



DCM064-5
Ed. 03/2012

fPSA

Determinazione immunoenzimatica diretta dell'Antigene Prostatico Specifico libero (fPSA) nel siero o plasma umano

RUO



LOT

Vedere etichetta esterna

2°C 8°C



Σ = 96 test

REF DKO064

DESTINAZIONE D'USO

Il kit fPSA è un saggio immunoenzimatico diretto in fase solida per la determinazione quantitativa dell'Antigene Prostatico Specifico libero (fPSA, free Prostate Specific Antigen) in siero o plasma umano. Il kit fPSA è destinato al solo uso di laboratorio.

1. SIGNIFICATO CLINICO

L'Antigene Prostatico Specifico (PSA) è una serina proteasi con attività simile alla chimotripsina. La PSA è una glicoproteina a catena singola con peso molecolare di 28,4 kDa. Il nome PSA deriva dalla constatazione che si tratta di un antigene normale della prostata e non si trova in altri tessuti normali o maligni. La PSA viene rilasciata dalla prostata ed è presente a basse concentrazioni sieriche in uomini sani. Studi con la tecnica PCR hanno dimostrato che la PSA è anche espressa ad una bassa concentrazione nelle cellule del sangue periferico e in altri tessuti. Elevate concentrazioni sieriche possono essere rilevate nei pazienti con cancro alla prostata (PCA). Pertanto la PSA viene utilizzata come un marcatore tumorale per la gestione clinica della PCA. Tuttavia, un aumento delle concentrazioni di PSA nel siero si verificano anche nei pazienti con iperplasia prostatica benigna (BPH). Da qui, nel laboratorio clinico l'obiettivo è quello di distinguere chiaramente tra BPH e PCA al fine di risparmiare al paziente procedure invasive di diagnosi, come ad esempio una biopsia della prostata.

Nel siero la PSA si presenta in due forme: PSA libera (fPSA) e PSA complessata. La forma principale è un complesso di PSA e α1-antichimotripsina (ACT). La frazione di fPSA è notevolmente più piccola nei pazienti non trattati con PCA rispetto ai pazienti con BPH. Dunque misurazioni combinate di fPSA e PSA totale (t-PSA) possono portare ad una migliore discriminazione tra BPH e PCA. Alcuni recenti studi hanno già dimostrato che il rapporto fPSA/tPSA è utile nella diagnosi differenziale di BPH e PCA.

La PSA è rilevabile in cancro alla prostata benigno, maligno e in metastasi. Dato che il cancro alla prostata è la seconda forma più diffusa di tumore maschile, il rilevamento di elevati livelli di PSA gioca un ruolo importante nella diagnosi precoce. A causa di una maggiore sensibilità, nella diagnosi e nella gestione di questi pazienti la misurazione dei livelli

sierici di PSA è più utile di quella della fosfatasi acida prostatica (PAP).

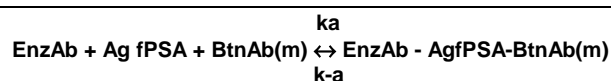
2. PRINCIPIO DEL METODO

Saggio immunoenzimatico.

In questo metodo calibratori, campioni e/o controlli (contenenti l'antigene fPSA nativo), sono aggiunti nei pozzetti della micropiastra sensibilizzati con streptavidina. Successivamente, nei pozzetti sono aggiunti, in eccesso, sia anticorpi monoclonali biotinilati sia anticorpi coniugati all'enzima; entrambi i tipi di anticorpi sono ad alta affinità e specificità e riconoscono epitopi diversi di fPSA.

Nei pozzetti della micropiastra, la reazione tra l'antigene nativo e gli anticorpi avviene senza competizione o impedimento sterico, e si forma un complesso sandwich solubile.

L'interazione è illustrata dalla seguente equazione:



BtnAb(m) = Anticorpo Biotinilato Monoclonale (in eccesso)

AgfPSA = Antigene Nativo (Quantità Variabile)

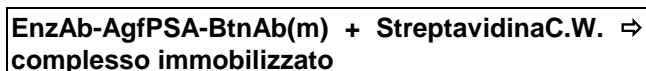
EnzAb = Anticorpo Marcato con Enzima (in eccesso)

EnzAb-AgfPSA-BtnAb(m) = Complesso Sandwich Antigene-Anticorpi

k_a = Costante di Associazione

k_{-a} = Costante di Dissociazione

Contemporaneamente, il complesso viene depositato sul pozzetto mediante la reazione ad alta affinità tra la streptavidina e l'anticorpo biotinilato. Tale interazione è illustrata qui sotto:



Streptavidina C.W. = Streptavidina immobilizzata sul pozzetto

Complesso immobilizzato = Legame sandwich Anticorpo-Antigene legato alla superficie

Una volta raggiunto l'equilibrio, la frazione legata dell'anticorpo si separa dall'antigene non reagito mediante decantazione o aspirazione. L'attività enzimatica nella frazione legata all'anticorpo è direttamente proporzionale alla concentrazione dell'antigene nativo libero. L'attività dell'enzima è quantificata mediante la reazione con un substrato che produce una colorazione. Utilizzando diversi calibratori a concentrazione nota di antigene, è possibile tracciare una curva dose-risposta, da cui si può determinare la concentrazione incognita dell'antigene.

3. REATTIVI, MATERIALI E STRUMENTAZIONE

3.1. Reattivi e materiali forniti nel kit

- fPSA Calibrators (6 flaconi, 1 mL ciascuno)
CAL0 **REF** DCE002/6406-0
CAL1 **REF** DCE002/6407-0
CAL2 **REF** DCE002/6408-0
CAL3 **REF** DCE002/6409-0
CAL4 **REF** DCE002/6410-0
CAL5 **REF** DCE002/6411-0
- Conjugate (1 flacone, 13 mL)
Anticorpi anti fPSA coniugato con perossidasi di rafano (HRP) e anti fPSA biotinilato
REF DCE002/6402-0
- Coated Microplate (1 micropiastra breakable)
Micropiastra coatta con streptavidina
REF DCE002/6403-0
- TMB Substrate (1 flacone, 15 mL)
H₂O₂-TMB (0,26 g/L) (*evitare il contatto con la pelle*)
REF DCE004-0
- Stop Solution (1 flacone, 15 mL)
Acido Solforico 0,15 mol/L (*evitare il contatto con la pelle*)
REF DCE005-0
- 50X Conc. Wash Solution (1 vial, 20 mL)
Tampone fosfato 50 mM pH 7.4, Tween-20 1 g/L
REF DCE006-0

3.2. Reattivi necessari non forniti nel kit

Acqua distillata.

3.3. Materiale e strumentazione ausiliari

Dispensatori automatici.

Lettore per micropiastre (450 nm).

Note

Conservare tutti i reattivi a 2-8°C, al riparo dalla luce.

Aprire la busta del Reattivo 3 (Coated Microplate) solo dopo averla riportata a temperatura ambiente e chiuderla subito dopo il prelievo delle strip da utilizzare; una volta aperta è stabile fino alla data di scadenza del kit. Evitare di staccare l'etichetta adesiva dalle strip che non vengono utilizzate nella seduta analitica.

4. AVVERTENZE

- Questo test kit è per uso in vitro, da eseguire da parte di personale esperto. Non per uso interno o esterno su esseri Umani o Animali.

- Usare i previsti dispositivi di protezione individuale mentre si lavora con i reagenti forniti.
- Seguire le Buone Pratiche di Laboratorio (GLP) per la manipolazione di prodotti derivati da sangue.
- Tutti i reattivi di origine umana usati nella preparazione dei reagenti sono stati testati e sono risultati negativi per la presenza di anticorpi anti-HIV 1&2, per HbsAg e per anticorpi anti-HCV. Tuttavia nessun test offre la certezza completa dell'assenza di HIV, HBV, HCV o di altri agenti infettivi. Pertanto, i Calibratori devono essere maneggiati come materiali potenzialmente infettivi.
- Alcuni reagenti contengono piccole quantità di Proclin 300^R come conservante. Evitare il contatto con la pelle e le mucose.
- Il TMB Substrato contiene un irritante, che può essere dannoso se inalato, ingerito o assorbito attraverso la cute. Per prevenire lesioni, evitare l'inalazione, l'ingestione o il contatto con la cute e con gli occhi.
- La Stop Solution è costituita da una soluzione di acido solforico diluito. L'acido solforico è velenoso e corrosivo e può essere tossico se ingerito. Per prevenire possibili ustioni chimiche, evitare il contatto con la cute e con gli occhi.
- Evitare l'esposizione del reagente TMB/H₂O₂ a luce solare diretta, metalli o ossidanti. Non congelare la soluzione.
- Questo metodo consente di determinare concentrazioni di fPSA da 0.5 ng/mL a 10.0 ng/mL.

5. PRECAUZIONI

- Si prega di attenersi rigorosamente alla sequenza dei passaggi indicata in questo protocollo. I risultati presentati qui sono stati ottenuti usando specifici reagenti elencati in queste Istruzioni per l'Uso.
- Tutti i reattivi devono essere conservati a temperatura controllata di 2-8°C nei loro contenitori originali. Eventuali eccezioni sono chiaramente indicate. I reagenti sono stabili fino alla data di scadenza se conservati e trattati seguendo le istruzioni fornite.
- Prima dell'uso lasciare tutti i componenti dei kit e i campioni a temperatura ambiente (22-28°C) e mescolare accuratamente.
- Non scambiare componenti dei kit di lotti diversi. Devono essere osservate le date di scadenza riportate sulle etichette della scatola e di tutte le fiale. Non utilizzare componenti oltre la data di scadenza.
- Qualora si utilizzi strumentazione automatica, è responsabilità dell'utilizzatore assicurarsi che il kit sia stato opportunamente validato.
- Un lavaggio incompleto o non accurato dei pozzetti può causare una scarsa precisione e/o un'elevato background.
- Per la riproducibilità dei risultati, è importante che il tempo di reazione di ogni pozzetto sia lo stesso. Per evitare il time shifting durante la dispensazione degli reagenti, il tempo di dispensazione dei pozzetti non dovrebbe estendersi oltre i 10 minuti. Se si protrae oltre, si

raccomanda di seguire lo stesso ordine di dispensazione. Se si utilizza più di una piastra, si raccomanda di ripetere la curva di calibrazione in ogni piastra.

- L'aggiunta del TMB Substrato dà inizio ad una reazione cinetica, la quale termina con l'aggiunta della Stop Solution. L'aggiunta del TMB Substrato e della Stop Solution deve avvenire nella stessa sequenza per evitare tempi di reazione differenti.
- Osservare le linee guida per l'esecuzione del controllo di qualità nei laboratori clinici testando controlli e/o pool di sieri.
- Osservare la massima precisione nella ricostituzione e dispensazione dei reagenti.
- Non usare campioni microbiologicamente contaminati, altamente lipemici o emolizzati.
- I lettori di micropiastre leggono l'assorbanza verticalmente. Non toccare il fondo dei pozzetti.

6. PROCEDIMENTO

6.1. Preparazione degli Calibrators (C₀...C₅)

I Calibratori sono pronti all'uso, sono stati calibrati usando una preparazione di riferimento (1st IS 96/670) ed hanno le seguenti concentrazioni:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅
ng/mL	0	0.5	1.0	2.5	5.0	10.0

Stabili fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta.

Dopo l'apertura dei flaconi, stabili 6 mesi a 2÷8°C.

6.2. Preparazione della Wash Solution

Prima dell'uso, diluire il contenuto di ogni fiala di soluzione di lavaggio tamponata concentrata (50X) con acqua distillata fino al volume di 1000 mL. Per preparare volumi minori rispettare il rapporto di diluizione di 1:50. La soluzione di lavaggio diluita è stabile a 2÷8°C per almeno 30 giorni.

6.3. Preparazione del Campione

- Utilizzare campioni di siero o plasma, e osservare le consuete precauzioni nella raccolta di campioni provenienti da prelievo per via venosa.
- Per un confronto approfondito che permetta di stabilire valori nella norma, raccogliere i campioni di siero o plasma al mattino e a digiuno.
- Per ottenere il siero, il sangue deve essere raccolto in un tubo da prelievo per via venosa, senza additivi o anticoagulanti. Lasciare coagulare il sangue. Centrifugare il campione per separare il siero dalle cellule.
- I campioni possono essere refrigerati a 2÷8°C per un periodo massimo di 5 giorni. Qualora non fosse possibile testare i campioni entro tale periodo, essi possono essere conservati a temperature di -20°C fino a 30 giorni.
- Evitare ripetuti congelamenti e scongelamenti.
- I campioni con concentrazioni di fPSA superiori a 10 ng/mL possono essere diluiti (per esempio 1:10 o diluizioni superiori) con siero di donna normale (fPSA = 0 ng/mL) e ridosati. La concentrazione del campione è poi ottenuto moltiplicando il risultato del dosaggio per il fattore di diluizione.

6.4. Procedimento

- **Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (22-28°C).**
- Le strisce di pozzetti non utilizzate devono essere rimesse immediatamente nella busta richiudibile contenente il materiale essiccante e conservate a 2-8°C.
- Per evitare potenziali contaminazioni microbiche e/o chimiche non rimettere i reagenti inutilizzati nei flaconi originali.
- Al fine di aumentare l'accuratezza dei risultati del test è necessario operare in doppio, allestendo due pozzetti per ogni punto della curva di calibrazione (C₀-C₅), due per ogni Controllo, due per ogni Campione ed uno per il Bianco.

Reagente	Calibratore	Campione	Bianco
Calibratore C ₀ -C ₅	50 µL		
Campione		50 µL	
Conjugate	100 µL	100 µL	
Incubare 1 ora a temperatura ambiente (22-28°C). Allontanare la miscela di reazione. Lavare i pozzetti 3 volte con 0,3 mL di soluzione di lavaggio diluita.			
TMB Substrate	100 µL	100 µL	100 µL
Incubare 15 minuti al buio a temperatura ambiente (22÷28°C).			
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL
Agitare delicatamente la piastra. Leggere l'assorbanza (E) a 450 nm contro il Bianco entro 5 minuti.			

7. RISULTATI

7.1. Validità del saggio

La OD del calibratore 5 deve essere ≥ 1,3.

7.2. Controllo di Qualità

Ogni laboratorio dovrebbe testare i controlli interni con livelli compresi nell'intervallo basso, normale ed alto per monitorare le prestazioni del saggio. Questi controlli dovrebbero essere trattati come campioni incogniti e i valori determinati in ogni seduta.

Conservare i fogli di controllo qualità, per seguire le prestazioni dei reagenti forniti.

Dovrebbero inoltre essere utilizzati pertinenti metodi statistici per verificare l'andamento.

Deviazioni significative rispetto alle prestazioni stabilite possono indicare un inosservato cambio di condizioni sperimentali o una degradazione dei reagenti kit. Devono essere usati reagenti freschi per determinare la ragione delle variazioni.

7.3. Conversione delle O.D.

Le densità ottiche (O.D.) di alcuni calibratori e di alcuni campioni potrebbero essere superiori a 2,0 e in tal caso, potrebbero essere fuori dal range di misurazione di alcuni lettori di micropiastre. È necessario in questi casi eseguire anche una lettura a 405 nm (= lunghezza d'onda alla quale si trova la spalla del picco) oltre alla lettura a 450 nm (lunghezza d'onda del picco) e a 620 nm (filtro di riferimento per la sottrazione delle interferenze dovute alla plastica).

Se si utilizzano i lettori non in grado di leggere a 3 lunghezze d'onda contemporaneamente, si raccomanda di procedere come segue:

- leggere la micropiastre a 450 nm e a 620 nm.
- leggere di nuovo la micropiastre a 405 nm e 620 nm.
- selezionare i pozzetti le cui OD a 450 nm sono più alte di 2,0.
- selezionare le corrispondenti OD a 405 nm e moltiplicare questi valori a 405 nm per fattore di conversione 3,0 (dove $OD_{450}/OD_{405} = 3,0$), cioè: $OD_{450\text{ nm}} = OD_{405\text{ nm}} \times 3,0$

Nota bene: il fattore 3,0 è solamente suggerito. Per migliore accuratezza, gli utilizzatori devono calcolare il fattore di conversione sul proprio lettore.

7.4. Elaborazione dei dati

- Metodo automatico

Utilizzare i metodi: 4 parametri logistici (di preferenza) o *smoothed cubic spline* come algoritmo di calcolo.

NOTA: Se per calcolare i risultati è stato usato un programma di calcolo, è imperativo che i valori calcolati per i calibratori cadano entro il 10% delle concentrazioni assegnate.

7.5. Elaborazione dei dato - Metodo manuale

Viene utilizzata una curva dose-risposta per determinare le concentrazioni di fPSA in campioni incogniti.

- Registrare le OD ottenute dalla stampa del lettore di micro piastre come nell'esempio 1.
- Tracciare su carta millimetrata una curva dose risposta (DRC) utilizzando la OD media per ciascun calibratore in duplicato contro le corrispondenti concentrazioni di fPSA in ng/mL.
- Tracciare la curva che passa per i punti. Per determinare la concentrazione di fPSA per un campione incognito, localizzare la OD media dei duplicati corrispondenti sull'asse verticale del grafico, trovare il punto di intersezione sulla curva e leggere la concentrazione (in ng/mL) sull'asse orizzontale del grafico (è possibile ricavare la media dei duplicati del campione incognito).

Esempio 1				
Campione	Pozzetto	OD	Media OD	Conc. ng/mL
CAL 0	A1	0.019	0.019	0
	B1	0.021		
CAL 1	C1	0.118	0.120	0.5
	D1	0.121		
CAL 2	E1	0.211	0.214	1.0
	F1	0.217		
CAL 3	G1	0.703	0.701	2.5
	H1	0.699		
CAL 4	A2	1.617	2.338	5.0
	B2	1.661		
CAL 5	C2	2.393	2.338	10.0
	D2	2.282		
paziente	E2	0.395	0.393	1.67
	F2	0.392		

I dati presentati nell'esempio 1 sono solamente illustrativi e non devono essere usati al posto di una curva dose risposta durante il dosaggio.

8. INTERPRETAZIONE

- La fPSA è elevata nell'iperplasia prostatica benigna (BPH). Clinicamente un elevato valore di fPSA da solo non è significativo a livello diagnostico come un test specifico per la BPH. Il rapporto fPSA/tPSA è un marker migliore e dovrebbe essere usata insieme ad altre osservazioni cliniche (DRE) e procedure diagnostiche (biopsia alla prostata).
- Quando la PSA totale (tPSA) si attesta a 4-10 ng/mL, il rapporto fPSA/tPSA è utile per differenziare la diagnosi di BPH e cancro alla prostata. In dipendenza di tale rapporto la probabilità di cancro alla prostata può essere determinata nel modo seguente:

Rapporto fPSA/tPSA	Probabilità di cancro alla prostata
0-10%	55%
10-15%	28%
15- 20%	25%
> 20%	10%

9. VALORI DI RIFERIMENTO

Valori attesi per la PSA in un test ELISA

	PSA
Uomini sani	≤ 1.3 ng/mL

È importante tenere presente che la determinazione di un range di valori attesi in un dato metodo per una popolazione "normale" è dipendente da molteplici fattori, quali la specificità e sensibilità del metodo in uso, e la popolazione in esame. Perciò ogni laboratorio dovrebbe considerare i range indicati dal Fabbricante come un'indicazione generale e produrre range di valori attesi propri basati sulla popolazione indigena dove il laboratorio risiede.

I risultati positivi dovrebbero essere verificati relativamente allo stato clinico del paziente. Inoltre, ogni decisione relativa alla terapia dovrebbe essere presa individualmente. Si raccomanda che ogni laboratorio stabilisca i suoi propri intervalli normale e patologico di PSA sierici.

10. PARAMETRI CARATTERISTICI

10.1. Precisione

La precisione intra- ed inter-assay del kit fPSA sono stati determinati con l'analisi di tre diversi livelli di sieri di controllo. Il numero, il valore medio, la deviazione standard (SD) e coefficiente di variazione per ciascuno di questi sieri di controllo sono presentati nella Tabella 2 e Tabella 3.

Tabella 2 Intra-assay (ng/mL)				
Campione	N	Media	SD	C.V.
Level 1	20	0.43	0.04	9.3%
Level 2	20	2.57	0.20	7.8%
Level 3	20	8.20	0.73	8.9%

Tabella 3 Inter-assay* (ng/mL)				
Campione	N	Media	SD	C.V.
Level 1	10	0.52	0.04	11.3%
Level 2	10	2.34	0.22	5.8%
Level 3	10	7.70	0.68	5.2%

*misura derivate da dieci esperimenti in duplicato

10.2. Correlazione con il dosaggio RIA

Il kit fPSA (Diametra) è stato comparato con un kit disponibile in commercio. Sono stati testati 167 campioni di siero.

La curva di regressione è:

$$\text{Diametra} = 0,9649^*(\text{Ref. kit}) + 0,0189$$

$$r^2 = 0,957$$

10.3. Sensibilità

Il kit fPSA ha una sensibilità di 0.052 ng/mL.

10.4. Specificità

Non è stata rilevata alcuna interferenza con il kit Diametra PSA Elisa dopo l'aggiunta di grandi quantità delle seguenti sostanze a un pool di siero umano:

Composto	Concentrazione aggiunta
AFP	10 µg/mL
Atropine	100 µg/mL
Acetylsalicylic Acid	100 µg/mL
Ascorbic Acid	100 µg/mL
Caffeine	100 µg/mL
Dexamethasone	10 µg/mL
Flutamide	100 µg/mL
hCG	100 IU/mL
hLH	100 IU/mL
Methotrexate	100 µg/mL
Prolactin	100 µg/mL
TSH	100 mIU/mL

11. DISPOSIZIONI PER LO SMALTIMENTO

I reagenti devono essere smaltiti in accordo con le leggi locali.

BIBLIOGRAFIA

- Christensson A, Laurell CB, Lilja H., *Eur J Biochem*, 194, 755- 63 (1990).
- Watt KW, et. al., *Proc Nat Acad Sci USA*, 83, 3166-70 (1986).
- Chen Z, Prestigiacomo A, Stamey T., *Clin Chem*, 41, 1273-82 (1995).
- Wild D, *The Immunoassay Handbook*, Stockton Press (1994) p452.
- Junker R, Brandt B, Zechel C, Assmann G, *Clin Chem*, 43, 1588- 94 (1997).
- Prestigiacomo AF, Stamey TA, ' *Physiological variations of serum prostate antigen in the (4-10 ng/mL) range in male volunteers.*' *J. Urol* 1996;155:1977-80.
- Stamey TA, McNeal JE, Yemoto CM, Sigal BM, Johnstone IM, ' *Biological determinants of cancer progression in men with prostate cancer.*' *JAMA* 1999;281:1395-1400.
- Chen Z, Prestigiacomo A, Stamey T, ' *Purification and characterization of Prostate Specific Antigen (PSA) Complexed to a1-Anticymotrypsin: Potential reference Material for International Calibration of PSA Immunoassays.*' *Clin Chem*. 1995;41/9:1273-1282.
- Horton GL, Bahnsen RR, Datt M, Cfhan KM, Catalona WJ and Landenson JH. ' *Differences in values obtained with two assays of Prostate Specific Antigen.*' *J. Urol*. 1988;139:762-72.
- Stenman UH, Leinonen J, Alfthan H, Rannikko S, Tuhkanen Kand Alfthan O. ' *A complex between prostate specific antigen anda1-anticymotrypsin is the major form of prostate specific antigenin serum of patients with prostate cancer: assay of complex improves clinical sensitivity for cancer.*' *Cancer Res*. 1991;51:222-26.

Ed. 03/2012

DCM064-5

DiaMetra S.r.l. Headquater: Via Garibaldi, 18 –
20090 SEGRATE (MI) Italy
Tel. 0039-02-2139184 – 02-26921595
Fax 0039-02-2133354.

Manufactory: Via Pozzuolo 14, 06038 SPELLO (PG)
Italy
Tel. 0039-0742-24851
Fax 0039-0742-316197
E-mail: info@diametra.com



DCM064-5
Ed. 03/2012

fPSA

Direct immunoenzymatic determination of free Prostatic Specific Antigen (fPSA) in human serum or plasma

RUO



LOT

See external label

2°C  8°C



Σ = 96 tests

REF DKO064

INTENDED USE

fPSA kit is a direct solid phase enzyme immunoassay for quantitative determination of Free Prostatic Specific Antigen (fPSA) in human serum or plasma. fPSA kit is intended for laboratory use only.

1. CLINICAL SIGNIFICANCE

Prostate Specific antigen (PSA) is a serine protease with chymotrypsin-like activity. PSA is a single chain glycoprotein with a molecular weight of 28.4 kDA. PSA derives its name from the observation that it is a normal antigen of the prostate and is not found in any other normal or malignant tissue. PSA is released from the normal prostate and appears at low serum concentrations in healthy men. Studies with reverse transcription-PCR have shown that PSA also is expressed at a low concentration in peripheral blood cells and other tissues. High serum concentrations can be detected in patients with advanced prostate cancer (PCA). Therefore PSA is applied as a tumor marker for the clinical management of PCA. However, increased PSA concentrations in serum also occur in patients with benign prostate hyperplasia (BPH). Hence the goal in clinical laboratory is to discriminate clearly between BPH and PCA to spare the patient invasive diagnostic procedures, such as a prostate biopsy.

In human serum PSA occurs in two forms: free PSA (f-PSA) and complexed PSA. The major form is a complex of PSA and α_1 -antichymotrypsin (ACT). The fraction of f-PSA was shown to be substantially smaller in patients with untreated PCA than in patients with BPH. Therefore combined measurements of f-PSA and total PSA (t-PSA) may lead to a better discrimination between BPH and PCA. Some recent studies have already shown that the f-PSA/t-PSA ratio is helpful in the differential diagnosis of BPH and PCA.

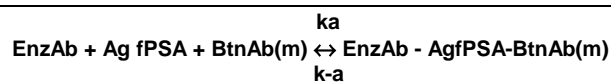
PSA is found in benign, malignant and metastatic prostate cancer. Since prostate cancer is the second most prevalent form of male malignancy, the detection of elevated PSA levels plays an important role in the early diagnosis. Due to increased sensitivity, serum PSA levels have been found to be more useful than prostatic acid phosphatase (PAP) in the diagnosis and management of patients.

2. PRINCIPLE OF THE METHOD

Immunoenzymometric assay:

In this method, calibrators, patient specimens and/or controls (containing the native fPSA antigen) are first added to streptavidin coated wells. Biotinylated monoclonal and enzyme labeled antibodies are then added and the reactants mixed: these antibodies have high affinity and specificity and are directed against distinct and different epitopes of fPSA. Reaction between the various fPSA antibodies and native fPSA occurs in the microwells without competition or steric hindrance, forming a soluble sandwich complex

The interaction is illustrated by the following equation:



BtnAb(m) = Biotinylated Monoclonal Antibody (Excess Quantity)

AgfPSA = Native Antigen (Variable Quantity)

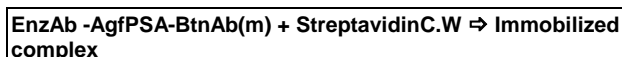
EnzAb = Enzyme labeled Antibody (Excess Quantity)

EnzAb -AgfPSA-BtnAb(m) = Antigen-Antibodies Sandwich Complex

k_a = Rate Constant of Association

k_{-a} = Rate Constant of Dissociation

Simultaneously, the complex is deposited to the well through the high affinity reaction of streptavidin and biotinylated antibody. This interaction is illustrated below:



StreptavidinC.W. = Streptavidin immobilized on well
Immobilized complex = sandwich complex bound to the well

After equilibrium is attained, the antibody-bound fraction is separated from unbound antigen by decantation or aspiration. The enzyme activity in the antibody-bound fraction is directly proportional to the native antigen concentration. The activity of the enzyme present on the surface of the well is

quantitated by reaction with a suitable substrate to produce colour. By utilizing several different calibrators of known antigen values, a dose response curve can be generated from which the antigen concentration of an unknown can be ascertained.

3. REAGENTS, MATERIALS AND INSTRUMENTATION

3.1. Reagents and materials supplied in the kit

1. fPSA Calibrators (6 vials, 1 mL each)

CAL0	REF DCE002/6406-0
CAL1	REF DCE002/6407-0
CAL2	REF DCE002/6408-0
CAL3	REF DCE002/6409-0
CAL4	REF DCE002/6410-0
CAL5	REF DCE002/6411-0
2. Conjugate (1 vial, 13 mL)
Antibodies anti fPSA conjugate with horseradish peroxidase (HRP) and anti fPSA biotinylated
REF DCE002/6402-0
3. Coated Microplate (1 microplate breakable)
Microplate coated with streptavidin
REF DCE002/6403-0
4. TMB Substrate (1 vial, 15 mL)
H₂O₂-TMB 0.26 g/L (*avoid any skin contact*)
REF DCE004-0
5. Stop Solution (1 vial, 15 mL)
Sulphuric acid 0.15 mol/L (*avoid any skin contact*)
REF DCE005-0
6. 50X Conc. Wash Solution (1 vial, 20 mL)
Phosphate buffer 50 mM pH 7.4; Tween-20 1 g/L
REF DCE006-0

3.2. Reagents necessary not supplied

Distilled water.

3.3. Auxiliary materials and instrumentation

Automatic dispenser.

Microplates reader (450 nm).

Notes

Store all reagents at 2-8°C in the dark.

Open the bag of reagent 3 (Coated Microplate) only when it is at room temperature and close it immediately after use; once opened, it is stable up to expiry date of the kit. Do not remove the adhesive sheets on the unutilised strips.

4. WARNINGS

- This kit is intended for in vitro use by professional persons only. Not for internal or external use in Humans or Animals.
- Use appropriate personal protective equipment while working with the reagents provided.
- Follow Good Laboratory Practice (GLP) for handling blood products.
- All human source material used in the preparation of the reagents has been tested and found negative for antibody to HIV 1&2, HbsAg, and HCV. No test method however can offer complete assurance that HIV, HBV, HCV or other infectious agents are absent. Therefore, the Calibrators

should be handled in the same manner as potentially infectious material.

- Some reagents contain small amounts of Proclin 300^R as preservative. Avoid the contact with skin or mucosa.
- The TMB Substrate contains an irritant, which may be harmful if inhaled, ingested or absorbed through the skin. To prevent injury, avoid inhalation, ingestion or contact with skin and eyes.
- The Stop Solution consists of a diluted sulphuric acid solution. Sulphuric acid is poisonous and corrosive and can be toxic if ingested. To prevent chemical burns, avoid contact with skin and eyes.
- Avoid the exposure of reagent TMB/H₂O₂ to directed sunlight, metals or oxidants. Do not freeze the solution.
- This method allows the determination of fPSA from 0.5 ng/mL to 10.0 ng/mL.

5. PRECAUTIONS

- Please adhere strictly to the sequence of pipetting steps provided in this protocol. The performance data represented here were obtained using specific reagents listed in this Instruction For Use.
- All reagents should be stored refrigerated at 2-8°C in their original container. Any exceptions are clearly indicated. The reagents are stable until the expiry date when stored and handled as indicated.
- Allow all kit components and specimens to reach room temperature (22-28°C) and mix well prior to use.
- Do not interchange kit components from different lots. The expiry date printed on box and vials labels must be observed. Do not use any kit component beyond their expiry date.
- If you use automated equipment, the user has the responsibility to make sure that the kit has been appropriately tested.
- The incomplete or inaccurate liquid removal from the wells could influence the assay precision and/or increase the background.
- It is important that the time of reaction in each well is held constant for reproducible results. Pipetting of samples should not extend beyond ten minutes to avoid assay drift. If more than 10 minutes are needed, follow the same order of dispensation. If more than one plate is used, it is recommended to repeat the dose response curve in each plate
- Addition of the TMB Substrate solution initiates a kinetic reaction, which is terminated by the addition of the Stop Solution. Therefore, the TMB Substrate and the Stop Solution should be added in the same sequence to eliminate any time deviation during the reaction.
- Observe the guidelines for performing quality control in medical laboratories by assaying controls and/or pooled sera.
- Maximum precision is required for reconstitution and dispensation of the reagents.
- Samples microbiologically contaminated, highly lipemic or haemolysed should not be used in the assay.
- Plate readers measure vertically. Do not touch the bottom of the wells.

6. PROCEDURE

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

The Calibrators are ready to use, were calibrated using a reference preparation (1st IS 96/670) and have the following concentration:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅
ng/mL	0	0.5	1.0	2.5	5.0	10.0

Stability: until the expiry date printed on the label.

Once opened, the Calibrators are stable 6 months at 2-8°C.

6.2. Preparation of the Wash Solution

Dilute contents of wash buffer concentrate (50X) to 1000 mL with distilled or deionised water in a suitable storage container. For smaller volumes respect the dilution ratio of 1:50. The diluted buffer is stable at 2-8°C for at least 30 days.

6.3. Preparation of the Sample

- The specimens can be human serum or plasma; the usual precautions in the collection of venipuncture samples should be observed.
- For accurate comparison to established normal values, a fasting morning serum sample should be obtained.
- To obtain the serum, the blood should be collected in a venipuncture tube without additives or anti-coagulants. Allow the blood to clot. Centrifuge the specimen to separate serum from cells.
- Samples may be refrigerated at 2-8°C for a maximum period of 5 days. If specimens cannot be assayed within this time, the samples may be stored at temperatures of -20°C for up to 30 days.
- Avoid repetitive freezing and thawing.
- Patient specimens with fPSA concentrations above 10 ng/mL may be diluted (for example 1:10 or higher) with normal female serum (PSA = 0 ng/mL) and re-assayed. The sample's concentration is obtained by multiplying the result by the dilution factor.

6.4. Procedure

- **Allow all reagents to reach room temperature (22-28°C).**
- Unused coated microwell strips should be released securely in the foil pouch containing desiccant and stored at 2-8°C.
- To avoid potential microbial and/or chemical contamination, unused reagents should never be transferred into the original vials.
- As it is necessary to perform the determination in duplicate in order to improve accuracy of the test results, prepare two wells for each point of the calibration curve (C₀-C₅), two for each Control, two for each sample, one for Blank.

Reagent	Calibrator	Sample	Blank
Calibrator C ₀ -C ₅	50 µL		
Sample		50 µL	
Conjugate	100 µL	100 µL	
Incubate at room temperature (22-28°C) for 1 hour. Remove the contents from each well; wash the wells 3 times with 300 µL of diluted Wash Solution.			
TMB Substrate	100 µL	100 µL	100 µL
Incubate 15 minutes in the dark at room temperature (22±28°C).			
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL
Shake the microplate gently. Read the absorbance (E) at 450 nm against Blank within 5 minutes.			

7. RESULTS

7.1. Validity of the assay

The OD of calibrator 5 should be ≥ 1.3.

7.2. Quality control

Each laboratory should assay controls at levels in the low, medium and high ranges of the dose response curve for monitoring assay performance. These controls should be treated as unknowns and values determined in every test procedure performed. Quality control charts should be maintained to follow the performance of the supplied reagents. Pertinent statistical methods should be employed to ascertain trends. Significant deviation from established performance can indicate unnoticed change in experimental conditions or degradation of kit reagents. Fresh reagents should be used to determine the reason for the variations.

7.3. OD conversion

The optical densities (O.D.s) of some calibrators and samples may be higher than 2.0; in such a case, they could be out of the measurement range of the microplate reader. It is therefore necessary, for O.D.s higher than 2.0, to perform a reading at 405 nm (= wavelength of peak shoulder) in addition to 450 nm (peak wavelength) and 620 (reference filter for the subtraction of interferences due to the plastic). For microplate readers unable to read the plate at 3 wavelengths at the same time, it is advisable to proceed as follows:

- Read the microplate at 450 nm and at 620 nm.
- Read again the plate at 405 nm and 620 nm.
- Find out the wells whose ODs at 450 nm are higher than 2.0
- Select the corresponding ODs read at 405 nm and multiply these values at 405 nm by the conversion factor 3.0 (where OD 450/OD 405 = 3.0), that is: $OD_{450\text{ nm}} = OD_{405\text{ nm}} \times 3.0$.

Warning: The conversion factor 3.0 is suggested only. For better accuracy, the user is advised to calculate the conversion factor specific for his own reader.

7.4. Data reduction - automated method

Use the 4 parameters logistic – preferred – or the smoothed cubic spline function as calculation algorithm.

NOTE: If computer controlled data reduction is used to calculate the results of the test, it is imperative that the predicted values for the calibrators fall within 10% of the assigned concentrations.

7.5. Data reduction: manual method

A dose response curve is used to ascertain the concentration of fPSA in unknown specimens.

- Record the OD obtained from the printout of the microplate reader as outlined in Example 1.
- Plot the OD for each duplicate calibrator versus the corresponding fPSA concentration in ng/mL on linear graph paper (do not average the duplicates of the calibrators before plotting).
- Draw the best-fit curve through the plotted points. To determine the concentration of fPSA for an unknown, locate the average absorbance of the duplicates for each unknown on the vertical axis of the graph, find the intersecting point on the curve, and read the concentration (in ng/mL) from the horizontal axis of the graph (the duplicates of the unknown may be averaged as indicated).

EXAMPLE 1				
Sample ID	Well number	OD	Mean OD	Value ng/mL
CAL 0	A1	0.019	0.019	0
	B1	0.021		
CAL 1	C1	0.118	0.120	0.5
	D1	0.121		
CAL 2	E1	0.211	0.214	1.0
	F1	0.217		
CAL 3	G1	0.703	0.701	2.5
	H1	0.699		
CAL 4	A2	1.617	2.338	5.0
	B2	1.661		
CAL 5	C2	2.393	2.338	10.0
	D2	2.282		
patient	E2	0.395	0.393	1.67
	F2	0.392		

The data presented in Example 1 are for illustration only and should not be used in lieu of a dose response curve prepared with each assay.

8. INTERPRETATION

- fPSA is elevated in benign prostatic hyperplasia (BPH). Clinically an elevated fPSA value alone is not of diagnostic value as a specific test for differential diagnosis of BPH. The ratio of fPSA/tPSA is a better marker and should be used in conjunction with other clinical observations (DRE) and diagnostic procedures (prostate biopsy).

- When the total PSA (tPSA) reads 4-10 ng/mL the fPSA/tPSA ratio is useful in the differential diagnosis of BPH and PC (Prostate Cancer). Depending on the ratio the probability can be determined as follows:

fPSA/tPSA Ratio	Probability of Prostate Cancer
0-10%	55%
10-15%	28%
15- 20%	25%
> 20%	10%

9. REFERENCE VALUES

Expected Values for the PSA Elisa Test System

PSA	
Healthy Males	≤ 1.3 ng/mL

Please pay attention to the fact that the determination of a range of expected values for a “normal” population in a given method is dependent on many factors, such as specificity and sensitivity of the method used and type of population under investigation. Therefore each laboratory should consider the range given by the Manufacturer as a general indication and produce their own range of expected values based on the indigenous population where the laboratory works.

Positive results should be verified concerning the entire clinical status of the patient. Also every decision for therapy should be taken individually. It is recommended that each laboratory establishes its own normal and pathological ranges of seric PSA.

10. PERFORMANCE AND CHARACTERISTICS

10.1. Precision

The within and between assay precision of the fPSA kit were determined by analyses on three different levels of control sera. The number, mean value, Calibrator deviation (SD) and coefficient of variation for each of these control sera are presented in Table 2 and Table 3.

Table 3 Between Assay Precision* (ng/mL)				
Sample	N	Mean	SD	C.V.
Level 1	10	0.52	0.04	11.3%
Level 2	10	2.34	0.22	5.8%
Level 3	10	7.70	0.68	5.2%

*As measured in ten experiments in duplicate

Table 2 Within Assay Precision (ng/mL)				
Sample	N	Mean	SD	C.V.
Level 1	20	0.43	0.04	9.3%
Level 2	20	2.57	0.20	7.8%
Level 3	20	8.20	0.73	8.9%

10.2. Accuracy-method comparison

Diametra fPSA kit was compared to a commercially available fPSA kit. 167 serum samples were tested.

The regression curve is:

Diametra = 0.9649*(reference kit) + 0.0189

R squared = 0.957

10.3. Sensitivity

fPSA kit has a sensitivity of 0.052 ng/mL.

10.4. Specificity

No interference was detected with the performance of Diametra PSA Elisa upon addition of massive amounts of the following substances to a human serum pool.

Compound	Concentration Added
AFP	10 µg/mL
Atropine	100 µg/mL
Acetylsalicylic Acid	100 µg/mL
Ascorbic Acid	100 µg/mL
Caffeine	100 µg/mL
Dexamethasone	10 µg/mL
Flutamide	100 µg/mL
hCG	100 IU/mL
hLH	100 IU/mL
Methotrexate	100 µg/mL
Prolactin	100 µg/mL
TSH	100 mIU/mL

11. WASTE MANAGEMENT

Reagents must be disposed off in accordance with local regulations.

BIBLIOGRAPHY

- Christensson A, Laurell CB, Lilja H., *Eur J Biochem*, 194, 755- 63 (1990).
- Watt KW, et. al., *Proc Nat Acad Sci USA*, 83, 3166-70 (1986).
- Chen Z, Prestigiacomo A, Stamey T., *Clin Chem*, 41, 1273-82 (1995).
- Wild D, *The Immunoassay Handbook*, Stockton Press (1994) p452.
- Junker R, Brandt B, Zechel C, Assmann G, *Clin Chem*, 43, 1588- 94 (1997).
- Prestigiacomo AF, Stamey TA, ' *Physiological variations of serum prostate antigen in the (4-10 ng/mL) range in male volunteers.*' *J. Urol* 1996;155:1977-80.
- Stamey TA, McNeal JE, Yemoto CM, Sigal BM, Johnstone IM,'*Biological determinants of cancer progression in men with prostate cancer.*' *JAMA* 1999;281:1395-1400.
- Chen Z, Prestigiacomo A, Stamey T, 'Purification and characterization of Prostate Specific Antigen (PSA) Complexed to a1-Anticymotrypsin:Potential reference Material for International Calibratorization of PSA Immunoassays.' *Clin Chem*. 1995;41/9:1273-1282.
- Horton GL, Bahnson RR, Datt M, Cfhan KM, Catalona WJ and Landenson JH.'*Differences in*

values obtained with two assays of Prostate Specific Antigen.' *J. Urol*. 1988;139:762-72.

- Stenman UH, Leinonen J, Alfthan H, Rannikko S, Tuhkanen Kand Alfthan O.'*A complex between prostate specific antigen anda1-anticymotrypsin is the major form of prostate specific antigenin serum of patients with prostate cancer:assay of complex improves clinical sensitivity for cancer.*' *Cancer Res*.1991;51:222-26.

Ed. 03/2012

DCM064-5

DiaMetra S.r.l. Headquater: Via Garibaldi, 18 – 20090 SEGRATE (MI) Italy

Tel. 0039-02-2139184 – 02-26921595

Fax 0039-02-2133354.

Manufactory: Via Pozzuolo 14, 06038 SPELLO (PG) Italy

Tel. 0039-0742-24851

Fax 0039-0742-316197

E-mail: info@diametra.com



DCM016-11
Ed. 03/2012

fPSA

Determinación inmunoenzimática directa del antígeno prostático específico libre en suero o plasma humanos.

RUO



LOT

Ver etiqueta externa

2°C  8°C



Σ = 96 ensayos

REF DKO064

USO PREVISTO

El kit de fPSA es un inmunoensayo enzimático directo en fase sólida para la determinación cuantitativa del antígeno prostático específico libre (fPSA) en suero o plasma humanos.

1. RESUMEN Y EXPLICACIÓN DEL ENSAYO

El antígeno prostático específico (PSA) es una serina proteasa con actividad similar a la quimotripsina. La proteína es una glicoproteína de cadena sencilla con un peso molecular de 28,4 kDa. El antígeno prostático específico (PSA) recibe su nombre de la observación de que se trata de un antígeno normal de la próstata pero no se encuentra en ningún otro tejido normal o maligno. El PSA se genera por la próstata normal y aparece en concentraciones de suero bajas en hombres sanos. Estudios de PCR en transcripción reversa han demostrado que el PSA también aparece en una concentración baja en células de sangre periférica y otros tejidos. Pueden detectarse concentraciones de suero altas en pacientes con cáncer de próstata avanzado (PCA). Por lo tanto, el PSA se aplica como un marcador tumoral para la gestión clínica del PCA. Sin embargo, también aparecen concentraciones de PSA aumentadas en suero en pacientes con hiperplasia benigna de próstata (BPH). Por lo tanto, el objetivo consiste en distinguir claramente entre BPH y PCA en el laboratorio clínico para evitar al paciente procedimientos de diagnóstico invasivos, como la biopsia de próstata. El PSA aparece en suero humano de dos formas: PSA libre (fPSA) y PSA complejo. La forma principal es un complejo de PSA y α_1 -antiquimotripsina (ACT). La fracción de fPSA ha resultado ser sustancialmente menor en pacientes con PCA no tratado que en pacientes con BPH. Por lo tanto, las mediciones combinadas de fPSA y PSA total (tPSA) pueden llevar a una mejor distinción entre BPH y PCA. Algunos estudios recientes ya han demostrado que la relación fPSA/tPSA resulta útil en el diagnóstico diferencial de BPH y PCA. El PSA se encuentra en el cáncer de próstata benigno, maligno y metastásico. Puesto que el cáncer de próstata es la segunda forma más frecuente de malignidad masculina, la detección de niveles elevados de PSA

juega un papel importante en el diagnóstico precoz. Los niveles séricos de PSA han resultado ser más útiles que la fosfatasa ácida prostática (PAP) en el diagnóstico y tratamiento de los pacientes debido a la sensibilidad aumentada.

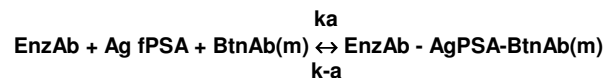
2. PRINCIPIO DEL ENSAYO

Ensayo inmunoenzimométrico:

Con este método, los calibradores, las muestras del paciente y/o los controles (que contienen el antígeno de fPSA nativo) se añaden primero a pocillos recubiertos con estreptavidina. Después, se añaden anticuerpos monoclonales biotinilados y marcados con una enzima, y se mezclan los reactivos: estos anticuerpos tienen alta afinidad y especificidad, y se dirigen contra distintos epítopes de fPSA.

La reacción entre los distintos anticuerpos de fPSA y el fPSA nativo se produce en los micropocillos sin competencia o impedimento estérico, formando un complejo sándwich soluble

La interacción se ilustra mediante la siguiente ecuación:



BtnAb(m) = anticuerpo monoclonal biotinilado (cantidad en exceso)

AgfPSA = antígeno nativo (cantidad variable)

EnzAb = anticuerpo marcado con una enzima (cantidad en exceso)

EnzAb -AgfPSA-BtnAb(m) = complejo sándwich antígeno-anticuerpos

k_a = tasa constante de asociación

k_{-a} = tasa constante de disociación

Al mismo tiempo, el complejo se deposita en el pocillo mediante la reacción de alta afinidad de la estreptavidina y el anticuerpo biotinilado. Esta interacción se ilustra a continuación:



Estreptavidina C.W. = estreptavidina inmovilizada en el pocillo

Complejo inmovilizado = complejo sándwich unido al pocillo

Tras lograr el equilibrio, la fracción de anticuerpo unido se separa del antígeno no unido mediante decantación o aspiración. La actividad de la enzima en la fracción de anticuerpo unido es directamente proporcional a la concentración de antígeno nativo. La actividad de la enzima presente en la superficie del pocillo se cuantifica mediante la reacción con un sustrato adecuado para producir color. Usando distintos calibradores de valores de antígeno conocidos se puede generar una curva dosis-respuesta con la que se puede determinar la concentración de antígeno de una muestra desconocida.

3. REACTIVOS, MATERIALES E INSTRUMENTOS

3.1 Reactivos y materiales incluidos en el kit

1. Calibradores (CAL) de fPSA (6 frascos, 1 mL cada uno)

CAL0	REF DCE002/6406-0
CAL1	REF DCE002/6407-0
CAL2	REF DCE002/6408-0
CAL3	REF DCE002/6409-0
CAL4	REF DCE002/6410-0
CAL5	REF DCE002/6411-0

2. Conjugado (1 frasco, 13 mL)

Anticuerpos anti fPSA conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) y anti fPSA biotinilado

REF DCE002/6402-0

3. Microplaca recubierta (1 microplaca rompible)

Microplaca recubierta con estreptavidina

REF DCE002/6403-0

4. Sustrato TMB (1 frasco, 15 mL)

H₂O₂-TMB 0,26 g/L (*evitar el contacto con la piel*)

REF DCE004-0

5. Solución de parada (1 frasco, 15 mL)

Ácido sulfúrico 0,15 mol/L (*evitar el contacto con la piel*)

REF DCE005-0

6. Solución de lavado conc. 50X (1 frasco, 20 mL)

Tampón fosfato 50 mM pH 7,4; Tween 20 1 g/L

REF DCE006-0

3.2 Reactivos necesarios no incluidos en el kit

Agua destilada

3.3 Material e instrumental auxiliar

Dispensadores automáticos

Lector de microplacas (450 nm).

Notas

Conservar todos los reactivos a una temperatura entre +2 y 8 °C en la oscuridad.

Abrir la bolsa de reactivo 3 (Microplaca Recubierta) solo cuando esté a temperatura ambiente y cerrar inmediatamente después del uso; una vez abierto, se mantiene estable hasta la fecha de caducidad indicada. No retirar las hojas adhesivas de las tiras no utilizadas.

4. ADVERTENCIAS

- Este kit de ensayo está previsto para usarse in vitro y por personal experto. No apto para uso interno o externo en humanos o animales.
- Usar los equipos de protección individual previstos al trabajar con los reactivos suministrados.
- Seguir las buenas prácticas de laboratorio para manipular los productos sanguíneos.
- Todos los reactivos de origen humano usados en la preparación de los Calibradores se han comprobado y han resultado negativos para la presencia de anticuerpos anti-VIH 1 y 2, para HbsAg y para anticuerpos anti-VHC. Sin embargo, ningún ensayo ofrece seguridad absoluta de la ausencia de VIH, VHB, VHC o de otros agentes infecciosos. Por lo tanto, los Calibradores deben manipularse como material potencialmente infeccioso.
- Algunos reactivos contienen pequeñas cantidades de Proclin 300^R como conservante. Evite el contacto con la piel y las mucosas.
- El cromógeno TMB contiene un irritante que puede ser dañino si se inhala, se ingiere o se absorbe a través de la piel. Para prevenir lesiones, evitar la inhalación, la ingestión o el contacto con la piel y con los ojos.
- La solución de parada está formada por una solución de ácido sulfúrico diluido. El ácido sulfúrico es venenoso y corrosivo, y puede ser tóxico si se ingiere. Para prevenir posibles quemaduras químicas, evitar el contacto con la piel y con los ojos.
- Evite la exposición de los reactivos TMB/H₂O₂ a la luz solar directa, metales u oxidantes. No congelar la solución.
- Este método permite la determinación de cortisol de 0,5 ng/mL hasta 10,0 ng/mL.

5. PRECAUCIONES

- Respetar rigurosamente la secuencia de los pasos indicados en este protocolo. Los resultados aquí presentados se han obtenido utilizando los reactivos específicos que figuran en estas instrucciones de uso.
- Todos los reactivos deben conservarse a una temperatura controlada de 2-8°C en sus recipientes originales. Todas las excepciones están claramente marcados. Los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad cuando se almacenan y manipulan de acuerdo con las instrucciones proporcionadas.
- Antes del uso, esperar hasta que todos los componentes del kit y las muestras se encuentren a temperatura ambiente (22-28°C) y mezclar cuidadosamente.
- No mezclar componentes de kits de lotes distintos. Se debe observar la fecha de caducidad indicada en la etiqueta de la caja y de todas las ampollas. No usar componentes después de la fecha de caducidad.

- Si utiliza un equipo automático, es responsabilidad del usuario asegurar que la metodología aplicada ha sido debidamente validada.
- Un lavado incompleto o impreciso y la aspiración insuficiente del líquido de los micropozos ELISA pueden causar una precisión pobre y/o un elevado fondo.
- Para la reproducibilidad de los resultados, es importante que el tiempo de reacción sea igual para cada pocillo. El tiempo de dispensación de los pocillos no debe superar los 10 minutos; si se prolongara más allá de los 10 minutos, respétese el orden de dispensación. si utiliza más de una placa, se recomienda repetir la curva de calibración en cada placa.
- Al añadir el sustrato TMB inicia una reacción cinética que termina al agregar la solución de interrupción. Tanto el sustrato como la solución de interrupción deben agregarse en la misma secuencia para evitar diferentes tiempos de reacción.
- Observar las directrices para la ejecución del control de calidad en los laboratorios clínicos al comprobar controles y/o pool de sueros.
- Observar la máxima precisión en la reconstitución y dispensación de los reactivos.
- No use muestras con contaminación microbiana, altamente lipémicas o hemolizadas.
- Los lectores de microplacas leen las DO verticalmente, por tanto no debe tocarse el fondo de los pocillos.
- Los datos de ejecución que se muestran aquí se han obtenido usando los reactivos específicos indicados en el folleto del envase.

6. PROCEDIMIENTO

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

Los Calibradores son listos para usar y tienen las siguientes concentraciones:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅
ng/mL	0	0,5	1,0	2,5	5,0	10,0

Estable hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta.

Una vez abiertos, los Calibradores permanecer estables durante seis meses a 2-8°C.

Nota: los calibradores, basados en suero humano, se han calibrado usando una preparación de referencia que se comprobó con el primer Calibración internacional IS 96/670.

6.2 Preparación de la solución de lavado

Antes del uso, diluir el contenido de cada ampolla de solución de lavado tamponada concentrada (50x) con agua destilada hasta un volumen de 1000 mL. Para preparar volúmenes menores, respetar la relación de dilución de 1:50. La solución de lavado diluida se mantiene estable a 2-8°C durante al menos 30 días.

6.3 Preparación de la muestras

- Las muestras pueden ser suero o plasma humano. Se deben observar las precauciones habituales en la obtención de muestras mediante venopunción.

- Se debe obtener una muestra de suero por la mañana en ayunas para la comparación precisa con los valores normales establecidos.
- Para obtener el suero, la sangre se debe recoger en un tubo de venopunción sin aditivos ni anticoagulantes. Dejar que la sangre se coagule. Centrifugar las muestras para separar el suero de las células.
- Las muestras pueden conservarse a una temperatura de 2-8°C durante un período máximo de 5 días. Si no se van a usar en este período, pueden conservarse a una temperatura de -20°C durante 30 días como máximo.
- No volver a congelar las muestras una vez descongeladas.
- Las muestras del paciente con una concentración de fPSA superior a 10,0 ng/mL deben diluirse (por ejemplo, 1:10 o superior) con suero femenino normal (fPSA = 0 ng/mL) y volver a analizarse. La concentración de la muestra se obtiene multiplicando el resultado por el factor de dilución.

6.4 Procedimiento

- **Esperar hasta que todos los reactivos se encuentren a temperatura ambiente (22-28°C).**
- Las tiras de pocillos no utilizados se deben guardar de inmediato en la bolsa desechable que contiene desecantes y almacenarse a 2-8°C.
- Para evitar la contaminación microbiana y/o química no regrese porciones de reactivos no usados en los viales originales.
- Para aumentar la precisión de los resultados de la prueba es necesario trabajar en duplicado: preparar dos pocillos para cada punto de la curva de calibración (C₀-C₅), dos para cada control, dos para cada muestra, uno para el blanco..

Reactivo	Calibrad.	Muestra	Blanco
Calibrador (C ₀ -C ₅)	50 µL		
Muestra		50 µL	
Conjugado	100 µL	100 µL	
Incubar a temperatura ambiente (22-28°C) durante 1 hora. Retirar la mezcla de reacción, lavar 3 veces añadiendo a cada pocillo 0,3 mL de solución de lavado diluida.			
TMB Substrato	100 µL	100 µL	100 µL
Agitar suavemente la placa. Leer la absorbancia (E) a 450 nm frente al blanco en un plazo de 5 minutos.			
Solución de parada	100 µL	100 µL	100 µL
Agitar la microplaca con cuidado. Leer la absorbancia (E) a 405 nm frente al blanco en un plazo de 5 minutos.			

7. RESULTADOS

7.1 Validez del ensayo

La DO del calibrador 5 debería ser ≥ 1.3 .

7.2 Control de calidad

Cada laboratorio debe analizar los controles a niveles de los rangos bajo, medio y alto de la curva dosis-respuesta para supervisar el rendimiento del ensayo. Estos controles deben tratarse como desconocidos y valores determinados en cada procedimiento de ensayo realizado. Se deben mantener los gráficos de control de calidad para seguir el rendimiento de los reactivos suministrados. Se deben emplear métodos estadísticos pertinentes para determinar las tendencias. Una desviación significativa del rendimiento establecido puede indicar un cambio inadvertido en las condiciones experimentales o la degradación de los reactivos del kit. Se deben usar reactivos frescos para determinar la causa de las variaciones.

7.3 Conversión de las DO

Las densidades ópticas (DO) de algunos calibradores y muestras pueden ser superiores a 2,0. En ese caso, podrían estar fuera del rango de medición del lector de microplacas. Por lo tanto, para DO superiores a 2,0 es necesario realizar una lectura a 405 nm (= longitud de onda de entrada pico) además de a 450 nm (longitud de onda pico) y a 620 nm (filtro de referencia para la disminución de interferencias debidas al plástico).

Cuando se utilizan lectores de microplaca no aptos para la lectura de placas a tres longitudes de onda simultáneamente, se aconseja realizar lo siguiente:

- Realizar una lectura de la microplaca a 450 nm y a 620 nm.
- Volver a realizar la lectura de la placa a 405 nm y a 620 nm.
- Identificar los pocillos cuyas DO a 450 nm sean superiores a 2,0.
- Seleccionar las DO correspondientes leídas a 405 nm y multiplicar estos valores a 405 nm por el factor de conversión 3,0 (donde $DO_{450}/DO_{405} = 3,0$), es decir: $DO_{450\text{ nm}} = DO_{405\text{ nm}} \times 3,0$.

Advertencia: El factor de conversión 3,0 es solo una sugerencia. Para mayor precisión, se recomienda calcular el factor de conversión específico del lector empleado.

7.4 Reducción de datos:

- método automatizado

Utilizar el modelo logístico de 4 parámetros (preferido) o el modelo spline cúbico suavizado como algoritmo de cálculo.

NOTA: si la reducción de datos controlada por ordenador se usa para calcular los resultados del ensayo, es imprescindible que los valores previstos para los calibradores se encuentren dentro del 10% de las concentraciones asignadas.

7.5 Reducción de datos:

- método manual

Se usa una curva dosis-respuesta para determinar la concentración de fPSA en muestras desconocidas.

- Registrar la DO obtenida en el informe impreso del lector de microplaca como se muestra en el Ejemplo 1.
- Trazar la DO de cada calibrador duplicado frente a la concentración de fPSA correspondiente en ng/mL en papel gráfico lineal.
- Dibujar la curva de ajuste óptimo mediante de los puntos trazados. Para determinar la concentración de fPSA de una muestra desconocida, localizar la absorbancia media de los duplicados para cada muestra desconocida en el eje vertical del gráfico, localizar el punto de intersección de la curva y leer la concentración (en ng/mL) en el eje horizontal del gráfico (se puede calcular el promedio de los duplicados de la muestra desconocida como se indica).

EJEMPLO 1				
Ident. muestra	N.º de pocillo	DO	DO media	Valor ng/mL
CAL 0	A1	0,019	0,019	0
	B1	0,021		
CAL 1	C1	0,118	0,120	0,5
	D1	0,121		
CAL 2	E1	0,211	0,214	1,0
	F1	0,217		
CAL 3	G1	0,703	0,701	2,5
	H1	0,699		
CAL 4	A2	1,617	2,338	5,0
	B2	1,661		
CAL 5	C2	2,393	2,338	10,0
	D2	2,282		
paciente	E2	0,395	0,393	1,67
	F2	0,392		

Los datos mostrados en el Ejemplo 1 son solo ilustrativos y no deben usarse en lugar de una curva dosis-respuesta preparada con cada ensayo.

8. INTERPRETACIÓN

- El fPSA es elevado en la hiperplasia prostática benigna (BPH). Clínicamente, un valor de fPSA elevado por sí solo no es de valor diagnóstico como prueba específica para el diagnóstico diferencial de BPH. La relación fPSA/tPSA es un marcador mejor y debe usarse junto con otras observaciones clínicas (tacto rectal) y procedimientos de diagnóstico (biopsia de próstata).
- Si el PSA total (tPSA) es de 4-10 ng/mL, la relación fPSA/tPSA resulta útil en el diagnóstico diferencial de BPH y cáncer de próstata. Dependiendo de la relación, la probabilidad se puede determinar del siguiente modo:

fPSA/tPSA Relación	Probabilidad de cáncer de próstata
0 - 10%	55%
10 - 15%	28%
15 - 20%	25%
> 20%	10%

9. RANGOS DE VALORES ESPERADOS

Valores esperados para el sistema de ensayo Elisa de PSA:

Hombres sanos: $\leq 1,3$ ng/mL

Es importante tener en cuenta que los rangos anteriores se han establecido basándose en estudios propios y en literatura de referencia. Se recomienda que cada laboratorio desarrolle sus propios criterios para realizar el diagnóstico y los use como guía. Antes de tomar una decisión crítica se deben considerar todos los datos clínicos relevantes y la historia clínica del paciente.

10. CARACTERÍSTICAS DEL RENDIMIENTO

10.1 Precisión

La precisión de intraensayo e interensayo del kit de fPSA se determinó mediante análisis en tres niveles distintos de suero de control. El número, el valor medio, la desviación estándar (SD) y el coeficiente de variación para cada uno de estos sueros de control se indican en la Tabla 2 y en la Tabla 3.

Muestra	N	Pro-medio	SD	C.V.
Nivel 1	20	0,43	0,04	9,3%
Nivel 2	20	2,57	0,20	7,8%
Nivel 3	20	8,20	0,73	8,9%

Muestra	N	Pro-medio	SD	C.V.
Nivel 1	10	0,52	0,04	11,3%
Nivel 2	10	2,34	0,22	5,8%
Nivel 3	10	7,70	0,68	5,2%

*Medidos en diez experimentos por duplicado

10.2 Comparación del método

El kit fPSA (Diametra) se ha comparado con un kit disponible en el mercado. Se han comprobado 167 muestras de suero.

La curva de regresión es:

$$\text{Diametra} = 0.9649 \cdot (\text{ensayo comercial}) + 0.0189$$

$$r^2 = 0,957$$

10.3 Sensibilidad

El kit de fPSA tiene una sensibilidad de 0,052 ng/mL de concentración de fPSA.

10.4 Especificidad

No se han detectado interferencias con la ejecución de Diametra PSA Elisa tras la adición de grandes cantidades de las siguientes sustancias a un pool de suero humano.

Compuesto	Concentración añadida
AFP	10 µg/mL
Atropina	100 µg/mL
Ácido acetil salicílico	100 µg/mL
Ácido ascórbico	100 µg/mL
Cafeína	100 µg/mL
Dexametasona	10 µg/mL
Flutamida	100 µg/mL
hCG	100 UI/mL
hLH	100 UI/mL
Metotrexato	100 µg/mL
Prolactina	100 µg/mL
TSH	100 mUI/mL

11. DISPOSICIONES PARA LA ELIMINACIÓN

Los reactivos deben eliminarse de acuerdo con las leyes locales.

BIBLIOGRAFÍA













- Christensson A, Laurell CB, Lilja H., *Eur J Biochem*, 194, 755- 63 (1990).
- Watt KW, et. al., *Proc Nat Acad Sci USA*, 83, 3166-70 (1986).
- Chen Z, Prestigiacomo A, Stamey T., *Clin Chem*, 41, 1273-82 (1995).
- Wild D, *The Immunoassay Handbook*, Stockton Press (1994) p452.
- Junker R, Brandt B, Zechel C, Assmann G, *Clin Chem*, 43, 1588- 94 (1997).
- Prestigiacomo AF, Stamey TA, ' *Physiological variations of serum prostate antigen in the (4-10 ng/mL) range in male volunteers.*' *J. Urol* 1996;155:1977-80.
- Stamey TA, McNeal JE, Yemoto CM, Sigal BM, Johnstone IM, ' *Biological determinants of cancer progression in men with prostate cancer.*' *JAMA* 1999;281:1395-1400.
- Chen Z, Prestigiacomo A, Stamey T, ' *Purification and characterization of Prostate Specific Antigen (PSA) Complexed to a1- Anticymotrypsin: Potential reference Material for International Standardization of PSA Immunoassays.*' *Clin Chem*. 1995;41/9:1273-1282.
- Horton GL, Bahnson RR, Datt M, Cphan KM, Catalona WJ and Landenson JH. ' *Differences in values obtained with two assays of Prostate Specific Antigen.*' *J. Urol*. 1988;139:762-72.
- Stenman UH, Leinonen J, Alfthan H, Rannikko S, Tuhkanen Kand Alfthan O. ' *A complex between prostate specific antigen and a1-anticymotrypsin is the major form of prostate specific antigen in serum of patients with prostate cancer: assay of complex improves clinical sensitivity for cancer.*' *Cancer Res*. 1991;51:222-26.

Ed. 03/2012

DCM064-5

DiaMetra S.r.l. Headquater: Via Garibaldi, 18 –
20090 SEGRATE (MI) Italy
Tel. 0039-02-2139184 – 02-26921595
Fax 0039-02-2133354.

Manufact: Via Pozzuolo 14, 06038 SPELLO (PG)
Italy
Tel. 0039-0742-24864
Fax 0039-0742-316197
E-mail: info@diametra.com

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

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

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