
Sustancias Interferentes		
Bilirrubina	0.2 mg/mL	No
Hemoglobina*	0.1 mg/ml	No
Trigliceridos	15 mg/mL	No
Agentes quimioterapicos		
Ciclofosfamide	800 µg/mL	No
Doxorubicina * HCl	20 µg/mL	No
Dietilstilbestrolo	2 µg/mL	No
Flutamide	10 µg/mL	No
Metotrexato	50 µg/mL	No

* a valores mas altos la hemoglobina produce absorbancias elevadas, por lo tanto los sueros hemolizados deberian ser descartados

11.5. Efecto Hook

Hasta una concentración de PSA de 2000ng/mL no ha sido observado ningún efecto gancho. Nótese que si la absorbancia de una muestra es superior a la absorbancia del ultimo Calibrador, la muestra debe ser diluida y medida otra vez.

11.6. Correlacion

El kit Diametra Total PSA ELISA ha sido comparado con el kit de Roche ElecSys Total PSA:

$$Y = 0.9644 \cdot X + 0.0741$$

En un segundo estudio el kit Diametra Total PSA ha sido comparado con otro kit ELISA para PSA marcado CE:

$$Y = 1.001 \cdot X, R^2 = 0.9704$$

12. ASPECTOS LEGALES

12.1. Fiabilidad de los resultados

El test se debe realizar siguiendo exactamente las instrucciones del fabricante. Además el usuario debe respetar las normas GLP (Buenas prácticas de laboratorio) y/o otras normas nacionales así como las leyes vigentes. Esto es particularmente relevante para el uso de reactivos de control. Durante el procedimiento es importante incluir siempre un número suficientes de controles para validar el funcionamiento del test.

Los resultados del test son validos si todos los controles están en el rango especificado, además se deben revisar que los demás parámetros de prueba cumplan con las especificaciones del ensayo. En caso de dudas contacten Diametra.

12.2. Decisiones terapéuticas

Las decisiones terapéuticas jamás deben basarse únicamente sobre los resultados de laboratorio, aun si todos los resultados cumplen con lo especificado en el punto 12.1. El resultado del laboratorio es solamente una parte del cuadro clínico general del paciente. Únicamente en los casos en los cuales los resultados de laboratorio están en acuerdo con el cuadro clínico general del paciente deben tomarse decisiones terapéuticas. El resultado del test por si solo no es factor determinante para decidir tratamientos terapéuticos.

12.3. Responsabilidad

Cualquiera modificación del Kit y/o el intercambio o mezcla de componentes de lotes distintitos de un kit a otro pueden modificar los resultados esperados y la validez en general del ensayo. Tales modificaciones y/o intercambio anulan cualquier solicitud de sustitución y/o reposición. Los reclamos debidos a una equivocada interpretación de los resultados de laboratorio por parte de los clientes según indicado en el punto 12.2. tampoco son validos. Independientemente de lo anterior in caso de cualquier reclamo, la responsabilidad del fabricante no supera el valor del kit. Daños provocados al kit durante el transporte no son responsabilidad del fabricante.

13. BIBLIOGRAFIA

- Fritsche HA und RJ. Babalan Clin Chem (1993) Vol: 39: 1529-1529 Analytical performance goals for measuring prostate-specific antigen:
- Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaft (AWMF): Leitlinien der Deutschen Urologen: PSA-Bestimmung in der Prostatakarzinomdiagnostik (2003) <http://www.uni-duesseldorf.de/WWW/AWMF/II/uro1-36v.htm> (Stand Juli 2003)
- Hammerer P. and Huland H., Der Onkologe (1996), Vol 2: 218-223 Früherkennung des Prostatakarzinoms. Onkologe
- Milford Ward A. et al., Ann Clin Biochem (2001), Vol 38: 633-651 Prostate specific antigen: biology, biochemistry and available commercial assays.
- Price C. P. et al., Ann Clin Biochem (2001), Vol 38: 188-216 Pre-and post-analytical factors that may influence use of serum prostrate specific antigen and its isoforms in a screening programme for prostate cancer.
- Lange P et al., J Urol (1989) Vol 141:873 The value of serum prostate-specific antigen determinations before and after radical prostatectomy,
- Akdas et al. British J Uro (1997) Vol 79: 920-923 The role of free prostate specific antigen in the diagnosis of prostate cancer

- Thomas L (2008) Labor und Diagnose, TH-Books Verlagsgesellschaft 1342-1351

Ed. 01/2015

DCM137-2

DiaMetra S.r.l. Headquater: Via Calabria 15,
20090 SEGRATE (MI) Italy
Tel. +39-02-2139184
Fax +39-02-2133354

Manufactory: Via Pozzuolo 14
06038 SPELLO (PG) Italy
Tel. +39-0742-24851
Fax +39-0742-316197
E-mail: info@diametra.com

DiaMetra	Packaging Information Sheet	Mod. PIS000-1
-----------------	------------------------------------	----------------------

	DE ES FR GB IT PT	In vitro Diagnostikum Producto sanitario para diagnóstico In vitro Dispositif medical de diagnostic in vitro In vitro Diagnostic Medical Device Dispositivo medico-diagnostico in vitro Dispositivos medicos de diagnostico in vitro		DE ES FR GB IT PT	Hergestellt von Elaborado por Fabriqué par Manufacturer Produttore Produzido por
	DE ES FR GB IT PT	Achtung, Begleitdokumente Precaución, consulte los documentos adjuntos Attention, veuillez consulter les documents d'accompagnement Caution, consult accompanying documents Attenzione, consultare la documentazione allegata Atenção, consultar os documentos de acompanhamento	 yyyy-mm	DE ES FR GB IT PT	Herstellungs datum Fecha de fabricacion Date de fabrication Date of manufacture Data di produzione Data de produção
 yyyy-mm-dd	DE ES FR GB IT PT	Verwendbar bis Estable hasta (usar antes de último día del mes) Utiliser avant (dernier jour du mois indiqué) Use by (last day of the month) Utilizzare prima del (ultimo giorno del mese) Utilizar (antes ultimo dia do mês)		DE ES FR GB IT PT	Biogefährdung Riesco biológico Risque biologique Biological risk Rischio biologico Risco biológico
	DE ES FR GB IT PT	Gebrauchsanweisung beachten Consultar las instrucciones Consulter le mode d'emploi Consult instructions for use Consultare le istruzioni per l'uso Consultar instruções para uso		DE ES FR GB IT PT	Chargenbezeichnung Codigo de lote Numero de lot Batch code Codice del lotto Codigo do lote
 $\Sigma = xx$	DE ES FR GB IT PT	Ausreichend für "n" Tests Contenido suficiente para "n" tests Contenu suffisant pour "n" tests Contains sufficient for "n" tests Contenuto sufficiente per "n" saggi Contém o suficiente para "n" testes		DE ES FR GB IT PT	Inhalt Contenido del estuche Contenu du coffret Contents of kit Contenuto del kit Conteúdo do kit
 Max Min	DE ES FR GB IT PT	Temperaturbereich Limitación de temperatura Limites de température de conservation Temperature limitation Limiti di temperatura Temperaturas limites de conservação		DE ES FR GB IT PT	Bestellnummer Número de catálogo Références du catalogue Catalogue number Numero di Catalogo Número do catálogo
	DE ES FR GB IT PT	Vor direkter sonneneinstrahlung schützen Mantener alejado de la luz solar Tenir à l'écart de la lumière du soleil Keep away from sunlight Tenere lontano dalla luce solare Mantenha longe da luz solar			

DiaMetra	Packaging Information Sheet	Mod. PIS000-1
-----------------	------------------------------------	----------------------

SUGGERIMENTI PER LA RISOLUZIONE DEI PROBLEMI/TROUBLESHOOTING

ERRORE CAUSE POSSIBILI/ SUGGERIMENTI

Nessuna reazione colorimetrica del saggio

- mancata dispensazione del coniugato
- contaminazione del coniugato e/o del Substrato
- errori nell'esecuzione del saggio (es. Dispensazione accidentale dei reagenti in sequenza errata o provenienti da flaconi sbagliati, etc.)

Reazione troppo blanda (OD troppo basse)

- coniugato non idoneo (es. non proveniente dal kit originale)
- tempo di incubazione troppo breve, temperatura di incubazione troppa bassa

Reazione troppo intensa (OD troppo alte)

- coniugato non idoneo (es. non proveniente dal kit originale)
- tempo di incubazione troppo lungo, temperatura di incubazione troppa alta
- qualità scadente dell'acqua usata per la soluzione di lavaggio (basso grado di deionizzazione,)
- lavaggi insufficienti (coniugato non completamente rimosso)

Valori inspiegabilmente fuori scala

- contaminazione di pipette, puntali o contenitori- lavaggi insufficienti (coniugato non completamente rimosso)

CV% intrasaggio elevato

- reagenti e/o strip non portate a temperatura ambiente prima dell'uso
- il lavatore per micropiastre non lava correttamente (suggerimento: pulire la testa del lavatore)

CV% intersaggio elevato

- condizioni di incubazione non costanti (tempo o temperatura)
- controlli e campioni non dispensati allo stesso tempo (con gli stessi intervalli) (controllare la sequenza di dispensazione)
- variabilità intrinseca degli operatori

ERROR POSSIBLE CAUSES / SUGGESTIONS

No colorimetric reaction

- no conjugate pipetted reaction after addition
- contamination of conjugates and/or of substrate
- errors in performing the assay procedure (e.g. accidental pipetting of reagents in a wrong sequence or from the wrong vial, etc.)

Too low reaction (too low ODs)

- incorrect conjugate (e.g. not from original kit)
- incubation time too short, incubation temperature too low

Too high reaction (too high ODs)

- incorrect conjugate (e.g. not from original kit)
- incubation time too long, incubation temperature too high
- water quality for wash buffer insufficient (low grade of deionization)
- insufficient washing (conjugates not properly removed)

Unexplainable outliers

- contamination of pipettes, tips or containers
- insufficient washing (conjugates not properly removed) too high within-run
- reagents and/or strips not pre-warmed to CV% Room Temperature prior to use
- plate washer is not washing correctly (suggestion: clean washer head)
- too high between-run - incubation conditions not constant (time, CV % temperature)
- controls and samples not dispensed at the same time (with the same intervals) (check pipetting order)
- person-related variation

DiaMetra	Packaging Information Sheet	Mod. PIS000-1
-----------------	------------------------------------	----------------------

ERROR / POSIBLES CAUSAS / SUGERENCIAS

No se produce ninguna reacción colorimétrica del ensayo

- no se ha dispensado el conjugado
- contaminación del conjugado y/o del sustrato
- errores en la ejecución del ensayo (p. ej., dispensación accidental de los reactivos en orden incorrecto o procedentes de frascos equivocados, etc.)

Reacción escasa (DO demasiado bajas)

- conjugado no idóneo (p. ej., no procedente del kit original)
- tiempo de incubación demasiado corto, temperatura de incubación demasiado baja

Reacción demasiado intensa (DO demasiado altas)

- conjugado no idóneo (p. ej., no procedente del kit original)
- tiempo de incubación demasiado largo, temperatura de incubación demasiado alta
- calidad escasa del agua usada para la solución de lavado (bajo grado de desionización)
- lavados insuficientes (el conjugado no se ha retirado completamente)

Valores inexplicablemente fuera de escala

- contaminación de pipetas, puntas o contenedores- lavados insuficientes (el conjugado no se ha retirado completamente)

CV% intraensayo elevado

- los reactivos y/o tiras no se encontraban a temperatura ambiente antes del uso
- el lavador de microplacas no funciona correctamente (sugerencia: limpiar el cabezal del lavador)

CV% interensayo elevado

- condiciones de incubación no constantes (tiempo o temperatura)
- controles y muestras no dispensados al mismo tiempo (con los mismos intervalos) (controlar la secuencia de dispensación)
- variación en función de los operadores

ERREUR CAUSES POSSIBLES / SUGGESTIONS

Aucune réaction colorimétrique de l'essai

- non distribution du conjugué
- contamination du conjugué et/ou du substrat
- erreurs dans l'exécution du dosage (par ex., distribution accidentelle des réactifs dans le mauvais ordre ou en provenance des mauvais flacons, etc.)

Réaction trop faible (DO trop basse)

- conjugué non approprié (par ex., ne provenant pas du coffret original)
- temps d'incubation trop court, température d'incubation trop basse

Réaction trop intense (DO trop élevée)

- conjugué non approprié (par ex., ne provenant pas du coffret original)
- temps d'incubation trop long, température d'incubation trop élevée
- mauvaise qualité de l'eau utilisée pour la solution de lavage (bas degré de déionisation)
- lavages insuffisants (conjugué non entièrement éliminé)

Valeurs inexplicablement hors plage

- contamination des pipettes, embouts ou récipients - lavages insuffisants (conjugué non entièrement éliminé)

CV% intra-essai élevé

- les réactifs et/ou les bandes n'ont pas atteint la température ambiante avant usage
- le laveur de microplaques ne lave pas correctement (suggestion : nettoyer la tête du laveur)

CV% inter-essai élevé

- conditions d'incubation non constantes (temps ou température)
- contrôles et échantillons non distribués en même temps (avec les mêmes intervalles) (contrôler l'ordre de distribution)
- variabilité intrinsèque des opérateurs