



DCM057-6
Ed. 01/2015

tPSA

Determinazione immunoenzimatica diretta dell'Antigene Prostatico Specifico Totale (tPSA) in siero e plasma umano

RUO



LOT

Vedere l'etichetta esterna

2°C 8°C



$\Sigma = 96$ tests

REF

DKO057

DESTINAZIONE D'USO

Il kit tPSA Diametra è un saggio immunoenzimatico diretto in fase solida per la determinazione quantitativa dell'Antigene Prostatico Specifico Totale (tPSA) nel siero e plasma umano.

Il kit tPSA è destinato al solo uso di laboratorio.

1. SOMMARIO

L'antigene prostatico specifico (PSA) è una serina-proteasi con attività simile alla chimotripsina (1,2). Questa proteina è una glicoproteina a singola catena con un peso molecolare di 28,4 kDa (3). Il nome PSA deriva dalla constatazione che si tratta di uno specifico antigene della prostata e non si trova in altri tessuti.

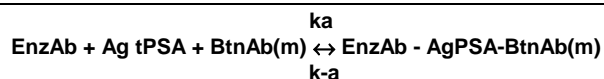
Il PSA viene rilevato nel cancro alla prostata, sia benigno, maligno e in metastasi. Poiché il cancro della prostata è la seconda forma più diffusa di tumore maschile, l'individuazione di elevati livelli di PSA ha un ruolo importante nella diagnosi precoce. Grazie ad una maggiore sensibilità, nella diagnosi della patologia e nella gestione dei pazienti i livelli sierici di PSA sono stati giudicati più utili di quelli della fosfatasi acida prostatica (PAP) (4).

2. PRINCIPIO DEL TEST

Immunoenzymometric assay

In questo metodo, il calibratore della PSA e il campione del paziente (contenente il PSA nativo) vengono inizialmente aggiunti alla streptavidina adsorbita sulla micropiastra. Successivamente vengono aggiunti un anticorpo biotinilato monoclonale ed un anticorpo marcato con enzima HRP (perossidasi di rafano) (gli anticorpi sono diretti contro epitopi distinti e diversi di PSA). La reazione tra i vari anticorpi anti-PSA e il PSA nativo del campione, che avviene senza competizione e ingombri sterici, dà luogo all'interno dei pozzetti della micropiastra ad un complesso-sandwich solubile.

La reazione è illustrata dalla seguente equazione:



BtnAb(m) = anticorpo monoclonale biotinilato (quantità in eccesso)

AgtPSA = antigene nativo (quantità variabile)

EnzAb = anticorpo legato all'enzima HRP (quantità in eccesso)

EnzAb -AgtPSA-BtnAb(m) = complesso sandwich antigene-anticorpi

ka = costante di associazione

k-a = costante di dissociazione

Contemporaneamente il complesso-sandwich si deposita sul fondo dei pozzetti grazie alla reazione ad alta affinità tra la streptavidina adsorbita sui pozzetti e l'anticorpo biotinilato.

Questa interazione è illustrata sotto:

EnzAb -AgtPSA-BtnAb(m) + StreptavidinC.W. \Rightarrow Immobilized complex

StreptavidinC.W. = streptavidina immobilizzata nel pozzetto

Immobilized complex = complesso-sandwich legato al pozzetto

Dopo un periodo di incubazione, il sandwich anticorpi-PSA nativa-enzima è separato dal coniugato non legato con un lavaggio. L'attività dell'enzima che si è legato ai pozzetti è direttamente proporzionale alla concentrazione di antigene nativo ed è quantificata mediante la reazione con un substrato che produce una colorazione.

L'impiego di calibratori a concentrazioni note di PSA permette la costruzione di una curva dose-risposta da cui ricavare la concentrazione ignota di PSA nel campione.

3. REATTIVI, MATERIALE E STRUMENTAZIONE

3.1. Reagenti e materiali forniti nel kit

1. Calibrators (6 flaconi, 1 mL ciascuno)

CAL0	REF DCE002/5706-0
CAL1	REF DCE002/5707-0
CAL2	REF DCE002/5708-0
CAL3	REF DCE002/5709-0
CAL4	REF DCE002/5710-0
CAL5	REF DCE002/5711-0

2. Conjugate (1 flacone, 13 mL)

Anticorpo anti PSA coniugato con perossidasi di rafano (HRP) e Anticorpo anti PSA biotinilato

REF DCE002/5702-0

3. Coated Microplate (1 microplate breakable)

Microplate coated with streptavidin

REF DCE002/5703-0

4. TMB Substrate (1 flacone, 15 mL)

H₂O₂-TMB 0.26 g/L (*avoid any skin contact*)

REF DCE004-0

5. Stop Solution (1 flacone, 15 mL)

Sulphuric acid 0.15 mol/L (*avoid any skin contact*)

REF DCE005-0

6. 50X Conc. Wash Solution (1 flacone, 20 mL)

NaCl 45 g/L; Tween-20 55 g/L

REF DCE006-0

3.2. Reattivi necessari non forniti nel kit

Acqua distillata.

3.3. Materiale e strumentazione ausiliare

Dispensatori automatici.

Lettoce per micropiastre (450 nm, 620-630 nm).

Note

Conservare 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 a 2-8°C fino alla data di scadenza del kit. Non staccare la sheet adesiva dalle strips inutilizzate.

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 ed 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 la determinazione di tPSA da 5,0 ng/mL a 100 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 migliorare le prestazioni del kit su strumentazione automatica, si consiglia di aumentare il numero di lavaggi.
- 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 dei Calibratori

I Calibratori sono pronti all'uso, sono calibrati contro il 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	5	10	25	50	100

Una volta aperti, i Calibratori sono stabili 6 mesi a 2-8°C.

6.2. Preparazione della Wash Solution

Prima dell'uso, diluire il contenuto di ogni fiala di "50X Conc. Wash Solution" 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 umano; osservare le consuete precauzioni nella raccolta dei campioni derivati da sangue.

Per un adeguato riscontro nello stabilire valori normali, utilizzare campioni di siero ottenuti la mattina a digiuno.

Per ottenere il siero, il sangue deve essere raccolto in una provetta 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. Se il campione non può essere testato entro questo tempo, il campione può essere conservato a -20°C fino a 30 giorni. Evitare ripetuti congelamenti e scongelamenti.

Se testati in duplicato, sono necessari 0.050 mL di campione.

I campioni di pazienti con concentrazioni di tPSA superiori a 100 ng/mL possono essere diluiti (ad esempio 1:10 o superiore) con normale siero femminile (tPSA <5 ng/mL) e rianalizzati; la concentrazione del campione è ottenuto moltiplicando il risultato per il fattore di diluizione.

6.4. Procedimento

- **Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (22-28°C) per almeno 30 minuti.** Al termine del dosaggio riporre immediatamente tutti i reagenti a 2-8°C: evitare lunghi periodi a temperatura ambiente.
- 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	25 µL		
Campione		25 µL	
Coniugato	100 µL	100 µL	
Incubare a temperatura ambiente (22-28°C) per 30 minuti. Rimuovere il contenuto dai pozzetti; lavare i pozzetti per 3 volte con 300 µL di Wash Solution diluita. Nota importante: ad ogni step di lavaggio, agitare delicatamente la piastra per 5 secondi e successivamente rimuovere l'eccesso di soluzione di lavaggio sbattendo delicatamente la micropiastre capovolta su fogli di carta assorbente. Lavaggi automatici: se si utilizza strumentazione automatica effettuare almeno 5 lavaggi.			
TMB Substrate	100 µL	100 µL	100 µL
Incubare a temperatura ambiente (22-28°C) per 15 minuti al riparo dalla luce.			
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL
Agitare delicatamente la micropiastre. Leggere l'assorbanza (E) a 450 nm contro una lunghezza d'onda di riferimento di 620-630 nm oppure contro il Bianco entro 5 minuti.			

7. CONTROLLO 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.

8. RISULTATI

8.1. Note

Le densità ottiche (OD) 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 lettori non in grado di leggere a 3 lunghezze d'onda contemporaneamente, si raccomanda di procedere come segue:

- leggere la micropiastro a 450 nm e a 620 nm.
- leggere di nuovo la micropiastro 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 un fattore di conversione 3,0 (dove $OD\ 450/OD\ 405 = 3,0$), cioè: $OD\ 450\ nm = OD\ 405\ nm \times 3,0$

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

8.2. 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.

8.3. Elaborazione dei Dati - Metodo Manuale

Una curva dose-risposta viene utilizzata per determinare le concentrazioni di tPSA in campioni incogniti.

- Registrare le OD ottenute dalla stampa del lettore di micropiastre come illustrato 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 tPSA in ng/mL.
- Tracciare la miglior curva che passa per i punti.
- Per determinare la concentrazione di tPSA 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.

EXAMPLE 1				
ID Campione	Numero pozzetto	OD	OD Media	Valore ng/mL
CAL 0	A1	0.019	0.019	0
	B1	0.019		
CAL 1	C1	0.279	0.276	5
	D1	0.273		
CAL 2	E1	0.563	0.561	10
	F1	0.559		
CAL 3	G1	1.248	1.213	25
	H1	1.179		
CAL 4	A2	2.051	1.999	50
	B2	1.947		
CAL 5	C2	2.892	2.833	100
	D2	2.775		
paziente	E2	1.186	1.142	23.6
	F2	1.089		

I dati presentati nell'Esempio 1 sono solo esemplificativi e non devono essere usati in sostituzione di una curva dose-risposta preparata in ogni prova.

9. VALORI DI RIFERIMENTO

Maschi sani hanno valori di tPSA inferiori a 4 ng/mL (4).

È importante tenere a mente che l'istituzione di un intervallo di valori attesi in un determinato metodo per una popolazione "normale" dipende da una molteplicità di fattori: la specificità del metodo, la popolazione testata e la precisione del metodo nelle mani dell'analista. Per queste ragioni ogni laboratorio dovrebbe dipendere dall'intervallo di valori attesi stabilito dal costruttore solo fino a quando gli analisti non abbiano determinato un proprio range interno, utilizzando il metodo con una popolazione indigena della zona in cui si trova il laboratorio.

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 serici normale e patologico di tPSA.

10. INTERPRETAZIONE DEL SAGGIO

Il PSA è elevato nella ipertrofia prostatica benigna (BPH). **Clinicamente un valore elevato di PSA da solo non rappresenta un valore diagnostico come test specifico per il cancro** e deve essere usato solo in combinazione con altre manifestazioni cliniche e procedure diagnostiche (biopsia della prostata). Determinazioni di PSA libero possono essere utili per quanto riguarda la discriminazione di BPH e condizioni di cancro alla prostata (5).

11. PARAMETRI CARATTERISTICI

11.1. Precisione

L'intra e inter assay del kit tPSA sono stati determinati con l'analisi di tre differenti livelli di sieri di controllo. Il numero, il valore medio, la deviazione standard (SD) e il coefficiente di variazione per ciascuno di questi sieri di controllo sono presentati nelle tabelle 1 e 2.

Campione	N	Media	SD	C.V.
Level 1	20	0.7	0.05	7.1%
Level 2	20	4.5	0.20	4.4%
Level 3	20	28.3	1.07	3.7%

Campione	N	Media	SD	C.V.
Level 1	10	0.8	0.09	11.3%
Level 2	10	4.3	0.25	5.8%
Level 3	10	27.5	1.42	5.2%

11.2. Correlazione

Il kit tPSA è stato confrontato con un metodo di riferimento Elisa. Sono stati dosati campioni biologici con concentrazioni normali ed elevate. Il numero totale di tali campioni è stato 241. L'equazione dei minimi quadrati e il coefficiente di correlazione sono stati calcolati per il kit tPSA in confronto con il metodo di riferimento. I dati ottenuti sono mostrati nella Tabella 3.

Metodo	Media	Least Square Regression Analysis	Coefficiente correlazione
ELISA tPSA kit	5.62	$y = -0.0598 + 0.98(x)$	0.987
Metodo di Riferimento	5.57		

11.3. Sensibilità

Il kit tPSA ha una sensibilità di 0.012 ng. Questo è equivalente ad un campione avente una concentrazione di tPSA di 0.5 ng/mL.

11.4. Specificità

Nessuna interferenza è stata rilevata circa le prestazioni di tPSA Elisa dopo l'aggiunta di massicce quantità delle seguenti sostanze a un pool di siero umano.

Sostanza	Concentrazione
Acetylsalicylic Acid	100 µg/mL
Ascorbic Acid	100 µg/mL
Caffeine	100 µg/mL
CEA	10 µg/mL
AFP	10 µg/mL
CA-125	10000 U/mL
hCG	1000 IU/mL
hLH	10 IU/mL
hTSH	100 mIU/mL
hPRL	100 µg/mL

12. 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) p. 452.
- 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 K, 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. 01/2015

DCM057-6

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



DCM057-6
Ed. 01/2015

tPSA

Direct immunoenzymatic determination of Total Prostatic Specific Antigen (tPSA) in human serum or plasma

RUO



LOT

See external label

2°C 8°C



Σ = 96 tests

REF DKO057

INTENDED USE

Diametra tPSA kit is a direct solid phase enzyme immunoassay for quantitative determination of Total Prostatic Specific Antigen (tPSA) in human serum or plasma.

tPSA is intended for laboratory use only.

1. SUMMARY

Prostate Specific Antigen (PSA) is a serine protease with chymotrypsin-like activity (1,2). The protein is a single chain glycoprotein with a molecular weight of 28.4 kDa (3). The name PSA derives from the observation that PSA is a specific antigen of the prostate and it is not found in other tissues.

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 are more useful than prostatic acid phosphatase (PAP) in the diagnosis and management of patients (4).

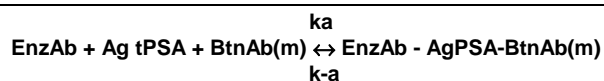
2. PRINCIPLE OF THE TEST

Immunoenzymometric assay

In this method, PSA calibrators and patient specimen (containing the native PSA antigen) are first added to streptavidin coated wells. Also the biotinylated monoclonal antibody and the enzyme HRP (horseradish peroxidase) labeled antibody are then added (these antibodies are directed against distinct and different epitopes of PSA).

Reaction between the various PSA antibodies and the native PSA of the sample 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)

Ag tPSA = native antigen (variable quantity)

EnzAb = enzyme labeled antibody (excess quantity)

EnzAb -Ag tPSA-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:

EnzAb -Ag tPSA-BtnAb(m) + StreptavidinC.W.
⇒ **Immobilized complex**

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

After the incubation period, the sandwich native PSA-antibody-enzyme is separated from unbound conjugate by decantation or aspiration. The enzyme activity in the bound sandwich fraction is directly proportional to the native antigen concentration. The activity of the enzyme present on the surface of the well is quantified by reaction with a suitable substrate to produce color. By utilizing several different calibrators of known PSA values, a dose response curve can be generated from which the unknown PSA concentration in the sample can be ascertained.

3. REAGENTS, MATERIALS AND INSTRUMENTATION

3.1. Reagenti e materiali forniti nel kit

1. Calibrators (6 vials, 1 mL each)

CAL0	REF DCE002/5706-0
CAL1	REF DCE002/5707-0
CAL2	REF DCE002/5708-0
CAL3	REF DCE002/5709-0
CAL4	REF DCE002/5710-0
CAL5	REF DCE002/5711-0

2. Conjugate (1 vial, 13 mL)

Antibody anti PSA conjugated with horseradish peroxidase (HRP) and Antibody anti PSA biotinylated
REF DCE002/5702-0

3. Coated Microplate (1 breakable microplate)

Microplate coated with streptavidin
REF DCE002/5703-0

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)

NaCl 45 g/L; Tween-20 55 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, 620-630 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 at 2-8°C until the expiry date of the kit.

Do not remove the adhesive sheets on the strips inutilized.

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 tPSA from 5.0 ng/mL to 100 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. To improve the performance of the kit on automatic systems is recommended to increase the number of washes.
- 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 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

The Calibrators are ready to use, are calibrated against the 1st IS 96/670, and have the following concentrations:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅
ng/mL	0	5	10	25	50	100

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

6.2. Preparation of Wash Solution

Dilute the contents of each vial of the "50X Conc. Wash Solution" with distilled water to a final volume of 1000 mL prior to use. For smaller volumes respect the 1:50 dilution ratio. The diluted wash solution is stable for 30 days at 2-8°C.

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 the serum from the cells.

Samples may be refrigerated at 2-8°C for a maximum period of 5 days. If the specimens cannot be assayed within this time, they may be stored at -20°C for up to 30 days. Avoid repetitive freezing and thawing.

When assayed in duplicate, 0,050 mL of the specimen is required.

Patient specimens with tPSA concentrations above 100 ng/mL may be diluted (for example 1:10 or higher) with normal female serum (tPSA < 5 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) for at least 30 minutes.** At the end of the assay, store immediately the reagents at 2-8°C: avoid long exposure to room temperature.
- 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.

Reagents	Calibrator	Campione	Blank
Calibrator C ₀ -C ₅	25 µL		
Sample		25 µL	
Conjugate	100 µL	100 µL	
Incubate at room temperature (22-28°C) for 30 minutes. Remove the content from each well; wash the wells 3 times with 300 µL of diluted Wash Solution. Important note: during each washing step, gently shake the plate for 5 seconds and remove excess solution by tapping the inverted plate on an absorbent paper towel. Automatic washer: if you use automated equipment, wash the wells at least 5 times.			
TMB Substrate	100 µL	100 µL	100 µL
Incubate at room temperature (22-28°C) for 15 minutes in the dark.			
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL
Shake the microplate gently. Read the absorbance (E) at 450 nm against a reference wavelength of 620-630 nm or against Blank within 5 minutes.			

7. 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.

8. RESULTS

8.1. Note

The optical densities (OD) of some calibrators and samples may be higher than 2.0, and, in such a case, they could be out of the measurement range of the microplate reader. It is therefore necessary, for OD 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 OD at 450 nm are higher than 2.0
- select the corresponding OD read at 405 nm and multiply these values at 405 nm by the conversion factor 3.0 (where $OD_{450nm} / OD_{405nm} = 3.0$), that is: $OD_{450nm} = OD_{405nm} \times 3.0$.

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.

8.2. Data Processing - 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.

8.3. Data Processing - Manual Method

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

- Record the OD obtained from the printout of the microplate reader as outlined in Example 1.
- Draw on a linear graph paper a dose response curve (DRC) using the mean OD for each duplicate calibrator versus the corresponding tPSA concentration in ng/mL.
- Draw the best-fit curve through the plotted points.
- To determine the concentration of tPSA 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) in the horizontal axis of the graph.

EXAMPLE 1				
Sample ID	Well number	OD	Mean OD	Value ng/mL
CAL 0	A1	0.019	0.019	0
	B1	0.019		
CAL 1	C1	0.279	0.276	5
	D1	0.273		
CAL 2	E1	0.563	0.561	10
	F1	0.559		
CAL 3	G1	1.248	1.213	25
	H1	1.179		
CAL 4	A2	2.051	1.999	50
	B2	1.947		
CAL 5	C2	2.892	2.833	100
	D2	2.775		
patient	E2	1.186	1.142	23.6
	F2	1.089		

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.

9. REFERENCE VALUES

Healthy males are expected to have values below 4 ng/mL (4).

It is important to keep in mind that establishment of a values range which can be expected to found by a given method for a population of "normal"-persons is dependent upon a multiplicity of factors: the specificity of the method, the population tested and the precision of the method in the hands of the analyst. For these reasons each laboratory should depend upon the range of expected values established by the Manufacturer only until an in-house range can be determined by the analysts using the method with a population indigenous to the area in which the laboratory is located.

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 tPSA.

10. INTERPRETATION OF THE ASSAY

PSA is elevated in benign prostrate hypertrophy (BPH). **Clinically an elevated PSA value alone is not of diagnostic value as a specific test for cancer** and should only be used in conjunction with other clinical manifestations and diagnostic procedures (prostate biopsy). Free PSA determinations may be helpful in regard to the discrimination of BPH and prostrate cancer conditions (5).

11. PERFORMANCE AND CHARACTERISTICS

11.1. Precision

The within and between assay precision of the tPSA kit were determined by analysis on three different levels of control sera. The number, mean value, standard deviation (SD) and coefficient of variation for each of these control sera are presented in Table 1 and Table 2.

TABLE 1				
Within Assay Precision (Values in ng/mL)				
Sample	N	Mean	SD	C.V.
Level 1	20	0.7	0.05	7.1%
Level 2	20	4.5	0.20	4.4%
Level 3	20	28.3	1.07	3.7%

TABLE 2				
Between Assay Precision (Values in ng/mL)				
Sample	N	Mean	SD	C.V.
Level 1	10	0.8	0.09	11.3%
Level 2	10	4.3	0.25	5.8%
Level 3	10	27.5	1.42	5.2%

11.2. Correlation

The tPSA kit was compared to a reference Elisa method. Biological specimens with normal and elevated concentrations were assayed. The total number of such specimens was 241. The least square regression equation and the correlation

coefficient were computed for the tPSA kit in comparison with the reference method. The data obtained is displayed in Table 3.

Method	Mean	Least Square Regression Analysis	Correlation Coefficient
EIAgen tPSA kit	5.62	$y = -0.0598 + 0.98(x)$	0.987
Reference method	5.57		

11.3. Sensitivity

The tPSA kit has a sensitivity of 0.012 ng. This is equivalent to a sample containing 0.5 ng/mL tPSA concentration.

11.4. Specificity

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

Substance	Concentration
Acetylsalicylic Acid	100 µg/mL
Ascorbic Acid	100 µg/mL
Caffeine	100 µg/mL
CEA	10 µg/mL
AFP	10 µg/mL
CA-125	10000 U/mL
hCG	1000 IU/mL
hLH	10 IU/mL
hTSH	100 mIU/mL
hPRL	100 µg/mL

12. 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) p. 452.
- 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. 01/2015

DCM057-6

DiaMetra S.r.l. Headquarter: 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



DCM057-6
Ed. 01/2015

tPSA

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

RUO



LOT

Ver etiqueta externa

2°C 8°C



$\Sigma = 96$ ensayos

REF

DKO057

USO PREVISTO

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

El kit tPSA está destinado al uso en laboratorio exclusivamente.

1. USO PREVISTO

El antígeno prostático específico (PSA) es una serina proteasa con actividad similar a la quimotripsina (1,2). La proteína es una glicoproteína de cadena sencilla con un peso molecular de 28,4 kDa (3). 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 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 (4).

Con este método, el calibrador de PSA, la muestra del paciente o el control se añade primero a un pocillo recubierto con estreptavidina. Se añaden anticuerpos monoclonales biotinilados y marcados con una enzima (dirigidos contra distintos epítopes de PSA) y se mezclan los reactivos. La reacción entre los distintos anticuerpos de PSA y el PSA nativo forma un complejo sándwich que se une a la estreptavidina que recubre el pocillo.

Tras el período de incubación requerido, el conjugado enzima-anticuerpo PSA unido se separa del conjugado enzima-PSA no unido mediante aspiración o decantación. La actividad de la enzima presente en la superficie del pocillo se cuantifica mediante la reacción con un sustrato adecuado para producir color.

El empleo de distintas referencias de suero de niveles conocidos de antígeno prostático específico (PSA) permite la construcción de una curva dosis-respuesta de actividad y concentración. De la comparación con la curva dosis-respuesta se puede correlacionar la actividad de una muestra desconocida con la concentración de PSA.

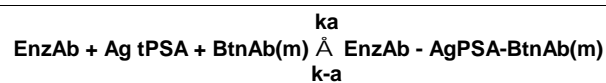
2. PRINCIPIO DEL ENSAYO

Ensayo inmunoenzimométrico:

Con este método, los calibradores, las muestras del paciente y/o los controles (que contienen el antígeno de tPSA 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 tPSA.

La reacción entre los distintos anticuerpos de tPSA y el tPSA 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)

AgtPSA = antígeno nativo (cantidad variable)

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

EnzAb -AgtPSA-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:

EnzAb -AgtPSA-BtnAb(m) + Estreptavidina C.W.
⇒ **Complejo inmovilizado**

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. REACTIVO, MATERIAL E INSTRUMENTACIÓN

3.1. Reactivos y materiales suministrados en el kit

1. Calibradores (6 frascos, 1 mL cada uno)

CAL0	REF	DCE002/5706-0
CAL1	REF	DCE002/5707-0
CAL2	REF	DCE002/5708-0
CAL3	REF	DCE002/5709-0
CAL4	REF	DCE002/5710-0
CAL5	REF	DCE002/5711-0

2. Conjugado (1 frasco, 13 mL)

Anticuerpo anti PSA conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) y Anticuerpo anti PSA biotinilado

REF DCE002/5702-0

3. Microplaca recubierta (1 microplaca rompible)

Microplaca recubierta con estreptavidina

REF DCE002/5703-0

4. Sustrato TMB (1 frasco, 15 mL)

H₂O₂-TMB 0,25 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)

NaCl 45 g/L; Tween-20 55 g/L

REF DCE006-0

3.2. Reactivos necesarios no suministrados en el kit

Agua destilada.

3.3. Material e instrumentación auxiliares

Dispensadores automáticos.

Lector de microplacas (450 nm, 620-630 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 abierta, permanece estable hasta la fecha de caducidad del kit.

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 es para uso interno o externo en humanos o animales.
- Usar los equipos de protección individual previstos al trabajar con los reactivos suministrados.
- Siga las Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP) en el manejo de las muestras sanguíneas y sus derivados.
- Todos los reactivos de origen humano usados en la preparación de los reactivos se han comprobado y han resultado negativos para la presencia de anticuerpos anti-VIH, 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 tPSA de 5,0 a 100 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 marcadas. 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 haya 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 mejorar el rendimiento del kit en los sistemas automatizados, se recomienda aumentar el número de lavados.
- 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 se inicia una reacción cinética que termina al agregar la Solución de Parada. Tanto el Sustrato TMB como la Solución de Parada 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.

6. PROCEDIMIENTO

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

Los Calibradores son listo para usar, se han calibrado usando una preparación de referencia que se comprobó con el primer estándar internacional (IS) 96/670 y tienen la siguiente concentración:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅
ng/mL	0	5	10	25	50	100

Una vez abiertos, los Calibradores permanecen estables durante 6 meses a 2-8°C.

6.2. Preparación de la solución de lavado

Antes del uso, diluir el contenido de cada ampolla de "Solución de lavado conc. 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 muestra

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.

Si el ensayo se realiza por duplicado, se requieren 0,050 mL de la muestra.

Las muestras del paciente con una concentración de tPSA superior a 100 ng/mL deben diluirse (por ejemplo, 1:10 o superior) con suero femenino normal (tPSA < 5 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) durante al menos 30 minutos.** Al final del ensayo inmediatamente poner todos los reactivos a 2-8°C para evitar largos periodos a temperatura ambiente.
- 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	Calibrador	Muestra	Blanco
Muestra		25 µL	
Calibrador (C ₀ -C ₅)	25 µL		
Conjugado	100 µL	100 µL	
<p>Incubar a temperatura ambiente (22-28°C) durante 30 minutos.</p> <p>Retirar el contenido de cada pocillo y lavar los pocillos 3 veces con 300 µL de solución de lavado diluida.</p> <p>Nota importante: agite suavemente la placa durante 5 segundos en cada paso del lavado. Después del último lavado asegúrese haber eliminado completamente la solución de lavado de los pozos, invierta la placa y golpéela repetidas veces contra una servilleta de papel absorbente.</p> <p>Lavados automático: si está utilizando una lavadora automática, lavar los pocillos al menos 5 veces.</p>			
Substrato	100 µL	100 µL	100 µL
<p>Incubar a temperatura ambiente (22-28°C) durante 15 minutos en la oscuridad.</p>			
Solución de parada	100 µL	100 µL	100 µL

Agitar suavemente la placa.
 Leer la absorbancia (E) a 450 nm frente una segunda lectura de referencia a 620-630 nm o frente al blanco dentro de los 5 minutos.

7. 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.

8. RESULTADOS

8.1. Notas

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 (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.

8.2. 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.

8.3. Reducción de Datos - Método Manual

Se usa una curva dosis-respuesta para determinar la concentración de tPSA 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 tPSA correspondiente en ng/mL en papel gráfico lineal (no calcular el promedio de los duplicados de los calibradores antes del trazado).
- Dibujar la curva de ajuste óptimo mediante de los puntos trazados.
- Para determinar la concentración de tPSA 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	0,019		
CAL 1	C1	0,279	0,276	5
	D1	0,273		
CAL 2	E1	0,563	0,561	10
	F1	0,559		
CAL 3	G1	1,248	1,213	25
	H1	1,179		
CAL 4	A2	2,051	1,999	50
	B2	1,947		
CAL 5	C2	2,892	2,833	100
	D2	2,775		
paciente	E2	1,186	1,142	23,6
	F2	1,089		

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.

9. VALORES DE REFERENCIA

Se espera que los hombres sanos tengan valores por debajo de 4 ng/mL (4).

Hombres sanos <4 ng/mL

Es importante tener en cuenta que el establecimiento de un rango de valores esperados con un método dado para una población de personas "normales" depende de numerosos factores: la especificidad del método, la población examinada y la precisión del método en manos del analista. Por estos motivos, cada laboratorio solo deberá usar el rango de valores esperados establecido por el fabricante hasta que los analistas puedan determinar un rango propio usando el método con una población autóctona de la zona en la que se encuentre el laboratorio.

Los resultados positivos deben verificarse con relación al estado clínico del paciente. Además, cada decisión relativa a la terapia debe tomarse individualmente. Se recomienda que cada laboratorio

establezca sus propios intervalos normal y patológico de tPSA séricos.

10. INTERPRETACIÓN DEL ENSAYO

El PSA es elevado en la hipertrofia prostática benigna (BPH). **Clínicamente, un valor de PSA elevado por sí solo no es de valor diagnóstico como prueba específica del cáncer** y solo debe usarse junto con otras manifestaciones clínicas (observaciones) y procedimientos de diagnóstico (biopsia de próstata). Las determinaciones del PSA libre pueden ser útiles en lo que respecta a la discriminación de las condiciones de BPH y cáncer de próstata (5).

11. PARÁMETROS CARACTERÍSTICOS

11.1. Precisión

La precisión de intraensayo e interensayo del kit tPSA 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 1 y en la Tabla 2.

Muestra	N	PRO-MEDIO	SD	C.V.
Nivel 1	20	0,7	0,05	7,1%
Nivel 2	20	4,5	0,20	4,4%
Nivel 3	20	28,3	1,07	3,7%

Muestra	N	PRO-MEDIO	SD	C.V.
Nivel 1	10	0,8	0,09	11,3%
Nivel 2	10	4,3	0,25	5,8%
Nivel 3	10	27,5	1,42	5,2%

11.2. Comparación del Método

El kit tPSA se comparó con un método Elisa de referencia. Se analizaron muestras biológicas de concentraciones normales y elevadas. El número total de muestras fue 241. La ecuación de regresión por mínimos cuadrados y el coeficiente de correlación se calcularon para el kit tPSA en comparación con el método de referencia. Los datos obtenidos aparecen en la Tabla 3.

Método	Pro-medio	Análisis de regresión mínimos cuadrados	de por	Coefficiente de correlación
Kit tPSA EIAgen	5,62	$y = -0,0598 + 0,98(X)$		0,987
Método de referencia	5,57			

11.3. Sensibilidad

El kit tPSA tiene una sensibilidad de 0,012 ng. Es equivalente a una muestra con una concentración de tPSA de 0,5 ng/mL.

11.4. Especificidad:

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

Sostanza	Concentrazione
Acetylsalicylic Acid	100 µg/mL
Ascorbic Acid	100 µg/mL
Caffeine	100 µg/mL
CEA	10 µg/mL
AFP	10 µg/mL
CA-125	10000 U/mL
hCG	1000 IU/mL
hLH	10 IU/mL
hTSH	100 mIU/mL
hPRL	100 µg/mL

12. 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) p. 452.
- 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, 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. 01/2015

DCM057-6

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

	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 Establa 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	LOT	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	CONT	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 Límitación de temperatura Limites de température de conservation Temperature limitation Limiti di temperatura Temperaturas limites de conservação	REF	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			

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