

Total PSA

per analisi di routine

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

IVD



LOT

Vedere etichetta esterna

2°C  8°C

Σ = 96 test

REF DKO137

DESTINAZIONE D'USO

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

1. SIGNIFICATO CLINICO

Il PSA è una serin-proteasi con attività chimotripsina-simile, la cui funzione primaria è la liquefazione dei coaguli seminali. La produzione di PSA è regolata dagli androgeni e avviene quasi esclusivamente nelle cellule epiteliali prostatiche¹. Il PSA è presente nel sistema circolatorio in diverse forme, che possono essere classificate in 2 gruppi generali: PSA complessato (coniugato agli inibitori delle proteasi sieriche) e PSA libero (non coniugato e inattivo)². La forma predominante di PSA è quella legata all'inibitore delle proteasi sieriche alfa1-antichimotripsina ed è pari al 65-95% dei livelli circolanti²; il restante 5-35% del PSA in circolazione è costituito da PSA libero e PSA complessato con alfa-2 macroglobulina.

Il PSA è prodotto da cellule della ghiandola prostatica sia normali che maligne; un aumento del livello di PSA può essere dovuto a diverse condizioni benigne (non cancerose). Le condizioni benigne più frequenti della prostata che causano tale aumento sono la prostatite (infiammazione della prostata) e l'iperplasia prostatica benigna (IPB) (ingrossamento della prostata). Tuttavia, il carcinoma prostatico è la causa più comunemente associata a livelli elevati di PSA: da quando la correlazione tra PSA e carcinoma prostatico è stata riportata in letteratura per la prima volta nel 1987³, il PSA è diventato uno dei marcatori tumorali più utilizzati per il carcinoma prostatico⁴.

In precedenza, l'esplorazione rettale digitale (ERD) era frequentemente utilizzata come unica modalità diagnostica per rilevare il carcinoma prostatico in fase precoce. Più recentemente, è stato dimostrato che la valutazione del PSA serico insieme all'esplorazione rettale digitale (ERD) aumenta la probabilità di una diagnosi precoce di carcinoma prostatico, migliorando la specificità diagnostica dell'ERD. Nel siero maschile, la concentrazione normale di PSA è pari a < 4 ng/ml; livelli > 4 ng/ml sono indicativi di carcinoma⁵.

La determinazione dei livelli di PSA nel siero è importante non solo per lo screening del carcinoma prostatico ma anche per

il monitoraggio dei pazienti già trattati per questa patologia. La misurazione regolare del PSA è uno strumento importante per valutare l'efficacia potenziale ed effettiva dell'intervento chirurgico o di altre terapie. L'aumento del PSA nei pazienti dopo una prostatectomia radicale o radioterapia può permettere di diagnosticare in modo tempestivo un carcinoma residuo o ricorrente⁶⁻⁸.

2. PRINCIPIO DEL METODO

Il dosaggio Total PSA è un dosaggio immuno-assorbente legato a un enzima (ELISA) basato sul metodo "a sandwich". I pozzetti di microtitolazione sono rivestiti con un anticorpo monoclonale, diretto verso un epitopo specifico presente sulla molecola di PSA. Un'aliquota del siero del paziente è incubata sulla piastra rivestita; viene quindi aggiunto un enzima (perossidasi di rafano, HRP) marcato con anticorpo anti-PSA, diretto verso una regione differente della molecola dell'antigene. Dopo l'incubazione, i pozzetti vengono lavati per rimuovere eventuale materiale non coniugato; il colore viene sviluppato utilizzando un substrato cromogeno (TMB). La reazione cromatica viene interrotta e l'assorbanza della miscela della reazione interrotta viene letta in un lettore di piastre per microtitolazione. L'intensità del colore sviluppato è proporzionale alla concentrazione di antigene nel campione. La densità ottica (OD) misurata dei calibratori è utilizzata per generare una curva di calibrazione in base alla quale calcolare la concentrazione non nota dei campioni.

3. REATTIVI, MATERIALI E STRUMENTAZIONE

3.1. Reattivi e materiali forniti nel kit

1. PSA Calibrators (6 flaconi, 0,5 mL ciascuno)

CAL0 / Sample diluent (10 mL)	REF DCE002/13706-0
CAL1	REF DCE002/13707-0
CAL2	REF DCE002/13708-0
CAL3	REF DCE002/13709-0
CAL4	REF DCE002/13710-0
CAL5	REF DCE002/13711-0

Contengono un preservante privo di mercurio.

2. Controlli (2 flaconi, 0,5 mL ciascuno)

La concentrazione è indicata sul Certificato di Analisi.

Contiene un preservante privo di mercurio.

Low Control	REF DCE045/13701-0
High Control	REF DCE045/13702-0

3. Coated Microplate (1 micropiastra breakable)

Anticorpo monoclonale anti PSA assorbito sulla micropiastra
REF DCE002/13703-0

4. Enzyme Conjugate (1 flacone, 12 mL)
Anticorpo anti PSA coniugato a perossidasi di rafano (HRP).
Contiene un preservante privo di mercurio.

REF DCE002/13702-0

5. Substrate Solution (1 flacone, 12 mL)
Contiene TMB (tetramethylbenzidine) e H₂O₂

REF DCE004/13704-0

6. Stop Solution (1 flacone, 14 mL)
Contiene acido solforico (H₂SO₄) $\leq 5\%$ (concentrazione esatta: 0.5M)

(evitare il contatto, può causare irritazioni e bruciature)

REF DCE005/13705-0

3.2. Reattivi necessari non forniti nel kit

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

3.3. Materiale e strumentazione ausiliari

- Lavatore di micropiastre.
- Vortex o strumenti di miscelazione similari.

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.
- Seguire le Buone Pratiche di Laboratorio (GLP) per la manipolazione di prodotti derivati da sangue.
- Usare i previsti dispositivi di protezione individuale mentre si lavora con i reagenti forniti.
I campioni di siero e plasma devono essere trattati come materiali potenzialmente infettivi. Indossare guanti ed indumenti da laboratorio quando si maneggiano i campioni. Non mangiare, bere o fumare nelle aree in cui vengono gestiti i campioni o i reagenti del kit. Non pipettare con la bocca. In caso di contatto con la pelle, lavare con un sapone germicida e acqua abbondante. Consultare un medico se indicato.
- 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 reagenti devono essere maneggiati come materiali potenzialmente infettivi.
- Dato il carattere potenzialmente infettivo dei campioni e dei componenti del kit, tutti i materiali che sono venuti a contatto con queste componenti dovrebbero essere sterilizzati e smaltiti secondo le normative locali. Questo include anche i rifiuti liquidi.
- I reagenti del kit contengono conservanti, TMB, H₂O₂ o acido solforico e possono essere dannosi se ingeriti. Il contatto diretto con la pelle o la mucosa dovrebbe essere evitato. In caso di contatto con la pelle, lavare abbondantemente con acqua e consultare un medico se necessario.
- 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.
- Evitare l'esposizione del reagente TMB/H₂O₂ a luce solare diretta, metalli o ossidanti. Non congelare la soluzione.
- 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.

Inoltre, la strumentazione utilizzata per la dispensazione deve essere accuratamente pulita dopo l'uso.

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 non aperti 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 (20-26°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.
- Evitare la contaminazione di reagenti o campioni usando puntali usa e getta
- I lettori di micropiastre leggono l'assorbanza verticalmente. Non toccare il fondo dei pozzetti.
- Non utilizzare il kit se la confezione della micropiastra o le bottiglie sono state danneggiate.

6. CONSERVAZIONE E STABILITÀ

Conservare il kit a 2-8°C; il kit è stabile fino alla data di scadenza indicata in etichetta e nel Certificato di Analisi.

Non utilizzare il kit o i componenti dopo la data di scadenza. Dopo l'apertura, il kit è stabile per 8 settimane a 2-8°C.

7. PROCEDIMENTO

7.1. Preparazione di Calibratori e Controlli

I Calibratori sono calibrati contro lo Standard Internazionale WHO 96/670 ed hanno le seguenti concentrazioni:

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

Calibratori e Controlli sono pronti all'uso.

7.2. Preparazione del Coniugato

Il componente "Enzyme Conjugate" è pronto all'uso.

7.3. Preparazione dei Campioni

Il kit può essere utilizzato su campioni di siero o plasma (ottenuto con l'uso di eparina, citrato o EDTA).

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

- condizioni che possono portare ad un aumento dei livelli di PSA:
 - attività su bicicletta
 - rapporto sessuale (eiaculazione)
 - manipolazione della prostata durante le visite mediche come DRE, ecografia prostatica transrettale, ecc...
 - prostatite
 - disfunzione epatica
- condizioni che possono portare ad una diminuzione dei livelli di PSA:
 - assunzione di inibitori per la 5-alfa-reduttasi, antiandrogeni, o GnRH- analoghi.

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

Se non si utilizzano immediatamente, i campioni possono essere conservati a 2-8°C o -20°C per 1 settimana.

5 cicli di congelamento e scongelamento dei campioni sono permessi.

I campioni con un valore previsto di PSA superiori a 25 ng/mL devono essere diluiti con il "Cal 0 / Sample diluent" o refertati come "> 25 ng/mL".

7.4. Procedura analitica

- Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (20-26°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, due per ogni Controllo, due per ogni Campione ed uno per il Bianco.

Reagenti	Calibratore	Campione	Controlli
Calibratore C ₀ -C ₅	25 µL		
Controlli			25 µL
Campione		25 µL	
Incubare 5 minuti a temperatura ambiente (20-26°C).			
Enzyme Conjugate	100 µL	100 µL	100 µL
Miscelare bene muovendo la piastra sul tavolo (10 sec). Incubare 1 h a temperatura ambiente (20-26°C). Rimuovere la soluzione dai pozzetti per aspirazione o decantazione; per la decantazione, battere leggermente la piastra su carta assorbente per rimuovere il liquido residuo. Per il lavaggio riempire i pozzetti con acqua distillata e aspettare 15 secondi prima di rimuovere l'acqua; lavare 5 volte. <u>Procedura raccomandata:</u> lavare i pozzetti 5 volte con 300 o 400 µL di acqua distillata per pozzetto. Preferibilmente utilizzare una procedura di lavaggio automatizzata. Se si lava manualmente, fare attenzione che la soluzione di lavaggio rimanga in ogni pozzetto lo stesso tempo. Questo è necessario per ottenere valori di CV il più bassi possibile.			
Substrate Solution	100 µL	100 µL	100 µL
Incubare 20 minuti a temperatura ambiente (20-26°C) al buio.			
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL
Agitare delicatamente la micropiastra. Leggere l'assorbanza (OD) a 450 nm (azzerando a 630 nm)			

8. CONTROLLO QUALITA'

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

9. CALCOLO DEI RISULTATI

- Calcolare la media dei valori di assorbanza per ogni set di Calibratori, controlli e campioni dei pazienti.
- Usando carta millimetrata, costruire una curva di calibrazione riportando l'assorbanza media ottenuta da ogni Calibratore contro la sua concentrazione, con il valore di assorbanza sull'asse verticale (Y) e la concentrazione sull'asse orizzontale (X).
- Utilizzando il valore medio di assorbanza per ciascun campione, determinare la concentrazione corrispondente dalla curva di calibrazione.
- Metodo automatico: i risultati nella IFU sono stati calcolati automaticamente utilizzando una curva 4 PL (4

parametri logistici). Il metodo 4 parametri logistici è il più idoneo. Altre funzioni di analisi dei dati possono dare risultati leggermente diversi.

5. La concentrazione dei campioni possono essere lette direttamente da questa curva di calibrazione. I campioni con concentrazione superiore a quella del calibratore più alto devono essere diluiti o refertati come > 25 ng/mL. Per il calcolo della concentrazione deve essere preso in considerazione anche il fattore di diluizione.

9.1. Esempio di una tipica curva di calibrazione

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

Calibratori	Densità ottiche (450 nm)
Calibratore 0 (0 ng/mL)	0,05
Calibratore 1 (1,56 ng/mL)	0,24
Calibratore 2 (3,12 ng/mL)	0,39
Calibratore 3 (6,25 ng/mL)	0,74
Calibratore 4 (12,5 ng/mL)	1,27
Calibratore 5 (25,0 ng/mL)	2,01

10. VALORI DI RIFERIMENTO

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

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

Uomini in buona salute hanno in genere una concentrazione di PSA inferiore a 4,0 ng/mL.

Se la concentrazione di PSA è pari o superiore a 4,0 ng/mL sono altamente raccomandati esami di follow-up, in quanto alte concentrazioni di PSA indica un rischio elevato di cancro alla prostata, ma potrebbe anche essere causato da BPH. Si prega di notare che la soglia di 4 ng/mL è solo un valore indicativo.

In letteratura è riportato che le modifiche dovute a età e background etnologico potrebbero essere utili: ad esempio per uomini più giovani il limite dovrebbe essere inferiore a quello degli uomini anziani. Se possibile, è consigliabile per ogni laboratorio di stabilire i propri valori specifici che tengano in considerazione una popolazione indigena della zona dove si trova il laboratorio.

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

Poiché elevati livelli di PSA potrebbero anche essere causati da condizioni non cancerose, seguire gli esami potrebbe aumentare la specificità diagnostica dei valori di PSA totale. In letteratura vengono indagate la densità della PSA, la velocità della PSA e la percentuale di PSA libera (free PSA) per PSA totale (total PSA) per migliorare la discriminazione tra le condizioni cancerose e non-cancerose, e ciò potrebbe essere utilizzato per ridurre biopsie prostatiche non necessarie.

In definitiva però solo una biopsia prostatica può chiaramente mostrare se un carcinoma della prostata è presente o meno.

Nota: i valori di PSA possono essere utilizzati solo per stimare il rischio di cancro. Essi devono sempre essere

interpretati in combinazione con altri risultati clinici e non devono essere utilizzati come unica base per la diagnosi del carcinoma prostatico.

11. PARAMETRI CARATTERISTICI

11.1. Sensibilità

La sensibilità è stata studiata attraverso il LoB (Limit of Blank), LoD (Limit of Detection), LoQ (Limit of Quantificazione) e sensibilità analitica (A.S.). La tabella seguente mostra i risultati ottenuti.

	Risultato (ng/mL)
LoB	0,045
LoD	0,216
LoQ	1,21
A.S.	0,054

11.2. Precisione analitica

La precisione è stata stabilita analizzando sieri di pazienti con diverse concentrazioni di PSA. I risultati sono mostrati di seguito.

Intra-assay			
Pazienti	n° replicati	Media ng/mL	CV %
1	24	12,5	6,0
2	24	3,4	3,9
3	32	0,8	8,8

Inter-assay				
Pazienti	n° replicati	n° lotti	Media ng/mL	CV %
1	75	3	12,3	6,7
2	75	3	3,3	8,0

Inter-lot			
Pazienti	n° replicati	Media ng/mL	CV %
1	18	13,0	3,4
2	18	3,5	8,8
3	18	12,4	4,1
4	18	3,4	4,1

11.3. Specificità analitica

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

I risultati sono mostrati nella tabella seguente.

Antigeni	Quantità aggiunta	Cross-reazione
Proteine		
AFP	10 µg/mL	No
CEA	10 µg/mL	No
HCG	10 µg/mL	No
Lattoalbumina	10 µg/mL	No
PAP	1 µg/mL	No

	Quantità aggiunta	Cross-reazione
Sostanze interferenti		
Bilirubina	0,2 mg/mL	No
Emoglobina*	0,1 mg/ml	No
Trigliceridi	15 mg/mL	No

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

	Quantità aggiunta	Cross-reazione
Farmaci citostatici	/	/
Carboplatina	700 µg/mL	No
Cisplatina	200 µg/mL	No
Folinato di calcio	2.3 µg/mL	No
Ciclofosfamide	1000 µg/mL	No
5-fluorouracile	500 µg/mL	No
Doxorubicina cloridrato	72 µg/mL	No
Desametasone	11 µg/mL	No
Dietilstilbestrolo	2 µg/mL	No
Flutammide	10 µg/mL	No
Metotrexato	50 µg/mL	No
Farmaci ipertensione	/	/
Simvastatina	0.1 µg/mL	No
Irbesartan	1.5 µg/mL	No
Sildenafil citrato	5 µg/mL	No
Furosemide	200 µg/mL	No
Altre sostanze	/	/
Benzalconio cloruro	0.5%	No
Complesso plasmina-α2-antiplasmina	5 µg/mL	No
Paclitaxel	5.5 µg/mL	No

Nota: il kit Diametra Total PSA non discrimina tra forme di PSA libere e complessate.
Ad oggi, allo stato delle nostre conoscenze, non ci sono note altre sostanze (farmaci) che influiscano sulla misurazione del PSA in un campione.

11.4. Studio su campioni plasmatici

Sono stati investigati campioni di plasma ottenuti con l'utilizzo di eparina, citrato e EDTA.

Il risultato del dosaggio derivato dal plasma così ottenuto è stato comparato con il risultato del dosaggio ottenuto su siero prelevato dallo stesso paziente da cui è stato ottenuto il plasma (recupero %).

È stato considerato come accettabile una differenza di concentrazione siero - plasma < 20%.

Per ogni tipologia di plasma sono stati analizzati 10 campioni differenti.

Risultati:

Plasma	Recupero (%)	Interferenza
Litio- Eparina	104,3%	No
EDTA	97,8%	No
Citrato	100,1%	No

11.5. Accuratezza: recupero

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

Campione	Valore atteso (ng/mL)	Valore osservato (ng/mL)	Recupero %
1	6,4	6,4	99,8
2	4,6	4,7	97,6
3	10,1	10,9	92,6

11.6. Accuratezza: linearità

4 campioni contenenti diverse quantità di analita sono stati diluiti in serie con il Cal 0 da 1:2 a 1:16 e analizzati secondo le IFU.

La percentuale di recupero è stata calcolata confrontando i valori attesi e misurati per l'analita; tale percentuale deve essere nei limiti 85-115%.

Campione	Conc. (ng/mL)	Recupero % medio
1	8,84	106,9
2	9,92	111,2
3	14,52	111,0
4	16,69	103,1

Tutti campioni analizzati sono nel range di accettabilità.

11.7. Effetto Hook

Il dosaggio è stato testato per verificare l'effetto gancio (Hook Effect). Fino ad una concentrazione di PSA di 2000 ng/mL non è stato osservato nessun effetto gancio.

11.8. Correlazione

Il kit Diametra Total PSA ELISA è stato comparato con il kit Access Hybritech PSA.
Sono stati analizzati 57 pazienti.
I risultati sono i seguenti:
 $Y = 1,108x + 0,054$
 $R^2 = 0,952$

11.9. Specificità e sensibilità cliniche

Specificità e sensibilità cliniche sono state studiate su 74 pazienti, di cui 11 avevano una concentrazione di PSA maggiore di 4 ng/mL, 63 minore di 4 ng/mL.
I risultati ottenuti sono stati comparati tra il kit ELISA Diametra e un kit ELISA commercialmente disponibile e ritenuto "gold standard".
I risultati sono mostrati nella tabella seguente:

Sensibilità diagnostica	81,2 %
Specificità diagnostica	> 99,9 %
Valore predittivo dei positivi	> 99,9 %
Valore predittivo dei negativi	96,9 %
Riproducibilità	97,2 %

11.10. Valori normali

I valori normali del kit Diametra Total PSA sono stati determinati misurando i valori di individui apparentemente sani e uomini con valori sospetti di PSA elevati.
I risultati sono riportati di seguito:

	Uomini sani	Uomini con valori sospetti
n°	51	50
97.5 th Percentile (ng/mL)	4,85	14,82
2.5 th Percentile (ng/mL)	0,00	2,93
Media (ng/mL)	1,20	6,56
Mediana (ng/mL)	0,86	5,51
Valore minimo (ng/mL)	0,00	1,33
Valore massimo (ng/mL)	5,35	16,94

I valori normali ottenuti corrispondono ai dati riportati in letteratura.
Si raccomanda vivamente che ogni laboratorio determini i propri valori normali e anormali.
Fare riferimento al precedente paragrafo 10 per ulteriori informazioni.

12. LIMITAZIONI

12.1. Affidabilità dei risultati

Il test deve essere eseguito esattamente secondo le istruzioni del produttore per l'uso. Inoltre l'utente deve rigorosamente rispettare le regole GLP (Good Laboratory Practice) o di altre norme nazionali e/o leggi vigenti.
Questo è particolarmente rilevante per l'uso di reagenti di controllo. All'interno della procedura di prova, è importante includere sempre un numero sufficiente di controlli per validare l'accuratezza e la precisione del test.
I risultati del test sono validi solo se tutti i controlli sono all'interno del range specificato e se tutti gli altri parametri di prova sono anche all'interno delle specifiche del saggio. In caso di qualsiasi dubbio o preoccupazione contattare Diametra.

12.2. Conseguenze terapeutiche

Le conseguenze terapeutiche non dovrebbero mai essere basate solamente sui risultati di laboratorio. Ogni risultato di laboratorio è solo una parte del quadro clinico complessivo di un paziente.
Solo nei casi in cui i risultati di laboratorio sono in accettabile accordo con il quadro clinico complessivo del paziente devono essere decise conseguenze terapeutiche.
Il risultato del test stesso non dovrebbe mai essere l'unico fattore determinante per decidere trattamenti terapeutici.

12.3. Responsabilità

Qualsiasi modifica del kit di prova e/o lo scambio o miscelazione di componenti di lotti diversi da un kit ad un altro potrebbe influenzare negativamente i risultati attesi e la validità della prova generale. Tali modifiche e/o scambi annullano qualsiasi tipo di richiesta di sostituzione.
I reclami presentati a causa di un'errata interpretazione dei risultati di laboratorio da parte dei clienti sono anch'essi non validi. Indipendentemente da ciò, in caso di qualsiasi reclamo, la responsabilità del produttore non supera il valore del kit. Eventuali danni arrecati al kit per il test durante il trasporto non sono soggetti alla responsabilità del produttore.

13. DISPOSIZIONI PER LO SMALTIMENTO

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

14. BIBLIOGRAFIA

- Ornstein DK, Pruthi RS. Prostate-specific antigen. Expert Opin Pharmacother. 2000 Dec;1(7):1399-411.
- Kostova MB, Brennen WN, Lopez D, Anthony L, *et al.* PSA-alpha-2-macroglobulin complex is enzymatically active in the serum of patients with advanced prostate cancer and can degrade circulating peptide hormones. Prostate. 2018 Aug;78(11):819-829. doi: 10.1002/pros.23539. Epub 2018 Apr 16. PMID: 29659051.
- Stamey TA, Yang N, Hay AR, McNeal JE, *et al.* Prostate-specific antigen as a serum marker for adenocarcinoma of the prostate. N Engl J Med. 1987 Oct 8;317(15):909-16.
- Albertsen PC. Prostate cancer screening with prostate-specific antigen: Where are we going? Cancer. 2018 Feb 1;124(3):453-455. doi: 10.1002/cncr.31140. Epub 2017 Dec 12. PMID: 29231972.
- Thompson IM, Pauler DK, Goodman PJ, Tangen CM, *et al.* Prevalence of prostate cancer among men with a prostate-specific antigen level < or =4.0 ng per milliliter. N Engl J Med. 2004 May 27;350(22):2239-46. doi:

- 10.1056/NEJMoa031918. Erratum in: N Engl J Med. 2004 Sep 30;351(14):1470. PMID: 15163773.
6. Schröder FH, Hugosson J, Roobol MJ, Tammela TL, *et al*; ESRPC Investigators. Prostate-cancer mortality at 11 years of follow-up. N Engl J Med. 2012 Mar 15;366(11):981-90. doi: 10.1056/NEJMoa1113135. Erratum in: N Engl J Med. 2012 May 31;366(22):2137. PMID: 22417251; PMCID: PMC6027585.
7. Moyer VA; U.S. Preventive Services Task Force. Screening for prostate cancer: U.S. Preventive Services Task Force recommendation statement. Ann Intern Med. 2012 Jul 17;157(2):120-34. doi: 10.7326/0003-4819-157-2-201207170-00459. PMID: 22801674.
8. Li B. Prostate cancer targeted therapy. In: Schwab M, ed. *Encyclopedia of Cancer*. Berlin, Germany: Springer; 2012:3062–3064.

Ed. 09/2022

DCM137-6

Legal Manufacturer:

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

Example Version

Total PSA

for routine analysis

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

IVD



LOT

See external label

2°C 8°C



Σ = 96 test

REF DKO137

INTENDED USE

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

1. CLINICAL SIGNIFICANCE

PSA is a serine protease with chymotrypsin-like activity, whose primary function is seminal clot liquification. The production of PSA is regulated by androgens and occurs almost exclusively in the prostatic epithelial cells¹. PSA is found in circulation in a number of different forms which can be classified into 2 general groups – complexed PSA (bound to serum protease inhibitors) and free PSA (unbound and inactive)². The predominant form of PSA is that bound to the serum protease inhibitor alpha-1 anti-chymotrypsin and comprises 65 – 95% of the circulating level²; the remaining 5 – 35% of PSA in circulation is free PSA and that complexed with alpha-2 macroglobulin.

PSA is produced by normal, as well as malignant, cells of the prostate gland and a number of benign (not cancerous) conditions can cause a man's PSA level to rise. The most frequent benign prostate conditions that cause an elevation in PSA level are prostatitis (inflammation of the prostate) and benign prostatic hyperplasia (BPH) (enlargement of the prostate). However, prostate cancer is most commonly associated with elevated levels of PSA and since the correlation between PSA and prostate cancer volume was first published in 1987³, PSA has become the most widely used tumour marker for prostate cancer⁴.

Previously digital rectal examination (DRE) was frequently used as only diagnostic modality for the detection of early stages of prostate cancer. More recently assessment of serum PSA in conjunction with digital rectal examination (DRE) has been found to increase the chance of early detection of prostate cancer improving the diagnostic specificity of DRE. In male serum, the normal concentration of PSA is < 4 ng/mL with levels > 4 ng/mL indicative of carcinoma⁵.

The determination of PSA serum levels is not only important for the screening of patients for prostate cancer, but also for monitoring patients that have been treated for this disease. Regular PSA measurements are an important tool to examine the potential and actual effectiveness of surgery or other

therapies. An increase of PSA in patients after radical prostatectomy or radiotherapy may allow an earlier discovery of residual or recurrent carcinoma⁶⁻⁸.

2. PRINCIPLE OF THE METHOD

The Total PSA assay is a solid phase enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) based on the sandwich principle. The microtiter wells are coated with a monoclonal antibody, directed towards a specific epitope on the PSA molecule. An aliquot of patient serum is incubated in the coated plate; an enzyme (horseradish peroxidase – HRP) labelled anti- PSA antibody, which is directed towards a different region of the antigen molecule) is then added. Following the incubation the wells are washed to remove unbound material; colour is developed using a chromogenic substrate (TMB). The colour reaction is stopped and the absorbance of the stopped reaction mixture is read in a microtitre plate reader. The intensity of colour developed is proportional to the antigen concentration in the sample. The measured ODs of the Calibrators are used to construct a calibration curve against which the unknown samples are calculated.

3. REAGENTS, MATERIALS AND INSTRUMENTATION

3.1. Reagents and materials supplied in the kit

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

CAL0 / Sample Diluent (10 mL)	REF DCE002/13706-0
CAL1	REF DCE002/13707-0
CAL2	REF DCE002/13708-0
CAL3	REF DCE002/13709-0
CAL4	REF DCE002/13710-0
CAL5	REF DCE002/13711-0

Contain non-mercury preservative.

2. Controls (2 vials, 0.5 mL each)

For concentration see the Certificate of Analysis.

Contains non-mercury preservative.

Low Control	REF DCE045/13701-0
High Control	REF DCE045/13702-0

3. Coated Microplate (1 breakable microplate)

Monoclonal antibody anti PSA adsorbed on microplate
REF DCE002/13703-0

4. Enzyme Conjugate (1 vial, 12 mL)

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

REF DCE002/13702-0

5. Substrate Solution (1 vial, 12 mL)

Contains TMB (tetramethylbenzidine) and H₂O₂

REF DCE004/13704-0

6. Stop Solution (1 vial, 14 mL)

Contains sulphuric acid (H₂SO₄) $\leq 5\%$ (exact concentration: 0.5M)

(avoid contact with the Stop Solution, it may cause skin irritations and burns)

REF DCE005/13705-0

3.2. Material required but not provided

- Distilled water.
- Precision micropipettes (volume: 25 μ L and 100 μ L) with disposable tips.
- ELISA photometer with 450 nm and 630 nm filters.
- Timer with 60 min. range or higher.
- Container for the proper handling of waste and samples after use.

3.3. Auxiliary materials and instrumentation

- Microplate washer.
- Vortex or similar mixing tools.

4. WARNINGS

- This kit is intended for in vitro use by professional persons only. Not for internal or external use in Humans or Animals.

- Follow Good Laboratory Practice (GLP) for handling blood products.

- Use appropriate personal protective equipment while working with the reagents provided.

Serum and plasma samples should be treated as potentially infectious materials. Wear gloves and proper laboratory attire when handling sample materials. Do not eat, drink or smoke in areas where specimen or kit reagents are handled. Do not pipette with the mouth. In case of skin contact, wash with a germicidal soap and copious amounts of water. Seek medical advice if indicated.

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

- Due to the potentially infectious character of samples and kit components all materials that have come in contact with these materials should be sterilized and disposed of according to local regulations. This also includes the liquid waste.

- The assay reagents contain preservatives, TMB, H₂O₂ or sulphuric acid and may be harmful if ingested. A direct skin or mucosa contact should be avoided. In case of skin contact, wash thoroughly with water and seek medical attention if required.

- The 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.

- Avoid the exposure of reagent TMB/H₂O₂ to directed sunlight, metals or oxidants. Do not freeze the solution.

- 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.

Furthermore, the instrumentation employed to dispense it should be thoroughly cleaned after use.

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 (20-26°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 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.

- Avoid reagent or sample carry-over by using fresh tips for solutions and samples.

- Do not use test kit if zip lock pouch or bottles have been damaged.

6. STORAGE AND STABILITY

Store the kit at 2-8°C; the kit is stable until the expiry date claimed on the kit label and in the Certificate of Analysis.

Do not use the kit or its components after the expiry date.

After opening, the kit is stable for 8 weeks at 2-8°C.

7. PROCEDURE

7.1. Preparation of Calibrators and Controls

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

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

Calibrators and controls are ready to use.

7.2. Preparation of the Conjugate

The component "Enzyme Conjugate" is ready to use.

7.3. Preparation of Samples

The kit can be used on serum and plasma samples.

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

- conditions that may lead to an increase of PSA levels:
 - biking
 - sexual intercourse (ejaculation)
 - manipulation of the prostate during medical examinations like DRE, transrectal prostatic ultrasound etc.
 - prostatitis
 - liver dysfunction
- conditions that may lead to a decrease of PSA levels:
 - intake of 5-alpha-reductaseinhibitors, antiandrogens, or GnRH analogues

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

If not used immediately, the samples can be stored at 2-8°C or -20°C for 1 week.

5 freezing / thawing cycles of samples are permitted.

Samples with an expected PSA value higher than 25 ng/mL should be diluted with the "Cal 0 / Sample diluent" or reported as "> 25 ng/mL".

7.4. Procedure

- **Allow all reagents to reach room temperature (20-26°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, two for each Control, two for each sample, one for Blank.

Reagent	Calibrator	Sample	Control
Calibrator C ₀ -C ₅	25 µL		
Control			25 µL
Sample		25 µL	
Incubate 5 minutes at room temperature (20-26°C).			
Enzyme Conjugate	100 µL	100 µL	100 µL

Mix by moving plate on the table (10 sec)
Incubate 1 hour at room temperature (20-26°C).
Remove solution from the wells by aspirating the liquid or by decanting it. If decanting, tap plate on adsorbent paper to remove residual liquid.

For washing fill plate with distilled water and wait 15 sec before removing the distilled water; wash 5x.

We recommend the following procedure: wash wells 5-times with 300 or 400 µL / well distilled water. Preferably use an automated washing procedure. If washing manually take care that the washing solution remains in each well for the same time. This is necessary to receive lowest possible CV-values.

Substrate Solution	100 µL	100 µL	100 µL
Incubate 20 minutes at room temperature (20-26°C) in the dark.			
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL
Shake the microplate gently. Read absorbencies (OD) at 450 nm (blanking 630 nm)			

8. QUALITY CONTROL

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

9. CALCULATION OF RESULTS

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

9.1. Example of Typical Calibration Curve

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

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

10. REFERENCE VALUES

The generally recommended threshold for follow-up examinations is:

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

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

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

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

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

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

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

11.1. Sensitivity

Sensitivity of the assay has been investigated through the Limit of Blank (LoB), Limit of Detection (LoD), Limit of Quantitation (LoQ) and Analytical Sensitivity (AS). The following table shows the results obtained.

	Result (ng/mL)
LoB	0.045
LoD	0.216
LoQ	1.21
A.S.	0.054

11.2. Analytical Precision

Assay precision was established by analysing patient sera of different PSA concentrations. The results are shown below.

Intra-assay				
Patients	n° replicates	Mean ng/mL	SD ng/mL	CV %
1	24	12.5	0.65	6.0
2	24	3.4	0.13	3.9
3	32	0.8	0.07	8.8

Inter-assay				
Patients	n° replicates	n° lots	Mean ng/mL	CV %
1	75	3	12.3	6.7
2	75	3	3.3	8.0

Inter-lot			
Patients	n° replicates	Mean ng/mL	CV %
1	18	13.0	3.4
2	18	3.5	8.8
3	18	12.4	4.1
4	18	3.4	4.1

11.3. Analytical Specificity

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

Antigens	Amount added	Cross reaction
Proteins		
AFP	10 µg/mL	No
CEA	10 µg/mL	No
HCG	10 µg/mL	No
Lactalbumin	10 µg/mL	No
PAP	1 µg/mL	No

	Amount added	Cross reaction
Interfering substances		
Bilirubin	0.2 mg/mL	No
Hemoglobin*	0.1 mg/ml	No
Triglyceride	15 mg/mL	No

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

	Amount added	Cross reaction
Cytostatic drugs		
Carboplatin	700 µg/mL	No
Cisplatin	200 µg/mL	No
Calcium Folate	2.3 µg/mL	No
Cyclophosphamide	1000 µg/mL	No
5-Fluorouracil	500 µg/mL	No
Doxorubicin HCl	72 µg/mL	No
Dexamethasone	11 µg/mL	No
Diethylstilbestrol	2 µg/mL	No
Flutamide	10 µg/mL	No
Methotrexate	50 µg/mL	No
Hypertension drugs		
Simvastatin	0.1 µg/mL	No
Irbesartan	1.5 µg/mL	No
Sildenafil Citrate	5 µg/mL	No
Furosemide	200 µg/mL	No
Other substances		
Benzalkonium Chloride	0.5%	No
Plasmin-α2-Antiplasmin complex	5 µg/mL	No
Paclitaxel	5.5 µg/mL	No

Note: Diametra Total PSA kit does not discriminate between free PSA and complexed forms of PSA.

Until today no other substances (drugs) are known to us, which have an influence on the measurement of PSA in a sample.

11.4. Serum-plasma study

Plasma samples obtained using heparin, citrate and EDTA have been investigated.

Results from plasma samples have been compared to results from serum samples obtained from the same patient (recovery %).

A plasma sample concentration difference < 20% against serum sample concentration has been considered acceptable.

For each type of plasma, 10 different samples have been analyzed.

Results:

Plasma	Recovery (%)	Interference
Lithium-Heparin	104.3%	No
EDTA	97.8%	No
Citrate	100.1%	No

11.5. Accuracy: recovery

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

Sample	Expected value (ng/mL)	Observed value (ng/mL)	Recovery %
1	6.4	6.4	99.8
2	4.6	4.7	97.6
3	10.1	10.9	92.6

11.6. Accuracy: dilution

4 samples containing different amounts of analyte were serially diluted with Cal 0, from 1:2 to 1:16. The percentage recovery was calculated by comparing the expected and measured values for the analyte; this percentage must be found within the acceptance range of 85-115%.

Sample	Conc. (ng/mL)	Mean recovery %
1	8.84	106.9
2	9.92	111.2
3	14.52	111.0
4	16.69	103.1

All linearity data are within the acceptance range.

11.7. Hook effect

The assay was tested for a high dose hook effect.

Up to a PSA concentration of 2000 ng/mL no hook effect was observed.

11.8. Correlation

Diametra Total PSA ELISA was compared with the Access Hybritech PSA assay.

57 samples have been assayed.

The results are the following:

$$y = 1.108x - 0.054$$

$$R^2 = 0.952$$

11.9. Clinical sensitivity and specificity

Clinical sensitivity and specificity have been studied on 74 samples; 11 samples have a PSA concentration > 4 ng/mL, 63 samples have a PSA concentration < 4 ng/mL.

The results have been compared between the Diametra ELISA kit and a commercially available ELISA kit (the "gold standard"). this study showed the following results:

The results are showed below:

Diagnostic sensitivity	81.2 %
Diagnostic specificity	> 99.9 %
Positive Predictive Value	> 99.9 %
Negative Predictive Value	96,9 %
Reproducibility	97,2 %

11.10. Normal Values

The normal values of the Diametra Total PSA kit were determined by measuring the values of apparently healthy individuals and men with suspected high PSA values.

The results are showed below:

	Healthy males	Suspicious males
Number	51	50
97.5th Percentile ng/mL	4.85	14.82
2.5th Percentile ng/mL	0.00	2.93
Mean (ng/mL)	1.20	6.56
Median (ng/mL)	0.86	5.51
Min Value (ng/mL)	0.00	1.33
Max Value (ng/mL)	5.35	16.94

The normal values corresponds to data available in the literature.

It is strongly recommended, that each laboratory should determine its own normal and abnormal values.

Please refer to the previous par. 10 for other information.

12. LIMITATIONS

12.1. Reliability of Results

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

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

12.2. Therapeutic Consequences

Therapeutic consequences should never be based on laboratory results alone. Any laboratory result is only a part of the total clinical picture of a patient.

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

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

12.3. Liability

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

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

13. WASTE MANAGEMENT

Reagents must be disposed off in accordance with local regulations.

14. BIBLIOGRAPHY

1. Ornstein DK, Pruthi RS. Prostate-specific antigen. Expert Opin Pharmacother. 2000 Dec;1(7):1399-411.
2. Kostova MB, Brennen WN, Lopez D, Anthony L, Wang H, Platz E, Denmeade SR. PSA-alpha-2-macroglobulin complex is enzymatically active in the serum of patients with advanced prostate cancer and can degrade circulating peptide hormones. Prostate. 2018 Aug;78(11):819-829. doi: 10.1002/pros.23539. Epub 2018 Apr 16. PMID: 29659051.
3. Stamey TA, Yang N, Hay AR, McNeal JE, Freiha FS, Redwine E. Prostate-specific antigen as a serum marker for adenocarcinoma of the prostate. N Engl J Med. 1987 Oct 8;317(15):909-16.
4. Albertsen PC. Prostate cancer screening with prostate-specific antigen: Where are we going? Cancer. 2018 Feb 1;124(3):453-455. doi: 10.1002/cncr.31140. Epub 2017 Dec 12. PMID: 29231972.
5. Thompson IM, Pauler DK, Goodman PJ, Tangen CM, Lucia MS, Parnes HL, Minasian LM, Ford LG, Lippman SM, Crawford ED, Crowley JJ, Coltman CA Jr. Prevalence of prostate cancer among men with a prostate-specific antigen level < or =4.0 ng per milliliter. N Engl J Med. 2004 May 27;350(22):2239-46. doi: 10.1056/NEJMoa031918. Erratum in: N Engl J Med. 2004 Sep 30;351(14):1470. PMID: 15163773.
6. Schröder FH, Hugosson J, Roobol MJ, Tammela TL, Ciatto S, Nelen V, Kwiatkowski M, Lujan M, Lilja H, Zappa M, Denis LJ, Recker F, Páez A, Mänttinen L, Bangma CH, Aus G, Carlsson S, Villers A, Rebillard X, van der Kwast T, Kujala PM, Blijenberg BG, Stenman UH, Huber A, Taari K, Hakama M, Moss SM, de Koning HJ, Auvinen A; ESRPC Investigators. Prostate-cancer mortality at 11 years of follow-up. N Engl J Med. 2012 Mar 15;366(11):981-90. doi: 10.1056/NEJMoa1113135. Erratum in: N Engl J Med. 2012 May 31;366(22):2137. PMID: 22417251; PMCID: PMC6027585.
7. Moyer VA; U.S. Preventive Services Task Force. Screening for prostate cancer: U.S. Preventive Services Task Force recommendation statement. Ann Intern Med. 2012 Jul 17;157(2):120-34. doi: 10.7326/0003-4819-157-2-201207170-00459. PMID: 22801674.
8. Li B. Prostate cancer targeted therapy. In: Schwab M, ed. *Encyclopedia of Cancer*. Berlin, Germany: Springer; 2012:3062-3064.

Ed. 09/2022

DCM137-6

Legal Manufacturer

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

Total PSA

para análisis diagnóstico

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

IVD



LOT

Ver etiqueta externa

2°C 8°C



$\Sigma = 96$ test

REF DKO137

USO PREVISTO

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

1. IMPORTANCIA CLINICA

El PSA es una proteasa tipo serina con actividad similar a la quimotripsina, cuya función principal es la licuefacción del coágulo seminal. La producción de PSA está regulada por los andrógenos y se produce casi exclusivamente en las células epiteliales de la próstata¹. El PSA se encuentra en circulación en una serie de formas diferentes que pueden clasificarse en dos grupos generales: PSA compuesto (unido a inhibidores de la proteasa sérica) y PSA libre (no unido e inactivo)². La forma predominante del PSA es la que se une al inhibidor de la proteasa sérica alfa-1 antitripsina y comprende entre el 65 y el 95 % del nivel circulante²; el 5-35 % restante del PSA en circulación es el PSA libre y el compuesto con la alfa-2 macroglobulina.

El PSA lo producen tanto las células normales como las de tumores malignos de la próstata y una serie de enfermedades benignas (no cancerosas) pueden hacer que el nivel de PSA se eleve. Las afecciones benignas de la próstata más frecuentes que provocan una elevación del nivel de PSA son la prostatitis (inflamación de la próstata) y la hiperplasia prostática benigna (HPB) (agrandamiento de la próstata). Sin embargo, el cáncer de próstata se asocia con mayor frecuencia a niveles elevados de PSA y, desde que se publicó por primera vez en 1987³ la correlación entre el PSA y el volumen del cáncer de próstata, el PSA se ha convertido en el marcador tumoral más utilizado para el cáncer de próstata⁴.

Anteriormente, el tacto rectal (DRE) se utilizaba con frecuencia como única modalidad diagnóstica para la detección de los estadios iniciales del cáncer de próstata. Más recientemente se ha descubierto que la evaluación del PSA sérico junto con el tacto rectal aumenta las posibilidades de detección precoz del cáncer de próstata, mejorando la especificidad diagnóstica del tacto rectal. La concentración normal en suero masculino de PSA es de < 4 ng/mL, y los niveles > 4 ng/mL son indicativos de carcinoma⁵.

La determinación de los niveles séricos de PSA no solo es importante para el cribado de los pacientes para el cáncer de próstata, sino también para el seguimiento de los pacientes

que han sido tratados por esta enfermedad. Las mediciones periódicas del PSA son una herramienta importante para examinar la eficacia potencial y real de la cirugía u otros tratamientos. Un aumento del PSA en los pacientes después de una prostatectomía radical o de un tratamiento de radioterapia puede permitir un descubrimiento más temprano del carcinoma residual o recurrente⁶⁻⁸.

2. PRINCIPIO DEL METODO

El ensayo PSA total es un ensayo inmunoenzimático (ELISA) en fase sólida basado en el principio de sándwich. Los pocillos de microtitulación están recubiertos con un anticuerpo monoclonal, dirigido a un epítipo específico de la molécula de PSA. Se incubaba una alícuota de suero del paciente en la placa recubierta; a continuación se añade un anticuerpo anti-PSA marcado con enzima (peroxidasa de rábano picante o HRP), que se dirige a una región diferente de la molécula del antígeno. Tras la incubación, los pocillos se lavan para eliminar el material no unido; el color se desarrolla utilizando un sustrato cromogénico (TMB). La reacción de color se detiene y la absorbancia de la mezcla de reacción detenida se lee en un lector de placas de microtitulación. La intensidad del color desarrollado es proporcional a la concentración de antígeno en la muestra. Las densidades ópticas medidas de los calibradores se utilizan para crear una curva de calibración frente a la cual se calculan las muestras desconocidas

3. REACTIVOS, MATERIALES E INSTRUMENTACION

3.1. Reactivos y materiales provistos en el kit

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

Contienen conservante sin mercurio

2. Controles (2 flacone, 0.5 mL cada uno)

La concentración se indica en el certificado de análisis.

Contienen conservante sin mercurio.

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

3. Microplaca revestida (1 microplaca)

Anticuerpo monoclonal anti PSA absorbido en la microplaca

REF DCE002/13703-0

4. Enzyme Conjugado (1 vial, 12 mL)
Anticuerpo anti PSA conjugado con peroxidasa de rábano (HRP). Contienen conservante sin mercurio.
REF DCE002/13702-0
5. Solución Substrato (1 vial, 12 mL)
Contiene TMB (tetramethylbenzidine) y H_2O_2
REF DCE004/13704-0
6. Solución de Parada (1 vial, 14 mL)
Contiene ácido sulfúrico (H_2SO_4) < 5% (concentración exacta: 0.5M)
(evitar el contacto, puede causar irritación y quemaduras)
REF DCE005/13705-0

3.2. Reactivos necesarios no incluidos en el Kit

- Agua destilada.
- Pipetas automáticas (volumen: 25 μ L e 100 μ L) con puntas desechables.
- Lector ELISA con filtros de 450 nm y 630 nm.
- Cronometro.
- Lavador microplacas (opcional).
- Contenedor para el correcto manejo de los desechos.

3.3. Material e instrumental auxiliar

- Dispensadores automáticos
- Vortex o instrumento para mezclar.

4. ALMACENAJE Y ESTABILIDAD

- 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.
- Siga las Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP) en el manejo de las muestras sanguíneas y sus derivados.
- Usar los equipos de protección individual previstos al trabajar con los reactivos suministrados. Las muestras de suero y/o plasma humano deben ser tratadas como potencialmente infectocontagiosas. Utilizar guantes. No comer, beber o fumar en las áreas del laboratorio en las cuales se manejan los kits. No pipetear con la boca, en caso de contacto con la piel lavar con un jabón germicida y abundante agua, consultar un médico si fuera necesario.
- 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 y los Controles deben manipularse como material potencialmente infeccioso.
- Debido al carácter potencialmente infectivo de las muestra y de los componentes del kit, todos los desechos deberán manejarse según la normativa que la autoridad sanitaria local disponga al respecto.
- Los reactivos de kit contienen conservantes, TMB, H_2O_2 y ácido sulfúrico y pueden ser dañinos si ingeridos. Evitarse el contacto directo con la piel, en caso de contacto lavase con abundante agua de ser necesario consulte su médico.
- 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.
- Evite la exposición de los reactivos TMB/ H_2O_2 a la luz solar directa, metales u oxidantes. No congelar la solución.
- 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.

También es conveniente limpiar la instrumentación utilizada para la dispensación

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 (20-26°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 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 inicia una reacción cinética que termina al agregar la solución de Parada. Tanto el sustrato 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.
- Úsese únicamente puntas desechables para evitar contaminaciones.
- Los lectores de microplacas leen las DO verticalmente, por tanto no debe tocarse el fondo de los pocillos.
- No utilice el kit si la confección de la microplaca o de los viales luzcan dañados.

6. CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD

Almacenar el kit y sus componentes a 2-8°C; el kit es estable hasta la fecha de vencimiento indicada en la etiqueta y en el certificado de análisis.

No usar el kit o sus componentes después de la fecha de vencimiento.

Una vez abiertos el kit es estable por 8 semanas a 2-8°C.

7. PROCEDIMIENTO

7.1. Preparación de Calibradores y Controles

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

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

Calibradores y Controles están listos para su uso.

7.2. Preparación del Conjugado

El reactivo "Enzyme Conjugado" está listo para usar.

7.3. Preparación de la muestra

La determinación de PSA totale se puede realizar en el suero o plasma (obtenido con heparina, citrato o EDTA) humano.

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

- Ciclismo
- Sexo (eyaculación)
- Tacto prostático, ecografía prostática transrectal, etc.
- Prostatitis
- Disfunción hepática.

Las siguientes condiciones pueden alterar los reales valores de PSA disminuyéndolos:

- Terapia con inhibidores de la 5-alfa-reductasa, anti andrógenos o bien análogos de la GnRH.

La preparación de las muestras séricas o plasmáticas se realiza según la técnica estándar por centrifugación, la separación de la muestra debe realizarse a la brevedad para evitar hemólisis y mejorar la estabilidad del PSA. Si la prueba no se realiza inmediatamente las muestras pueden almacenarse a 2-8°C or -20°C por 1 semana. Se permiten 5 ciclos de congelación / congelación.

Las muestras con un valor de PSA superior de 25 ng/mL deben ser diluidas con el reactivo "Cal 0 / Diluyente de muestra".

7.4. Procedimiento analítico

- **Esperar hasta que todos los reactivos se encuentren a temperatura ambiente (20-26°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, dos para cada control, dos para cada muestra, uno para el blanco.

Reactivos	Calibrador	Muestra	Control
Calibrador Co-C ₅	25 µL		
Control			25 µL
Muestra		25 µL	
Incubar 5 minutos a temperatura ambiente (20-26°C).			
Enzyme Conjugado	100 µL	100 µL	100 µL
Mezclar bien agitando con movimientos rotativos la placa sobre la mesa de trabajo (10 sec). Incubar 1 hora a temperatura ambiente (20-26°C). Descartar la solución de los pozos por aspiración o decantación; si utiliza la decantación remover el remanente de líquido del pozo golpeando la placa sobre una servilleta. Lavar llenando los pozos con agua destilada durante 15 segundos, repetir 5 veces. <u>Procedimiento recomendado:</u> lavar los pozos 5 veces con 300 o 400 µL de agua destilada, preferiblemente utilice un lavador automático. Si lava manualmente cuide de dejar la solución de lavado el mismo tiempo en cada pozo esto para minimizar el coeficiente de variación.			
Solución Substrato	100 µL	100 µL	100 µL
Incube 20 minutos a temperatura ambiente (20-26°C) en oscura.			
Solución de Parada	100 µL	100 µL	100 µL
Agite delicadamente la microplaca. Leer la absorbancia (OD) a 450 nm (contra referencia a 630 nm)			

8. CONTROL DE CALIDAD

- Se recomienda que los controles internos se utilicen en duplicado en cada análisis. Los resultados obtenidos deben estar en el rango permitido. Es recomendable utilizar controles en los niveles bajos, medianos y altos.
- El riesgo para el paciente se da con valores falsamente negativos limítrofes al valor de cut off de PSA <4.0ng/mL. Por lo tanto es aconsejable validar el kit con procedimientos externos (por ejemplo DGKC).

9. CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

1. Calcular la media de los valores de absorbancia obtenida por cada set de calibradores, controles y muestras.
2. Usando papel milimetrado trazar una curva de calibración graficando la absorbancia promedio de cada calibrador versus su concentración. El valor de absorbancia en el eje Y y el de concentración en el eje X.
3. Utilizando el valor promedio de absorbancia de cada muestra, determine la concentración interpolando el dato sobre la curva obtenida.
4. Método automático: los resultados pueden calcularse automáticamente utilizando un tratamiento logístico de 4 parámetros. Esta forma de tratar los datos es la más idónea, otros análisis de datos pueden producir resultados ligeramente distintos.
5. La concentración de las muestras pueden ser leídas a partir de esta curva estándar. Las muestras con concentraciones superiores a 25 ng/mL deben ser

diluidas o bien reportadas como >25 ng/mL. Recuérdese tomar en cuenta el factor de dilución en el cálculo de la concentración cuando la muestra ha sido previamente diluida.

9.1. Ejemplo de una curva de calibración típica

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

Calibrador	ABS (450 nm)
Calibrador 0 (0 ng/mL)	0,05
Calibrador 1 (1,56 ng/mL)	0,24
Calibrador 2 (3,12 ng/mL)	0,39
Calibrador 3 (6,25 ng/mL)	0,74
Calibrador 4 (12.5 ng/mL)	1,27
Calibrador 5 (25,0 ng/mL)	2,01

10. VALORES ESPERADOS

El límite generalmente recomendado para solicitar análisis de seguimiento es:

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

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

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

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

11. CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

11.1. Sensibilidad

La sensibilidad del ensayo se ha investigado mediante el límite de blanco (LoB), el límite de detección (LoD), el límite

de cuantificación (LoQ) y la sensibilidad analítica (AS). La siguiente tabla muestra los resultados obtenidos.

	Resultado (ng/mL)
LoB	0,045
LoD	0,216
LoQ	1,21
A.S.	0,054

11.2. Precisión analítica

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

Entre-ensayo			
Paciente	n° de replicados	Media ng/mL	CV %
1	24	12,5	6,0
2	24	3,4	3,9
3	32	0,8	8,8

Inter-ensayo				
Paciente	n° de replicados	n° lotti	Media ng/mL	CV %
1	75	3	12,3	6,7
2	75	3	3,3	8,0

Inter-lotes			
Paciente	n° de replicados	Media ng/mL	CV %
1	18	13,0	3,4
2	18	3,5	8,8
3	18	12,4	4,1
4	18	3,4	4,1

11.3. Especificidad

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

Antígenos	Cantidad Agregada	Reacción Cruzada
Proteínas		
AFP	10 µg/mL	No
CEA	10 µg/mL	No
HCG	10 µg/mL	No
Lactoalbumina	10 µg/mL	No
PAP	1 µg/mL	No

	Cantidad Agregada	Reacción Cruzada
Sustancias Interferentes		
Bilirrubina	0.2 mg/mL	No
Hemoglobina*	0.1 mg/mL	No
Trigliceridos	15 mg/mL	No

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

	Cantidad Agregada	Reacción Cruzada
Medicamentos citostáticos	/	/
Carboplatino	700 µg/mL	No
Cisplatino	200 µg/mL	No
Folinato de calcio	2.3 µg/mL	No
Ciclofosfamida	1000 µg/mL	No
5-fluorouracilo	500 µg/mL	No
Clorhidrato de doxorubicina	72 µg/mL	No
Dexametasona	11 µg/mL	No
Dietilestilbestrol	2 µg/mL	No
Flutamida	10 µg/mL	No
Metotrexato	50 µg/mL	No
Medicamentos para la hipertensión	/	/
Simvastatina	0.1 µg/mL	No
Irbesartán	1.5 µg/mL	No
Citrato de sildenafil	5 µg/mL	No
Furosemida	200 µg/mL	No
Otras sustancias	/	/
Cloruro de benzalconio	0.5%	No
Complejo plasmina-α2-antiplasmina	5 µg/mL	No
Paclitaxel	5.5 µg/mL	No

Nota: el kit Diametra Total PSA no discrimina entre PSA no agregado y PSA agregado.
Hasta la fecha, según nuestro conocimiento, no se conocen otras sustancias (fármacos) que afecten la medición del PSA en una muestra.

11.4. Estudio en muestras de plasma

Se investigaron muestras de plasma obtenidas con heparina, citrato y EDTA.

El resultado del ensayo de plasma resultante obtenido se comparó con el resultado del ensayo obtenido en el suero tomado del mismo paciente del que se obtuvo el plasma (% de recuperación).

Se consideró aceptable una diferencia de concentración de plasma sérico <20%.

Para cada tipo de plasma, se analizaron 10 muestras diferentes.

Resultados:

Plasma	Recup. (%)	Interferencia
Heparina-plasma	104,3%	No
EDTA-plasma	97,8%	No
Citrato-plasma	100,1%	No

11.5. Precisión: recuperación

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

Muestra	Valor esperado (ng/mL)	Valor Observado (ng/mL)	Recuperación%
1	6,4	6,40	99,8
2	4,6	4,7	97,6
3	10,1	10,9	92,6

11.6. Precisión: linealidad

Se diluyeron en serie de 1:2 a 1:16 4 muestras que contenían diferentes cantidades de analito con Cal 0 y se analizaron según IFU.

El porcentaje de recuperación se calculó comparando los valores esperados y medidos para el analito; este porcentaje debe estar dentro de los límites del 85-115%.

Muestra	Conc. (ng/mL)	Recuperación%
1	8,84	106,9
2	9,92	111,2
3	14,52	111,0
4	16,69	103,1

11.7. Efecto Hook

Hasta una concentración de PSA de 2000 ng/mL no ha sido observado ningún efecto gancho.

11.8. Correlacion

El kit Diametra Total PSA ELISA ha sido comparado con el kit de Access Hybritech PSA:

Se analizaron 57 pacientes.

Los resultados son los siguientes:

$$y = 1,108 \cdot X - 0,054$$

$$R^2 = 0,952$$

11.9. Especificidad y sensibilidad clínica

Se estudió la especificidad y sensibilidad clínica en 74 pacientes, de los cuales 11 tenían una concentración de PSA mayor a 4 ng/mL, 63 menor a 4 ng/mL.

Los resultados obtenidos se compararon entre el kit Diametra ELISA y un kit ELISA comercialmente disponible y considerado "gold standard".

Los resultados se muestran en la siguiente tabla:

Sensibilidad diagnóstica	81,2 %
Especificidad diagnóstica	> 99,9 %
Valor predictivo de positivos	> 99,9 %
Valor predictivo de los negativos	96,9 %
Reproducibilidad	97,2 %

11.10. Valores de normalidad

Los valores de normalidad del kit Diametra Total PSA se determinaron midiendo los valores de individuos aparentemente sanos y hombres con sospecha de valores elevados de PSA.

Los resultados se muestran a continuación:

	Hombres sanos	Hombres con valores sospechosos
n°	51	50
97.5 th Percentil (ng/mL)	4,85	14,82
2.5 th Percentil (ng/mL)	0,00	2,93
Promedio (ng/mL)	1,20	6,56
Mediana (ng/mL)	0,86	5,51
Valor mínimo (ng/mL)	0,00	1,33
Valor máximo (ng/mL)	5,35	16,94

Los valores de normalidad obtenidos corresponden a los datos reportados en la literatura.

Se recomienda que cada laboratorio determine sus propios valores normales y anormales.

Consulte el párrafo 10 anterior para obtener más información.

12. ASPECTOS LEGALES

12.1. Fiabilidad de los resultados

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

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

12.2. Decisiones terapéuticas

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

12.3. Responsabilidad

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

13. INDICACIONES PARA LA ELIMINACIÓN

Eliminar los reactivos conforme con la normativa local sobre la materia

14. BIBLIOGRAFIA

- Ornstein DK, Pruthi RS. Prostate-specific antigen. Expert Opin Pharmacother. 2000 Dec;1(7):1399-411.
- Kostova MB, Brennen WN, Lopez D, Anthony L, *et al.* PSA-alpha-2-macroglobulin complex is enzymatically active in the serum of patients with advanced prostate cancer and can degrade circulating peptide hormones. Prostate. 2018 Aug;78(11):819-829. doi: 10.1002/pros.23539. Epub 2018 Apr 16. PMID: 29659051.
- Stamey TA, Yang N, Hay AR, McNeal JE, *et al.* Prostate-specific antigen as a serum marker for adenocarcinoma of the prostate. N Engl J Med. 1987 Oct 8;317(15):909-16.
- Alberts PC. Prostate cancer screening with prostate-specific antigen: Where are we going? Cancer. 2018 Feb 1;124(3):453-455. doi: 10.1002/cncr.31140. Epub 2017 Dec 12. PMID: 29231972.
- Thompson IM, Pauler DK, Goodman PJ, Tangen CM, *et al.* Prevalence of prostate cancer among men with a prostate-specific antigen level < or =4.0 ng per milliliter. N Engl J Med. 2004 May 27;350(22):2239-46. doi: 10.1056/NEJMoa031918. Erratum in: N Engl J Med. 2004 Sep 30;351(14):1470. PMID: 15163773.
- Schröder FH, Hugosson J, Roobol MJ, Tammela TL, *et al.*; ESRPC Investigators. Prostate-cancer mortality at 11 years of follow-up. N Engl J Med. 2012 Mar 15;366(11):981-90. doi: 10.1056/NEJMoa1113135. Erratum in: N Engl J Med. 2012 May 31;366(22):2137. PMID: 22417251; PMCID: PMC6027585.
- Moyer VA; U.S. Preventive Services Task Force. Screening for prostate cancer: U.S. Preventive Services Task Force recommendation statement. Ann Intern Med. 2012 Jul 17;157(2):120-34. doi: 10.7326/0003-4819-157-2-201207170-00459. PMID: 22801674.
- Li B. Prostate cancer targeted therapy. In: Schwab M, ed. *Encyclopedia of Cancer*. Berlin, Germany: Springer; 2012:3062-3064.

Ed. 09/2022

DCM137-6

Legal Manufacturer

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

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

	DE 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 FR Attention, veuillez consulter les documents d'accompagnement GB Caution, consult accompanying documents IT Attenzione, consultare la documentazione allegata PT Atenção, consultar os documentos de acompanhamento	 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 Código 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 Limitación 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 Références du catalogue GB Catalogue number IT Numero di Catalogo PT Número do catálogo
	DE Vor direkter sonneneinstrahlung schützen ES Mantener alejado de la luz solar FR Tenir à l'écart de la lumière du soleil GB Keep away from sunlight IT Tenere lontano dalla luce solare PT 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

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

ERROR / POSIBLES CAUSAS / SUGERENCIAS

No se produce ninguna reacción colorimétrica del ensayo

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

Reacción escasa (DO demasiado bajas)

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

Reacción demasiado intensa (DO demasiado altas)

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

Valores inexplicablemente fuera de escala

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

CV% intraensayo elevado

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

CV% interensayo elevado

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

ERREUR CAUSES POSSIBLES / SUGGESTIONS

Aucune réaction colorimétrique de l'essai

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

Réaction trop faible (DO trop basse)

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

Réaction trop intense (DO trop élevée)

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

Valeurs inexplicablement hors plage

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

CV% intra-essai élevé

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

CV% inter-essai élevé

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