

Free PSA

per analisi di routine

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

IVD



LOT

Vedere etichetta esterna

2°C 8°C



$\Sigma = 96$ test

REF DKO138

DESTINAZIONE D'USO

Il kit Diametra Free PSA ELISA è utilizzato per la determinazione quantitativa della PSA libera (f-PSA) nel siero o plasma. La determinazione dei livelli di f-PSA viene generalmente utilizzata in combinazione con la misura del PSA totale (t-PSA) per determinare il rapporto tra f-PSA e t-PSA. Questo rapporto contribuisce a stimare il rischio per il cancro alla prostata e a discriminare gli elevati livelli di t-PSA causati da condizioni non-cancerose da quelli causati da condizioni cancerose. La determinazione della f-PSA è particolarmente indicata per gli uomini con elevati livelli di t-PSA e risultati negativi con l'esplorazione rettale digitale (DRE), al fine di decidere se è necessaria una seconda biopsia 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. La PSA è una serina-proteasi di 33 kDa. Studi immunologici hanno dimostrato che 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. Nel plasma sanguigno, la maggior parte della PSA forma complessi con vari inibitori delle proteinasi. Solo una piccola frazione di PSA circola come PSA libera inattiva. Fondamentalmente possono essere distinte tre principali forme di PSA, di cui solo due sono immunoreattive. La forma predominante di PSA è un complesso con l' α 1-antichymotrypsin (ACT-PSA). La PSA libera (f-PSA) rappresenta circa il 10-40% della PSA immunologicamente rilevabile. La quantità totale della PSA immunoreattiva è conosciuta come PSA totale (t-PSA). La PSA complessata all' α 2-macroglobulina non può essere

rilevata da analisi immunologiche ed è quindi frequentemente chiamata PSA occulta (o-PSA).

Gli attuali metodi di screening per il cancro alla prostata negli uomini utilizzano la rilevazione della t-PSA. Livelli di 4,0 ng/mL o superiori sono forti indicatori della possibilità di carcinoma prostatico e sono un'indicazione per gli esami di follow-up del paziente. Tuttavia, elevati livelli sierici di PSA sono spesso anche attribuiti a iperplasia prostatica benigna, e provocano una elevata percentuale di risultati falsi positivi negli screening. Una possibile soluzione a questo problema implica la determinazione dei livelli di PSA libera. Alcuni studi hanno suggerito che la percentuale di PSA libera è più bassa nei pazienti con cancro alla prostata rispetto a quelli con iperplasia prostatica benigna. Pertanto, la misurazione della PSA libera in collaborazione con la PSA totale può migliorare la specificità dello screening del cancro alla prostata negli uomini con elevati livelli sierici di PSA totale, il che farebbe successivamente ridurre inutili biopsie prostatiche, con effetti minimi sui tassi di rilevazione del cancro.

2. PRINCIPIO DEL METODO

Questo kit è un saggio immunoenzimatico in fase solida (ELISA).

I pozzetti della micropiastra sono rivestiti con un anticorpo monoclonale anti f-PSA diretto contro un epitopo della molecola 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 una differente regione della molecola antigenica. 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 sono utilizzate per costruire una curva di calibrazione contro la quale vengono calcolate le concentrazioni di f-PSA 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	DCE002/13806-0
CAL1	REF	DCE002/13807-0
CAL2	REF	DCE002/13808-0
CAL3	REF	DCE002/13809-0
CAL4	REF	DCE002/13810-0
CAL5	REF	DCE002/13811-0

Contengono un conservante privo di mercurio.

2. Controls (2 flaconi, 0.5 mL ciascuno)

Low Control	REF	DCE045/13804-0
High Control	REF	DCE045/13805-0

La concentrazione è indicata sul Certificato di Analisi.

Contiene un conservante privo di mercurio.

3. Coated Microplate (1 micropiastra breakable)

Anticorpo monoclonale anti PSA assorbito sulla micropiastra
REF DCE002/13803-0

4. Assay Reagent (1 flacone, 6 mL)

Contiene un conservante privo di mercurio.

REF DCE043/13843-0

5. Enzyme Conjugate (1 flacone, 6 mL)

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

REF DCE002/13802-0

6. 40X Wash Buffer (1 flacone, 25 mL)

Diluire con acqua distillata prima dell'uso.

REF DCE057/13857-0

7. Substrate Solution (1 flacone, 12 mL)

Contiene TMB (tetramethylbenzidine) e H₂O₂

REF DCE004/13804-0

8. Stop Solution (1 flacone, 14 mL)

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

REF DCE005/13805-0

3.2. Reattivi necessari non forniti nel kit

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

4. CONSERVAZIONE E STABILITÀ

- Conservare il kit e i componenti a 2-8°C.
- Portare i componenti 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 sull'etichetta del kit.
- Chiudere le bottiglie subito dopo l'uso.
- Conservare la piastra incluso l'essiccante nell'apposita tasca con zip-lock. Le strip non utilizzate devono essere sempre archiviate in questa condizione.
- Assicurarsi che i componenti del kit non congelino.
- Una volta aperto, il kit mantiene la sua attività per 2 mesi se conservato come descritto sopra.

5. PRECAUZIONI

- Il kit è solo per uso diagnostico in vitro e deve essere usato da professionisti.
- I campioni di siero e plasma devono essere trattati come materiali potenzialmente infettivi. Indossare guanti ed indumenti da laboratorio quando si maneggiano materiali campione. 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.
- I Calibratori 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 questi materiali dovrebbero essere sterilizzati e smaltiti secondo le normative locali. Questo include anche i rifiuti liquidi.
- I reagenti del test 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 soluzione bloccante contiene H₂SO₄. Poiché l'H₂SO₄ utilizzata per bloccare la reazione colorimetrica è corrosiva, la strumentazione utilizzata per la dispensazione deve essere accuratamente pulita dopo l'uso.
- Non scambiare reagenti di lotti diversi o fornitori diversi.
- Evitare la contaminazione di reagenti o campioni utilizzando puntali usa e getta.
- Non utilizzare il kit se la confezione della micropiastra o le bottiglie sono state danneggiate.

6. GUIDA PER LA RACCOLTA, PREPARAZIONE E 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. Si prega di notare che il DRE in particolare può portare ad un aumento della sola f-PSA, cosicché il carcinoma potrebbe essere trascurato.
- 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. La f-PSA non è così stabile come la t-PSA. In letteratura (Thomas, 2008) è raccomandato di misurare i campioni entro 24 ore. 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. PROCEDURA DEL SAGGIO

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

I Calibratori sono calibrati contro il WHO 96/668 e hanno le seguenti concentrazioni:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅
ng/mL	0	0,75	1,50	3	6	12

Contengono un conservante.

7.2. Preparazione della Wash Solution

Prima di iniziare il test, la soluzione di lavaggio deve essere diluita fino alla giusta concentrazione. Per ogni pozzetto sono necessari circa 2 mL di soluzione di lavaggio diluita. Calcolare il volume della soluzione necessaria per il dosaggio. Prendere 1/40 del volume della soluzione di lavaggio concentrata e diluire con 39/40 del volume di acqua distillata.

7.3. Procedura del test

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, calibratori, controlli e campioni a temperatura ambiente (18-25°C).
- Verificare che tutti i componenti non siano scaduti e verificare che le bottiglie e la piastra (sacchetto compreso) non siano danneggiati.
- 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 f-PSA superiori a 25 ng/mL devono essere diluiti con il sample diluent.

Reagenti	Calibratori	Campione	Controllo
Calibratore C ₀ -C ₅	25 µL		
Controllo			25 µL
Campione		25 µL	
Assay Reagent	50 µL	50 µL	50 µL
Miscelare la soluzione muovendo la micropiastra sul tavolo per 10 secondi. Incubare 1 h a temperatura ambiente (18-25°C)			
Enzyme Conjugate	50 µL	50 µL	50 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 la soluzione di lavaggio diluita e aspettare 10 secondi prima di rimuovere la soluzione; ripetere il lavaggio 5 (per un totale di 6 volte). <u>Procedura raccomandata:</u> lavare i pozzetti 6 volte con 250-300 µL di soluzione di lavaggio diluita 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 15 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)			

Risultati:

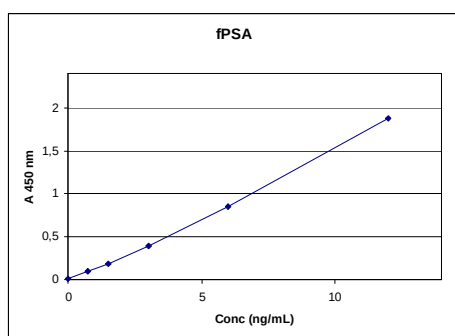
1. Calcolare l'assorbanza media per ogni duplicato.
2. Sottrarre il valore di assorbanza del calibratore zero dai valori di assorbanza media di calibratori, controllo e campioni.
3. Disegnare la curva di calibrazione in una carta per grafici lin-lin o log-log, riportando i valori di assorbanza dei calibratori contro le concentrazioni di PSA appropriate.
4. Leggere le concentrazioni di f-PSA per il controllo e i campioni.

8. VALIDITA' DEL SAGGIO

1. La OD 450 nm del pozzetto del Calibratore 0 è inferiore a 0,150. Valori più alti indicano una contaminazione cromogeno/substrato. In tal caso, ripetere il test controllando attentamente il reagente.
2. La OD 450 nm del Calibratore più alto (12 ng/mL) deve essere superiore a 0,9. Valori più bassi indicano un decadimento del kit o del controllo. In tal caso, controllare la data di scadenza del kit prima di ripetere il test.
3. Il controllo fornito non dovrebbe differire di non più del 15% dalla concentrazione indicata sull'etichetta del flaconcino, se eseguito almeno in doppio.

4. Foglio di lavoro e curva di calibrazione di un tipico dosaggio (non utilizzare per il calcolo dei risultati delle prove reali):

Pozzetti	Identity	A 450 nm		Conc. ng/mL
1-2	Cal 0 ng/mL	0.011	0.009	
3-4	Cal 0.75 ng/mL	0.109	0.096	
5-6	Cal 1.5 ng/mL	0.185	0.179	
7-8	Cal 3 ng/mL	0.393	0.392	
9-10	Cal 6 ng/mL	0.871	0.837	
11-12	Cal 12 ng/mL	1.901	1.844	
13-14	Control	0.218	0.231	2.05



Notare che i valori assoluti di OD per i Calibratori possono variare a causa di influenze di temperatura o con l'età del coniugato. I risultati per i campioni di PSA sconosciuti sono validi fino a quando i valori di OD identificano una curva di calibrazione e rimangono all'interno delle specifiche e il controllo mostra il valore atteso,

9. CONTROLLO QUALITA'

- 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.

10. VALORI ATTESI E LIMITAZIONI DEL TEST

Quando i valori della PSA totale sono nell'intervallo 4-10 ng/mL, il rapporto f-PSA / t-PSA può essere utilizzato per aumentare la specificità diagnostica del test per la PSA. Generalmente la probabilità di una condizione cancerogena aumenta con il diminuire della porzione di f-PSA.

Un rapporto f-PSA / t-PSA del 25% indica in genere una elevata probabilità di BPH (iperplasia prostatica benigna). Un basso valore di f-PSA segnala un probabile cancro alla prostata. La maggior parte degli uomini con cancro alla prostata hanno un valore di f-PSA inferiore al 15%. Se la f-PSA è inferiore al 7% il cancro alla prostata è più probabile. Secondo l'American Cancer Society e il National Cancer Institute, uomini con f-PSA inferiore al 7% devono essere sottoposti a biopsia.

Si prega di notare che un valore isolato di concentrazione di f-PSA non ha alcun valore diagnostico.

Per una discussione dettagliata circa le probabilità di cancro alla prostata e la percentuale di f-PSA vedere anche Gion et al. (1998).

I valori sopra riportati sono solo una guida per l'utente. Se possibile, è consigliabile che ogni laboratorio stabilisca i propri valori specifici, che tengano in considerazione una popolazione indigena della zona dove si trova il laboratorio. **Nota: i valori di PSA e il rapporto f-PSA / t-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 0.1 ng/mL.

11.2. Precisione

La precisione intra- ed inter- assay è stata indagata analizzando 3 sieri di pazienti con differente concentrazioni di PSA.

I risultati sono riportati nelle Tabelle 1 e 2.

Tabella 1) Intra-assay

Pazienti	Numero di replicati	Media ng/mL	SD ng/mL	CV %
1	10	0.31	0.024	7.7
2	10	1.75	0.107	6.1
3	10	9.63	0.623	6.5

Tabella 2) Inter-assay

Pazienti	Numero di replicati	Media ng/mL	SD ng/mL	CV %
1	10	2.86	0.17	6.1
2	10	0.75	0.06	7.8
3	10	2.1	0.16	7.8

11.3. Recupero

Sono stati preparati campioni sierici arricchiti aggiungendo aliquote di campioni con elevati valori di f-PSA a campioni sierici di uomini sani. Il recupero dell'antigene è nel range 91.8%-116%, con una media del 102%.

Tabella 3) Recupero

Campione	Valore atteso (ng/mL)	Valore osservato (ng/mL)	Recupero %
1	5.48	5.47	99.8
	2.74	3.19	116
	5.48	5.03	91.8
2	2.78	2.81	101
3	5.57	5.68	102
	2.74	2.82	103

11.4. Effetto Hook

Non è stato osservato nessun effetto Hook con campioni fino a 5000 ng/mL.

11.5. Correlazione

Il kit Diametra Free PSA ELISA è stato comparato con un kit commercialmente disponibile e marcato CE:

$$Y = 0.8922 \cdot X + 0.11; R^2 = 0.8977$$

In un successivo studio, il kit Diametra Free PSA ELISA è stato comparato con un altro kit:

$$Y = 1.0708 \cdot X; R^2 = 0.7969$$

11.6. Specificità

Il saggio è altamente specifico per la free PSA, con una cross-reattività relativamente bassa per altre proteine e polipeptidi, lipidi o agenti chemioterapici che possono essere presenti nei campioni dei pazienti.

Tabella 4) Specificità

Antigeni	Quantità aggiunta	Cross- reazione
Proteine		
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
Trigliceridi	15 mg/mL	No
Emoglobina	0.1 mg/ml	No
Agenti chemioterapici		No
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.

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. Independentemente 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

1. Fritsche HA und RJ. Babalan Clin Chem (1993) Vol: 39: 1529-1529 Analytical performance goals for measuring prostate-specific antigen:
2. Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaft (AWMF): Leitlinien der Deutschen Urologen: PSA-Bestimmung in der Prostatakarzinomdiagnostik (2003) <http://www.uni-duesseldorf.de/WWW/AWMF/II/urolog-36v.htm> (Stand Juli 2003)
3. Hammerer P. and Huland H., Der Onkologe (1996), Vol 2: 218-223 Früherkennung des Prostatakarzinoms. Onkologe
4. Milford Ward A. et al., Ann Clin Biochem (2001), Vol 38: 633-651 Prostate specific antigen: biology, biochemistry and available commercial assays.
5. 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.
6. Lange P et al., J Urol (1989) Vol 141:873 The value of serum prostate-specific antigen determinations before and after radical prostatectomy,
7. Akdas et al. British J Uro (1997) Vol 79: 920-923 The role of free prostate specific antigen in the diagnosis of prostate cancer
8. Thomas L (2008) Labor und Diagnose, TH-Books Verlagsgesellschaft 1342-1351
9. Gion M et al. (1998) Clin Chem 44: 2462-2470 Percent free prostate specific antigen in assessing the probability of prostate cancer under optimal analytical conditions

Ed. 01/2015

DCM138-3

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

Free PSA

for routine analysis

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

IVD



LOT

See external label

2°C 8°C



Σ = 96 test

REF DKO138

INTENDED USE

Diametra Free PSA ELISA is used for the quantitative determination of free Prostate Specific Antigen (f-PSA) in human serum or plasma samples. The determination of f-PSA levels is generally used in conjunction with a total PSA (t-PSA) measurement to determine the ratio between f-PSA and t-PSA. This ratio helps to estimate the risk for prostate cancer and to discriminate between elevated t-PSA levels caused by cancerous or non-cancerous conditions. F-PSA determinations are especially recommended for men with elevated t-PSA levels and negative results with digital rectal examination (DRE) in order to decide if a second prostate biopsy is indicated.

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. PSA is a 33 kDa serine proteinase. Immunohistological studies have shown that 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. In the blood plasma, most of the PSA forms complexes with various proteinase inhibitors. Only a small fraction of PSA circulates as free inactive PSA. Basically three major forms of PSA can be distinguished, only two of which are immunoreactive. The predominant form of PSA is a complex with α1-antichymotrypsin (ACT-PSA). Inactive free PSA (f-PSA) represents around 10-40% of the immunologically detectable PSA. The total amount of immunoreactive PSA is known as total PSA (t-PSA). PSA complexed with α-2-macroglobulin cannot be detected by immunological assays and is therefore frequently called occult PSA (o-PSA).

Current methods of screening men for prostate cancer utilize the detection of t-PSA. Levels of 4.0 ng/ml or higher

are strong indicators of the possibility of prostatic cancer and are an indication for follow-up examinations of the patient. However, elevated serum PSA levels are frequently also attributed to benign prostatic hyperplasia, leading to a high percentage of false positive screening results. A potential solution to this problem involves the determination of free PSA levels. Studies have suggested that the percentage of free PSA is lower in patients with prostate cancer than those with benign prostatic hyperplasia. Thus, the measurement of free serum PSA in conjunction with total PSA, can improve specificity of prostate cancer screening in selected men with elevated total serum PSA levels, which would subsequently reduce unnecessary prostate biopsies with minimal effects on cancer detection rates.

2. PRINCIPLE

This f-PSA ELISA is a solid phase enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The microtiter wells are coated with an anti-f-PSA monoclonal antibody, directed towards an epitope of an antigen molecule. 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** DCE002/13806-0
 - CAL1 **REF** DCE002/13807-0
 - CAL2 **REF** DCE002/13808-0
 - CAL3 **REF** DCE002/13809-0
 - CAL4 **REF** DCE002/13810-0
 - CAL5 **REF** DCE002/13811-0

Contain non-mercury preservative.

2. Controls (2 vial, 0.5 mL each)
 - Low Control **REF** DCE045/13804-0
 - High Control **REF** DCE045/13805-0

For concentration see the Certificate of Analysis.

Contains non-mercury preservative.

3. Coated Microplate (1 breakable microplate)
Monoclonal antibody anti PSA adsorbed on microplate
REF DCE002/13803-0

4. Assay Reagent (1 vial, 6 mL)
Contains non-mercury preservative
REF DCE043/13843-0

5. Enzyme Conjugate (1 vial, 6 mL)
Monoclonal antibody anti PSA conjugated to horseradish peroxidase. Contains non-mercury preservative.
REF DCE002/13802-0

6. 40X Wash Buffer (1 vial, 25 mL)
Dilute with distilled water before use.
REF DCE057/13857-0

7. TMB Substrate (1 vial, 12 mL)
Contains TMB (tetramethylbenzidine) and H₂O₂
REF DCE004/13804-0
8. 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 DCE005/13805-0

3.2. Material required but not provided

- Precision micropipettes (volume: 25 µL and 100 µL) with disposable tips
- Distilled water
- 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 °C 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.
- Opened kits retain activity for 8 weeks if stored as described above.

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 veinpuncture. 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. Please note that especially DRE might lead to an increase of f-PSA only, so that PSA carcinomas might be overlooked
- Prostatitis
- Liver dysfunction

The following conditions may lead to a decrease of PSA levels

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

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. F-PSA is not as stable as t-PSA. Literature (Thomas, 2008) recommends to measure samples within 24 hours. 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 WHO 96/668 and have the following concentrations:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅
ng/mL	0	0.75	1.50	3	6	12

Contain a preservative.

7.2. Preparation of the Wash Solution

Before starting the assay the wash buffer must be diluted to the right concentration. Per well approximately 2 mL of diluted buffer are needed. Calculate the volume of buffer required for the testing. Take 1/40 of the volume wash buffer concentrate and dilute with 39/40 of the volume distilled water.

7.1. Test 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 f-PSA value higher than 12 ng/mL should be diluted with the sample diluent.

Reagent	Calibrator	Sample	Controls
Calibrators C ₀ -C ₅	25 µL		
Controls			25 µL
Sample		25 µL	
Assay Reagent	50 µL	50 µL	50 µL
Mix by moving plate on the table (10 sec). Incubate 1 hour at room temperature (18-25°C).			
Enzyme Conjugate	50 µL	50 µL	50 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 diluted wash buffer and wait 10sec before removing the buffer; repeat wash 5 times (for a total of 6 times). We recommend the following procedure: wash wells 6-times with 250-300 µL/well diluted wash buffer. Preferably use an automated washing procedure. If washing manually, take care that the wash buffer 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 15 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 630nm)			

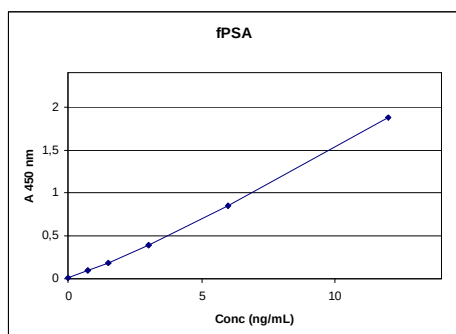
7.1. Results

1. Calculate the mean absorbance for each duplicate.
2. Subtract the absorbance value of the Calibrator 0 from the mean absorbance values of Calibrators, control and samples.
3. Draw the calibration curve on lin-lin or log-log graph paper by plotting absorbance values of Calibrators against appropriate PSA concentrations.
4. Read off the f-PSA concentrations for the control and the samples.

8. VALIDITY OF THE ASSAY

1. The OD 450 nm of the blanking well is lower than 0.150. Higher values indicate a chromogen/substrate contamination. In such a case, repeat the assay carefully checking the reagent.
2. The OD 450 nm of the highest Calibrator (12 ng/mL) must be higher than 0.9. Lower values indicate kit or control decay. In such a case, check the expiry date of the kit before repeating the assay.
3. The control provided should not differ by more than 15% from the concentration stated on the label of the vial if run at least in duplicate.
4. Worksheet and calibration curve of typical assay: not to be used for calculation of actual test results.

Wells	Identity	A 450 nm		Conc. ng/mL
1-2	Cal 0 ng/mL	0.011	0.009	
3-4	Cal 0.75 ng/mL	0.109	0.096	
5-6	Cal 1.5 ng/mL	0.185	0.179	
7-8	Cal 3 ng/mL	0.393	0.392	
9-10	Cal 6 ng/mL	0.871	0.837	
11-12	Cal 12 ng/mL	1.901	1.844	
13-14	Control	0.218	0.231	2.05



Note that the absolute OD values for the Calibrators might vary due to temperature influences or age of the conjugate. As long as the OD values form a calibration curve and remain within the specifications and the control shows the expected value, results for unknown PSA samples are valid.

9. QUALITY CONTROL

- It is recommended that internal controls are used in every assay.
- Control results should be within established ranges and should represent preferably low, medium and high concentrations.

10. EXPECTED VALUES LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

When total PSA values are between 4-10 ng/mL the ratio of f-PSA to t-PSA might be employed to increase the diagnostic specificity of PSA testing. Generally the likeliness of a cancerous condition increases the lower the f-PSA portion is.

A ratio of f-PSA to t-PSA of 25 % usually indicates a high probability of BPH (benign prostate hyperplasia). Low f-PSA likely signals prostate cancer. Most men with prostate cancer have an f-PSA value below 15 %. If free PSA is below 7% prostate cancer is most likely. According to the American Cancer Society and National Cancer Institute men with f-PSA below 7 % should undergo biopsy.

Please note that an isolated f-PSA concentration is of no diagnostic value.

For a detailed discussion of probabilities of prostate cancer and percent free PSA also see Gion et al. (1998).

The above values are only for user's guidance. 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.

Note: PSA values and the f-PSA to t-PSA 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 0.1 ng/mL.

11.2. Precision

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

Table 1) Intra-assay precision

Patients	Number of replicates	Mean ng/mL	SD ng/mL	CV %
1	10	0.31	0.024	7.7
2	10	1.75	0.107	6.1
3	10	9.63	0.623	6.5

Table 2) Inter-assay precision

Patients	Number of replicates	Mean ng/mL	SD ng/mL	CV %
1	10	2.86	0.17	6.1
2	10	0.75	0.06	7.8
3	10	2.1	0.16	7.8

11.3. Recovery

Spiked serum samples were prepared by adding aliquots of samples with highly elevated free PSA to normal male serum samples. The recovery of the antigen was in between 91.8 – 116% and in average 102%.

Table 3) Recovery

Sample	Expected value (ng/mL)	Observed value (ng/mL)	Recovery %
1	5.48	5.47	99.8
	2.74	3.19	116
	5.48	5.03	91.8
2	2.78	2.81	101
3	5.57	5.68	102
	2.74	2.82	103

11.4. Hook effect

No hook effect has been noticed with samples up to 5000 ng/mL.

11.5. Correlation

The f-PSA ELISA (EIA-4189) was compared to a commercially available and CE marked two step Free PSA Elisa:

$$Y = 0.8922x + 0.11; R^2 = 0.8977$$

In a second study the f-PSA ELISA (EIA-4189) was compared to a second reference f-PSA ELISA:

$$Y = 1.0708 x; R^2 = 0.7969$$

11.6. Specificity

The assay is highly specific for free PSA, 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
Triglyceride	15 mg/mL	No
Hemoglobin*	0.1 mg/ml	No
Chemotherapeutic Agents		No
Cyclophosphamid	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.

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 14.2. 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

1. Fritsche HA und RJ. Babalan Clin Chem (1993) Vol: 39: 1529-1529 Analytical performance goals for measuring prostate-specific antigen:
2. 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)
3. Hammerer P. and Huland H., Der Onkologe (1996), Vol 2: 218-223 Früherkennung des Prostatakarzinoms. Onkologe
4. Milford Ward A. et al., Ann Clin Biochem (2001), Vol 38: 633-651 Prostate specific antigen: biology, biochemistry and available commercial assays.
5. 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.
6. Lange P et al., J Urol (1989) Vol 141:873 The value of serum prostate-specific antigen determinations before and after radical prostatectomy,
7. Akdas et al. British J Uro (1997) Vol 79: 920-923 The role of free prostate specific antigen in the diagnosis of prostate cancer
8. Thomas L (2008) Labor und Diagnose, TH-Books Verlagsgesellschaft 1342-1351
9. Gion M et al. (1998) Clin Chem 44: 2462-2470 Percent free prostate specific antigen in assessing the probability of prostate cancer under optimal analytical conditions

Ed. 01/2015

DCM138-3

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

Free PSA

para análisis diagnóstico**Prueba inmunoenzimática para la determinación cuantitativa de la PSA (Prostata Specific Antigen) libre en suero y plasma humano.**

IVD



LOT

Ver etiqueta externa

2°C  8°C $\Sigma = 96$ test**REF DKO138**

USO PREVISTO

El kit Diametra Free PSA ELISA se utiliza para la determinación cuantitativa de la PSA libre (f-PSA) en suero o plasma humano. La cuantificación de los niveles de f-PSA se utiliza generalmente en combinación con la cuantificación de la PSA total (t-PSA) para determinar la relación entre f-PSA / t-PSA. Esta relación contribuye en la estimación del riesgo de un carcinoma prostático y en discriminar los niveles de PSA total elevados causados por condiciones no cancerosas de los causados por condiciones no cancerosas. La determinación de la f-PSA es particularmente indicada en los sujetos con elevadas concentraciones de t-PSA pero negativos al tacto prostático, con el propósito de decidir si es necesaria una segunda biopsia prostática.

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, fosfatasas alcalina total, CEA, etc.)

En el 1979, Wang et al. Aislaron un antígeno específico y lo llamaron PSA. El PSA es una serina-proteasa de 33kDa. 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 hiperplasicos benignos o malignos y en el cáncer metastaticos. Si la integridad estructural de la próstata se alter y/o las dimensiones de la glándula aumentan, la cantidad de PSA circulante se puede elevar. En la circulación sanguínea la mayor parte de la PSA forma complejos con inhibidores de las proteinasas. Solo una pequeña fracción de la PSA circula como PSA libre inactiva. Fundamentalmente se pueden distinguir tres principales formas de PSA, dos de las cuales son inmuno reactivas: la forma predominante es un complejo con la l'α1-antiquimiotripsina (ACT-PSA y la PSA libera que representa entre el 10-40% de la PSA inmunológicamente detectable. La cantidad total de la PSA inmunoreactiva se conoce como PSA total (t-PSA).

La PSA unida a la α-2-macroglobulina no puede ser detectada por los análisis inmunológicos y por lo tanto se le llama frecuentemente PSA oculta (o-PSA). Las metodologías actuales de tamizaje del cáncer prostático utilizan la detección de la t-PSA, niveles de 4,0ng/mL o mayores son fuertes indicadores de la probabilidad de un carcinoma prostático y dirigen hacia otros exámenes clínicos de seguimiento. Elevados niveles séricos de PSA pueden ser también causados por hiperplasias benignas que provocan un elevado porcentaje de falsos positivos en los procedimientos de tamizaje. Una posible solución a este problema implica la determinación de los niveles de PSA libre. Algunos estudios sugirieron que los niveles de PSA libre son mas bajos en los pacientes con cáncer prostático de los niveles en pacientes con hiperplasia prostática benigna. Por lo tanto la medición de la PSA libre en conjunto con la PSA total puede mejorar la especificidad del tamizaje del cáncer de la próstata en los hombres con elevados niveles de PSA total, lo cual permitiría reducir el número de biopsias prostáticas innecesarias con efectos mínimos sobre la tasa de incidencia del cáncer.

2. PRINCIPIO DEL METODO

Este kit es un ensayo inmunoenzimático en fase solida (ELISA), los pozos de la microplaca son revestidos con un anticuerpo monoclonal anti f-PSA dirigidos contra un epitopo de la molecula antigenica. 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 f-PSA. Después de la incubación la fracción E-Ab no ligada se lava y la cantidad de E-Ab ligada es proporcional al concentración sérica del f-PSA. Después de añadirse la solución sustrato, la intensidad de color desarrollado es proporcional a la concentración de f-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. PSA Calibradores (6 frascos, 0.5 mL cada uno)
CAL0/diluyente de muestra(10 mL) **REF DCE002/13806-0**
CAL1 **REF DCE002/13807-0**
CAL2 **REF DCE002/13808-0**
CAL3 **REF DCE002/13809-0**
CAL4 **REF DCE002/13810-0**
CAL5 **REF DCE002/13811-0**

Contienen conservante sin mercurio.

2. Controls (2 frascos, 0.5 mL cada uno)
Low Control **REF DCE045/13804-0**
High Control **REF DCE045/13805-0**

La concentración se indica en la hoja de control.
Contienen conservante sin mercurio.

3. Microplaca Revestida (1 microplaca)
Anticuerpo monoclonal anti PSA absorbido en la microplaca **REF DCE002/13803-0**

4. Reactivo de ensayo (1 frasco, 6 mL)
Contienen conservante sin mercurio. **REF DCE043/13843-0**

5. Enzyme Conjugado (1 frasco, 6 mL)
Anticuerpo anti PSA conjugado con peroxidasa de rábano (HRP). Contienen conservante sin mercurio. **REF DCE002/13802-0**

6. 40X Solución de lavado (1 frasco, 25 mL)
Diluir con agua destilada ante de usarse. **REF DCE057/13857-0**

7. Sustrato Solution (1 frasco, 12 mL)
Contiene TMB (tetramethylbenzidine) y H₂O₂ **REF DCE004/13804-0**

8. Solución de Parada (1 frasco, 14 mL)
Contiene ácido sulfúrico (H₂SO₄) (evitar el contacto, puede causar irritación y quemaduras) **REF DCE005/13805-0**

3.2. Reactivos necesarios no incluidos en el Kit

- Agua destilada.
- Pipetas automáticas (volumen: 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.
- Una vez abierto el kit es funcional durante dos meses si almacenado a la temperatura indicada.

5. PRECAUCIONES

- Los Kits ELISA son diseñados solamente para usarse en el diagnóstico in vitro por parte de profesionales en el área de la diagnóstica.
- 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 médico si fuera necesario.
- Sea los Calibradores que los controles de este kit son de origen humano. 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 infeccioso de las muestra y de los componentes del kit, todos los desechos deberán manejarse según la normativa que la autoridad sanitaria local disponga al respecto.
- 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.
- Úsese 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 96/668 y tienen las siguientes concentraciones:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅
ng/mL	0	0,75	1,50	3	6	12

Contienen conservante.

7.2. Preparación de la solución de lavado

Antes de principiar el test diluir la solución de lavado a la concentración correcta, para cada pozo son necesarios más o menos 2 mL de solución de lavado diluida. Calcular el volumen de la solución necesaria para el ensayo, tomar una parte (ejemplo: 1 mL) de solución de lavado concentrada y agregar 39 partes (ejemplo: 39 mL) de agua destilada.

7.3. 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 f-PSA superior de 12ng/mL deben ser diluidas don el diluyente de muestra.

Reactivos	Calibrador	Muestra	Control
Calibrador C ₀ -C ₅	25 µL		
Control			25 µL
Muestra		25 µL	
Reactivo de ensayo	50 µL	50 µL	50 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).			
Enzyme Conjugate	50 µL	50 µL	50 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 lenando los pozos con solución de lavado diluyda durante 10 segundos y luego descartar, repetir el lavado 5 veces (por un total de 6 veces) <u>Procedimiento recomendado:</u> lavar los pozos 6 veces con 250-300µL de solución de lavado diluida, 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.			
Sustrato Solution	100 µL	100 µL	100 µL
Incube 15 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 630nm)			

Resultados:

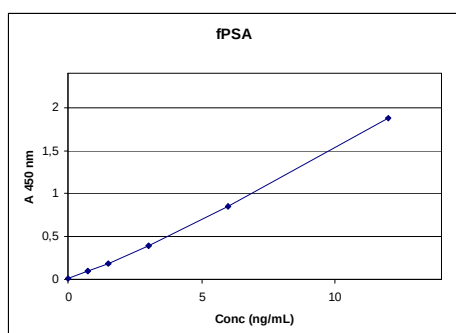
1. Calcular la absorbancia promedio de cada duplicado.
2. Restar el valor de absorbancia del Calibrador cero de las absorbancia de los Calibradores, controles y muestras.
3. Plotear la curva de los Calibradores en papel Linear-Linear o Log-Log (ABS versus Concentración), si dispone de un software de interpretación en el lector ELISA utilícelo.
4. Interpolan los valores de absorbancia en el grafico y calcular las concentraciones de los controles y las muestras.

8. Validación de la prueba

1. 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.
2. La absorbancia del Calibrador 12 ng/mL a 450nm debe ser superior a 0.900. Valores menores indican decaimiento del kit. Controlar la fecha de vencimiento del kit antes de repetir la prueba.
3. 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

4. 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 0.00ng/mL	0.011	0.009	
3-4	St 0.75ng/mL	0.109	0.096	
5-6	St 1.5ng/mL	0.185	0.179	
7-8	St 3.0ng/mL	0.393	0.392	
9-10	St 6.0ng/mL	0.871	0.837	
11-12	St 12.0ng/mL	1.901	1.844	
13-14	Control	0.218	0.231	2.05



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.

10. VALORES ESPERADOS Y LIMITACIONES DEL TEST

Con valores de PSA total entre 4-10ng/ml la relación entre f-PSA/t-PSA se puede utilizar para aumentar la especificidad diagnóstica del test de la PSA. Generalmente la probabilidad de un cáncer prostático aumenta con la disminución de la porción de la f-PSA. Una relación de f-PSA/t-PSA del 25% indica por lo general una elevada probabilidad de hiperplasia prostática benigna, un valor bajo de f-PSA por el contrario indica un probable carcinoma prostático. La mayor parte de hombres con cáncer prostático diagnosticado tiene un valor de f-PSA inferior al 15%. Si la f-PSA es inferior al 7% de la t-PSA el cáncer es más probable aun. Según la American Cancer Society e il National Cancer Institute, hombres con valores de f-PSA del 7% o menos deben ser sometidos a biopsia.

Notese que un valor aislado de concentración de f-PSA no tiene ningún valor diagnóstico.

Para una relación detallada acerca de las probabilidades de cancer prostáticos y porcentaje de f-PSA ver Gion et al. (1998)

Los valores arriba reportados son solo una guía para el usuario, de ser posible es aconsejable que el laboratorio fije sus límites dependiendo de los factores locales.

Nota: los valores de PSA y la relación f-PSA / t-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 diagnóstico del carcinoma prostático.

11. PRESTACIONES CARACTERISTICAS

11.1. Limite de detección

El límite de detección de este kit es: 0.1 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) Inter ensayo

Paciente	N. de replicados	Media ng/mL	SD ng/mL	CV %
1	10	0.31	0.024	7.7
2	10	1.75	0.107	6.1
3	10	9.63	0.623	6.5

Tabla 2) entre ensayo

Paciente	N. de replicados	Media ng/mL	SD ng/mL	CV %
1	10	2.86	0.17	6.1
2	10	0.75	0.06	7.8
3	10	2.1	0.16	7.8

11.3. Recuperación

Se prepararon muestras específicas enriqueciendo muestras de hombres saludables con alícuotas de muestras con valores elevados de f-PSA, la recuperación del antígeno esta en el rango del 91.8% al 116% con una media del 102%.

Tabla 3) Recuperación

Muestra	Valor esperado (ng/mL)	Valor observado (ng/mL)	Recuperación %
1	5.48	5.47	99.8
	2.74	3.19	116
	5.48	5.03	91.8
2	2.78	2.81	101
3	5.57	5.68	102
	2.74	2.82	103

11.4. Efecto Hook

No ha sido observado efecto hook con muestras con concentraciones hasta 5000ng/mL.

11.5. Correlación

El kit Diametra Free PSA ELISA ha sido comparado contra un kit comercialmente disponible y marcado CE:

$$Y = 0.8922 \cdot X + 0.11; R^2 = 0.8977$$

En un segundo estudio el kit Diametra Free PSA ELISA ha sido comparado contra otro kit:

$$Y = 1.0708 \cdot X; R^2 = 0.7969$$

11.6. Especificidad

El ensayo es altamente específico para la f-PSA, con reacciones cruzadas relativamente bajas para otras proteínas, polipeptidos, lípidos o agentes quimioterápicos que pueden estar presente en los sueros de los pacientes.

Tabla 4) Especificidad

Antígenos	Cantidad añadida	Reacción Cruzada
Proteínas		
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
Sustancias Interferentes		
Bilirrubina	0.2 mg/mL	No
Triglicéridos	15 mg/mL	No
Hemoglobina*	0.1 mg/ml	No
Agentes quimioterápicos		
Ciclofosfamida	800 µg/mL	No
Doxorubicina * HCl	20 µg/mL	No
Diethylstilbestrol	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

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 distintos 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

1. Fritsche HA und RJ. Babalan Clin Chem (1993) Vol: 39: 1529-1529 Analytical performance goals for measuring prostate-specific antigen:
2. 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)
3. Hammerer P. and Huland H., Der Onkologe (1996), Vol 2: 218-223 Früherkennung des Prostatakarzinoms. Onkologe
4. Milford Ward A. et al., Ann Clin Biochem (2001), Vol 38: 633-651 Prostate specific antigen: biology, biochemistry and available commercial assays.
5. 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.
6. Lange P et al., J Urol (1989) Vol 141:873 The value of serum prostate-specific antigen determinations before and after radical prostatectomy,
7. Akdas et al. British J Uro (1997) Vol 79: 920-923 The role of free prostate specific antigen in the diagnosis of prostate cancer
8. Thomas L (2008) Labor und Diagnose, TH-Books Verlagsgesellschaft 1342-1351
9. Gion M et al. (1998) Clin Chem 44: 2462-2470 Percent free prostate specific antigen in assessing the probability of prostate cancer under optimal analytical conditions

Ed. 01/2015

DCM138-3

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