



DCM138-6  
Ed. 04/2020

## Free PSA

per analisi di routine

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

IVD



LOT

Vedere etichetta esterna

2°C 8°C



$\Sigma = 96$  test

REF DKO138

### DESTINAZIONE D'USO

Il kit Diametra Free PSA ELISA è utilizzato per la determinazione quantitativa della PSA libera (f-PSA) nel siero o plasma.

La determinazione dei livelli di f-PSA viene generalmente utilizzata in combinazione con la misura del PSA totale (t-PSA) per determinare il rapporto tra f-PSA e t-PSA. Questo rapporto contribuisce a stimare il rischio per il cancro alla prostata e a discriminare gli elevati livelli di t-PSA causati da condizioni non-cancerose da quelli causati da condizioni cancerose.

La determinazione della f-PSA è particolarmente indicata per gli uomini con elevati livelli di t-PSA e risultati negativi con l'esplorazione rettale digitale (DRE), al fine di decidere se è necessaria una seconda biopsia della prostata.

### 1. SIGNIFICATO CLINICO

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

Nel 1979, Wang et al. isolarono un antigene specifico per il tessuto prostatico normale e chiamarono questa proteina PSA. La PSA è una serina-proteasi di 33 kDa. Studi immunostologici hanno dimostrato che la PSA è localizzata nel citoplasma delle cellule acinose della prostata, dell'epitelio duttale e nella secrezione del lumina duttale, presente nei tessuti della prostata normali, benigni iperplastici e maligni, così come nel cancro metastatico della prostata e nel liquido seminale. Se l'integrità strutturale della prostata è alterata e/o le dimensioni della ghiandola aumentano, la quantità di PSA nel plasma sanguigno può diventare elevata. Nel plasma sanguigno, la maggior parte della PSA forma complessi con vari inibitori delle proteinasi. Solo una piccola frazione di PSA circola come PSA libera inattiva. Fondamentalmente possono essere distinte tre principali forme di PSA, di cui solo due sono immunoreattive. La forma predominante di PSA è un complesso con l' $\alpha$ 1-antichymotrypsin (ACT-PSA). La PSA libera (f-PSA) rappresenta circa il 10-40% della PSA immunologicamente rilevabile. La quantità totale della PSA immunoreattiva è conosciuto come PSA totale (t-PSA). La

PSA complessata all' $\alpha$ -2-macroglobulina non può essere rilevata da analisi immunologiche ed è quindi frequentemente chiamata PSA occulta (o-PSA).

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

### 2. PRINCIPIO DEL METODO

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

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

### 3. REATTIVI, MATERIALI E STRUMENTAZIONE

#### 3.1. Reattivi e materiali forniti nel kit

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

CAL0 / Sample Diluent (10 mL)	REF DCE002/13806-0
CAL1	REF DCE002/13807-0
CAL2	REF DCE002/13808-0
CAL3	REF DCE002/13809-0
CAL4	REF DCE002/13810-0
CAL5	REF DCE002/13811-0

Contengono un conservante privo di mercurio.

##### 2. Controls (2 flaconi, 0.5 mL ciascuno)

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

La concentrazione è indicata sul Certificato di Analisi.

Contiene un conservante privo di mercurio.

##### 3. Coated Microplate (1 micropiastra breakable)

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

##### 4. Assay Reagent (1 flacone, 6 mL)

Contiene un conservante privo di mercurio.

REF DCE043/13843-0

##### 5. Enzyme Conjugate (1 flacone, 6 mL)

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

REF DCE002/13802-0

##### 6. 40X Wash Buffer (1 flacone, 30 mL)

Diluire con acqua distillata prima dell'uso.

REF DCE057/13857-0

##### 7. Substrate Solution (1 flacone, 14 mL)

Contiene TMB (tetramethylbenzidine) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

REF DCE004/13804-0

##### 8. Stop Solution (1 flacone, 14 mL)

Contiene acido solforico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 0.5M (evitare il contatto, può causare irritazioni e bruciature)

REF DCE005/13805-0

#### 3.2. Reattivi necessari non forniti nel kit

- Micropipette di precisione (volume: 25 microlitri e 100 microlitri) con punte monouso
- Acqua distillata
- Spettrofotometro ELISA con filtri a 450 nm e 620-630 nm
- Timer con 60 minuti di intervallo 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, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o acido solforico e possono essere dannosi se ingeriti. Evitare il contatto diretto con la pelle o la mucosa. 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/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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. Assicurarsi di stare utilizzando la revisione corrente e valida delle 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 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 2 mesi a 2-8°C.

## 7. PROCEDIMENTO

### 7.1. Preparazione di Calibratori e Controlli

I Calibratori sono calibrati contro lo Standard Internazionale WHO NIBSC 17/102 e hanno le seguenti concentrazioni:

	C <sub>0</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>5</sub>
ng/mL	0	0,75	1,5	3	6	12

Calibratori e Controlli sono pronti all'uso.

### 7.2. Preparazione del Coniugato

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

### 7.3. Preparazione dell' "Assay Reagent"

Il componente "Assay Reagent" è pronto all'uso.

### 7.4. Preparazione e conservazione dei Campioni

Il kit può essere utilizzato su campioni di siero o plasma (ottenuto con l'uso di Litio-eparina, Citrato o EDTA). Non utilizzare campioni contenenti Sodio Azide.

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 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.

Nota importante: i campioni contenenti alti titoli di fattore reumatoide ed anticorpi umani anti-topo (HAMA) potrebbero fornire risultati errati.

I campioni con un valore di free PSA superiori a 12 ng/mL devono essere diluiti con il "Cal 0 / Sample diluent" o referati come "> 12 ng/mL".

### Conservazione dei campioni

Se non si effettua il dosaggio immediatamente, i campioni possono essere conservati:

- 3 giorni a 2-8°C
- 7 giorni a -20°C

Si raccomanda di effettuare sui campioni un solo ciclo di congelamento e scongelamento.

## 7.5. Preparazione della Wash Solution

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

La soluzione di lavaggio diluita è stabile per 2 settimane a temperatura ambiente (20-26°C).

## 7.6. Procedura del test

- **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 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	Calibratori	Campione	Controllo
Calibratore C <sub>0</sub> -C <sub>5</sub>	25 µL		
Controllo			25 µL
Campione		25 µL	
Assay Reagent	50 µL	50 µL	50 µL
Miscelare la soluzione muovendo la micropiastra sul tavolo per 10 secondi; è molto importante avere una miscelazione completa. Incubare 1 h a temperatura ambiente (20-26°C)			
Enzyme Conjugate	50 µL	50 µL	50 µL

Miscelare bene muovendo la piastra sul tavolo (10 sec), è molto importante avere una miscelazione completa. 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.

Lavaggio: riempire i pozzetti con 300 µL di soluzione di lavaggio diluita, aspettare 10 secondi e rimuovere la soluzione; ripetere questa procedura di lavaggio per un totale di 5 volte.

Nel caso si utilizzi un plate washer automatico, utilizzare 400 µL di soluzione di lavaggio diluita.

Nota importante: la sensibilità e precisione del dosaggio sono fortemente influenzate dalla corretta esecuzione della procedura di lavaggio.

Substrate Solution	100 µL	100 µL	100 µL
--------------------	--------	--------	--------

Incubare 15 minuti a temperatura ambiente (20-26°C) al buio.

Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL
---------------	--------	--------	--------

Agitare delicatamente la micropiastra. Leggere l'assorbanza a 450 nm contro una lunghezza d'onda di riferimento di 620-630 nm. È raccomandato di leggere la micropiastra entro 10 minuti dall'aggiunta della Stop Solution.

## 8. CONTROLLO QUALITÀ

Le buone pratiche di laboratorio richiedono che i controlli vengano eseguiti con ciascuna curva di calibrazione.

È necessario analizzare un numero statisticamente significativo di controlli al fine di stabilire valori medi e intervalli accettabili e pertanto garantire prestazioni del kit adeguate.

Si consiglia di utilizzare campioni di controllo secondo le normative locali vigenti al fine di assicurare la validità quotidiana dei risultati.

Utilizzare i controlli sia a livello normale che patologico.

I controlli e i risultati corrispondenti del laboratorio di controllo qualità sono indicati nel Certificato di Analisi presente in ogni kit; questi si riferiscono sempre al lotto del kit in uso e devono essere utilizzati per il confronto diretto dei risultati.

Si raccomanda inoltre di utilizzare programmi nazionali e internazionali di valutazione della qualità al fine di garantire l'accuratezza dei risultati.

Utilizzare metodi statistici appropriati per l'analisi dei valori e delle tendenze di controllo. Se i risultati del test non si adattano alle specifiche accettabili stabilite di materiali di controllo, tali risultati devono essere considerati non validi.

## 9. CALCOLO DEI RISULTATI

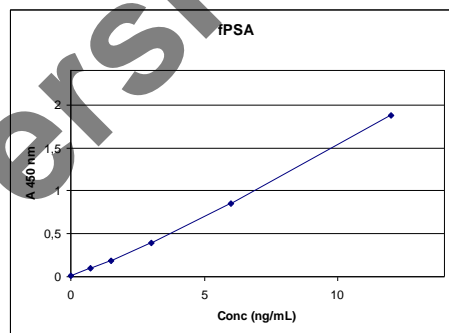
1. Calcolare l'assorbanza media per ogni duplicato.
2. Sottrarre il valore di assorbanza del calibratore zero dai valori di assorbanza media di calibratori, controllo e campioni.
3. Disegnare la curva di calibrazione in una carta per grafici lin-lin o log-log, riportando i valori di assorbanza dei calibratori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

I campioni con un valore di f-PSA superiori a 12 ng/mL devono essere diluiti con il "Cal 0 / Sample diluent" o refertati come "> 12ng/mL".

### 9.1. Esempio di curva di calibrazione

I dati seguenti sono a solo scopo di esempio e non devono essere utilizzati in nessun modo.

Pozzetti	Identity	A 450 nm		Conc. ng/mL
1-2	Cal 0 ng/mL	0,011	0,009	/
3-4	Cal 0.75 ng/mL	0,109	0,096	/
5-6	Cal 1.5 ng/mL	0,185	0,179	/
7-8	Cal 3 ng/mL	0,393	0,392	/
9-10	Cal 6 ng/mL	0,871	0,837	/
11-12	Cal 12 ng/mL	1,901	1,844	/
13-14	Control Low	0,218	0,231	2,05
15-16	Control High	1,009	0,989	7,80



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

## 10. VALORI ATTESI E LIMITAZIONI DEL TEST

In uno studio condotto su 120 uomini apparentemente sani usando il kit Dia.Metra Srl Free PSA sono stati osservati i seguenti risultati:

Popolazione	Uomini, sani
n° campioni	120
Media (ng/mL)	0,2
Mediana (ng/mL)	0,1
Percentile (ng/mL) (2,5th - 97,5th)	0,0 - 1,2
Range valori (ng/mL)	0,0 - 4,6

Quando i valori della PSA totale sono nell'intervallo 4-10 ng/mL, il rapporto free PSA / total PSA (% free PSA) può essere utilizzato per aumentare la specificità diagnostica del test per la PSA.

Un rapporto ≤10% indica un rischio di cancro alla prostata compreso tra il 49% e il 65%, in dipendenza dell'età; un rapporto free PSA / total PSA >25% indica un rischio di cancro alla prostata compreso tra il 9% e il 16%, in dipendenza dell'età.

In accordo alla indicazioni del "American Cancer Society and National Cancer Institute" gli uomini con free PSA

inferiore al 7% dovrebbero essere sottoposti a biopsia (vedi referenza 10).

**Si prega di notare che un valore isolato di concentrazione di free PSA non ha alcun valore diagnostico.**

I valori sopra riportati sono solo una guida per l'utente. È raccomandato che ogni laboratorio stabilisca i propri valori specifici, che tengano in considerazione una popolazione indigena della zona dove si trova il laboratorio.

**Nota: i valori di PSA e il rapporto free PSA / total 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. Assay range

L'assay range del kit è 0,095 - 12,0 ng/mL.

### 11.2. Sensibilità analitica

La sensibilità analitica è stata studiata attraverso il LoB (limite del bianco), il LoD (limite di rilevazione), il LoQ (limite di quantificazione) e la sensibilità analitica (A.S.).

La tabella seguente mostra i risultati ottenuti.

	Risultato (ng/mL)
LoB	0,001
LoD	0,014
LoQ	0,095
A.S.	0,01

### 11.3. Precisione analitica

#### • Intra-assay (within assay)

La precisione intra-assay è stata determinata misurando ogni campione 10 volte.

Campione	Numero di replicati	Media ng/mL	CV %
1	10	0,7	5,3
2	10	4,9	3,6
3	10	6,9	3,1
4	10	9,0	2,6

#### • Inter-assay (between assay)

La precisione inter-assay è stata determinata misurando ogni campione 10 volte per 3 giorni.

Campione	Numero di replicati	Media ng/mL	CV %
1	30	0,7	10,0
2	30	4,6	8,0
3	30	6,5	6,8
4	30	8,3	6,3

#### • Inter-lot (between lots)

La precisione inter-lot è stata determinata misurando ogni campione 6 volte con 3 differenti lotti di kit.

Campione	Numero di replicati	Media ng/mL	CV %
1	18	0,7	5,4
2	18	1,5	6,1
3	18	4,7	6,4
4	18	8,6	7,6

## 11.4. Accuratezza

#### • Recupero

4 campioni sono stati arricchiti con l'aggiunta di soluzioni contenenti free PSA con concentrazioni note.

Il recupero (%) è stato calcolato come rapporto percentuale tra valori misurati e previsti.

	Campioni				
	1	2	3	4	
Conc. (ng/mL)	1,4	1,9	3,8	4,9	
Media recupero (%)	88,8	92,5	88,5	92,9	
Recupero	da	87,8	89,5	86,9	86,8
	a	89,9	95,4	90,1	97,6

#### • Linearità

4 campioni sono stati misurati non diluiti e in diluizioni seriali con il Calibratore 0. Il recupero (%) è stato calcolato moltiplicando il rapporto percentuale tra i valori previsti e quelli misurati.

	Sample				
	1	2	3	4	
Conc (ng/ml)	1,43	2,65	4,30	10,92	
Average (%)	100,5	94,1	104,1	108,2	
Recovery	from	88,6	87,5	98,6	98,4
	to	107,9	98,1	107,4	115,0

## 11.5. Specificità analitica

#### • Sostanze interferenti endogene

Le interferenze per bilirubina, emoglobina e trigliceridi sono state studiate aggiungendo la sostanza interferente a differenti concentrazioni al campione di siero, e confrontando la sua concentrazione con il campione non caricato.

Sono stati analizzati 4 differenti campioni. L'interferenza è stata valutata come "significativa" se causa un bias di concentrazione > 10% tra campione caricato e non caricato.

La tabella seguente mostra i risultati ottenuti:

Sostanza	Concentrazione	Interferenza
Trigliceridi	7,5 mg/mL	No
Bilirubina	0,5 mg/mL	No
Emoglobina	4 mg/mL	No

Conclusione: a seguito dello studio, non vi è alcuna interferenza significativa da bilirubina, emoglobina e trigliceridi alla concentrazione saggiata.

Come buona pratica di laboratorio si ricorda comunque di non utilizzare campioni altamente lipemici o emolizzati.

• **Cross-reattività**

Le seguenti sostanze sono state testate per valutare eventuali cross-reattività:

Sostanza	Concentrazione (ng/mL)	Cross-reattività (%)
AFP	193,6	0,0
CEA	100,0	0,0
b-HCG	21,8	0,0
Kallikrein	1200,0	0,0
Rheumatic Factor	1200,0	0,0
HAMA	1200,0	0,0

• **Interferenze da farmaci**

Le interferenze per i farmaci indicati sotto sono state studiate aggiungendo la il farmaco a differenti concentrazioni al campione di siero, e confrontando la sua concentrazione con il campione non caricato.

Sono stati analizzati 4 differenti campioni.

L'interferenza è stata valutata come "significativa" se causa un bias di concentrazione >15% tra campione caricato e non caricato.

La tabella seguente mostra i farmaci analizzati:

Farmaci citostatici	Conc. testata (µg/mL)
Carboplatin	700
Cisplatin	200
Calcium Folate	2,3
Cyclophosphamide	550
Fluorouracil	520
Dexamethasone	11
Paclitaxel	5,3
Doxorubicin • HCl	72

Farmaci per l'ipertensione	Conc. testata (µg/mL)
Simvastatin	0,1
Irbesartan	1,5
Sildenafil Citrate	5,0
Furosemide	0,2

Farmaci antimicrobici	Conc. testata (µg/mL)
Benzalkonium Chloride	0,5

In accordo alle specifiche indicate, nessun farmaco ha dato interferenza alle concentrazioni analizzate.

**11.6. Effetto Hook**

Non è stato osservato nessun effetto Hook con campioni fino a 240 ng/mL di free PSA.

**11.7. Studio su campioni plasmatici**

Sono stati investigati 8 campioni di plasma ottenuti con l'utilizzo di Litio-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 (recupero %).

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

Risultati:

Plasma	Interferenza
Litio Eparina	No
Citrato	No
EDTA	No

Il presente test può essere applicato su campioni di siero e plasma (ottenuto con Litio-eparina, Citrato o EDTA).

**11.8. Specificità e sensibilità cliniche**

Le prestazioni diagnostiche per il kit Free PSA non possono essere calcolate in relazione alla molecola "PSA libera" in quanto non esiste un valore soglia come nel caso della PSA totale.

Per la stima del rischio di cancro alla prostata, fa riferimento il rapporto tra PSA libera e PSA totale, pertanto non possono essere fatte analisi in relazione a campioni positivi e negativi conoscendo solamente il valore di PSA libera senza sapere il valore di PSA totale.

**11.9. Correlazione**

Il kit presente Free PSA aggiornato è stato comparato con la precedente versione del kit.

La curva di regressione lineare è la seguente:

$$Y = 0,928 \cdot X + 0,021$$

$$R^2 = 0,939$$

**12. DISPOSIZIONI PER LO SMALTIMENTO**

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

**13. ASPETTI GIURIDICI**

**13.1. 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.

**13.2. Conseguenze terapeutiche**

Le conseguenze terapeutiche non dovrebbero mai essere basate solamente sui risultati di laboratorio, neanche se tutti i risultati sono in accordo con quanto indicato al

precedente punto 13.1. Ogni risultato di laboratorio è solo una parte del quadro clinico complessivo di un paziente. Solo nei casi in cui i risultati di laboratorio sono in accettabile accordo con il quadro clinico complessivo del paziente devono essere decise conseguenze terapeutiche. Il risultato del test stesso non dovrebbe mai essere l'unico fattore determinante per decidere trattamenti terapeutici.

### 13.3. Responsabilità

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

I reclami presentati a causa di un'errata interpretazione dei risultati di laboratorio da parte dei clienti e soggetti al precedente punto 13.2 sono anch'essi non validi. Indipendentemente da ciò, in caso di qualsiasi reclamo, la responsabilità del produttore non supera il valore del kit. Eventuali danni arrecati al kit per il test durante il trasporto non sono soggetti alla responsabilità del produttore.

### 14. BIBLIOGRAFIA

1. World Cancer Report. World Health Organization. 2014. Chapter 5.11 ISBN 978-9283204299
2. Henttu P and Vihko P. Prostate-specific antigen and human glandular kallikrein: two kallikreins of the human prostate. *Amm Med* 1994, 26(3):157-64.
3. Balk SP, Ko YL and Bubley GJ. Biology of prostate-specific antigen. *J Clin Oncol*. 2003, 15;21(2):383-91.
4. Zhou AM et al. Multiple forms of prostate-specific antigen in serum: differences in immunorecognition by monoclonal and polyclonal assays. *Clin Chem*. 1993, 39(12):2483-91.
5. Fritsche HA and Babalan RJ. Analytical performance goals for measuring prostate-specific antigen. *Clin Chem*, 1993, 39: 1529-1529.
6. Velonas VM, Woo HH, dos Remedios CG, Assinder SJ. Current status of biomarkers for prostate cancer. *Int J Mol Sci*. 2013, 24;14(6):11034-60.
7. Gion M et al. Percent free prostate-specific antigen in assessing the probability of prostate cancer under optimal analytical conditions. 1998, *Clin Chem* 44(12):2462-70.
8. Akdas et al. The role of free prostate specific antigen in the diagnosis of prostate cancer. *British J Urol*, 1997, 79: 920-923.
9. Chen YT et al. Using proportions of free to total prostate-specific antigen, age, and total prostate-specific antigen to predict the probability of prostate cancer. *Urology*, 1996, 47(4):518-24.
10. Catalona et al. Use of the percentage of free prostate-specific antigen to enhance differentiation of prostate cancer from benign prostatic disease: a prospective multicenter clinical trial. *JAMA*, 1998, 20;279(19):1542-7.
11. Liu J et al. Establishment of two new predictive models for prostate cancer to determine whether to require prostate biopsy when the PSA level is in the diagnostic gray zone (4-10 ng ml<sup>-1</sup>). *Asian J Androl*. 2019 21:1-4.
12. Huang Y, Li ZZ, Huang YL, Song HJ, Wang YJ. Value of free/total prostate-specific antigen (f/t PSA) ratios for prostate cancer detection in patients with total serum prostate-specific antigen between 4 and 10 ng/mL: A meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2018; 97(13).
13. Duffy MJ. Biomarkers for prostate cancer: prostate-specific antigen and beyond. *Clin Chem Lab Med*. 2019, 12. aop.
14. Carlsson SV and Roobol MJ. Improving the evaluation and diagnosis of clinically significant prostate cancer in 2017. *Curr Op in Urol*. 2017 27(3): 198–204.
15. Milford Ward A et al. Prostate specific antigen: biology, biochemistry and available commercial assays. *Ann Clin Biochem*, 2001, 38: 633-651.
16. Price CP et al., Pre-and post-analytical factors that may influence use of serum prostate specific antigen and its isoforms in a screening program for prostate cancer. *Ann Clin Biochem*, 2001, 38: 188-216.
17. Ferguson J et al. Continued provision of WHO International Standards for total and free PSA: Content and commutability of replacement preparations. *Clin Biochem*. 2019 71:58-66.

Ed. 04/2020

DCM138-6

#### Legal Manufacturer

Dia.Metra S.r.l.  
Via Pozzuolo 14  
06038 SPELLO (PG) Italy  
Tel. +39-0742-24851  
Fax +39-0742-316197  
E-mail: [info@diametra.com](mailto:info@diametra.com)

## Free PSA

for routine analysis

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

IVD



LOT

See external label

2°C 8°C



Σ = 96 test

REF DKO138

### INTENDED USE

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

### 1. CLINICAL SIGNIFICANCE

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

In 1979, Wang et al. isolated a specific antigen for normal prostate tissue and called this protein PSA. PSA is a 33 kDa serine proteinase. Immunohistological studies have shown that PSA is localized in the cytoplasm of prostate acinar cells, ductal epithelium and in the secretion on the ductal lumina, present in normal, benign hyperplastic and malignant prostate tissues as well metastatic prostate cancer and in seminal plasma. If the structural integrity of the prostate is disturbed and/or the gland size is increased, the amount of PSA in the blood plasma may become elevated. In the blood plasma, most of the PSA forms complexes with various proteinase inhibitors. Only a small fraction of PSA circulates as free inactive PSA. Basically three major forms of PSA can be distinguished, only two of which are immunoreactive. The predominant form of PSA is a complex with  $\alpha$ 1-antichymotrypsin (ACT-PSA). Inactive free PSA (f-PSA) represents around 10-40% of the immunologically detectable PSA. The total amount of immunoreactive PSA is known as total PSA (t-PSA). PSA complexed with  $\alpha$ -2-macroglobulin cannot be detected by immunological assays and is therefore frequently called occult PSA (o-PSA).

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

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

### 2. PRINCIPLE

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



### 3. REAGENTS, MATERIALS AND INSTRUMENTATION

#### 3.1. Reagents and materials supplied in the kit

1. PSA Calibrators (6 vials, 0.5 mL each)  
CAL0 / Sample Diluent (10 mL) **REF DCE002/13806-0**  
CAL1 **REF DCE002/13807-0**  
CAL2 **REF DCE002/13808-0**  
CAL3 **REF DCE002/13809-0**  
CAL4 **REF DCE002/13810-0**  
CAL5 **REF DCE002/13811-0**

Contain non-mercury preservative.

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

For concentration see the Certificate of Analysis.

Contains non-mercury preservative.

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

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

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

6. 40X Wash Buffer (1 vial, 30 mL)  
Dilute with distilled water before use.  
**REF DCE057/13857-0**

7. TMB Substrate (1 vial, 14 mL)  
Contains TMB (tetramethylbenzidine) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
**REF DCE004/13804-0**

8. Stop Solution (1 vial, 14 mL)  
Contains sulphuric acid (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 0.5M (avoid contact with the Stop Solution, it may cause skin irritations and burns)  
**REF DCE005/13805-0**

#### 3.2. Material required but not provided

- Precision micropipettes (volume: 25 µL and 100 µL) with disposable tips
- Distilled water
- ELISA photometer with 450 nm- and 630 nm-filters
- Timer with 60 min. range or higher
- 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, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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.  
Be sure to use the current valid revision of the 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.
- 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 2 months at 2-8°C.

## 7. ASSAY PROCEDURE

### 7.1. Preparation of the Calibrators and Controls

The Calibrators are calibrated against WHO NIBSC 17/102 and have the following concentrations:

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

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 the "Assay Reagent"

The component "Assay Reagent" is ready to use.

### 7.4. Preparation of Samples

The kit can be used on serum and plasma (obtained with Lithium-Eparine, Citrate or EDTA) samples. Do not use samples containing Sodium Azide.

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 analoga

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.

Important note: samples with high concentration of rheumatoid factor and human anti-mouse antibodies (HAMA) could give erroneous results. Samples with an expected PSA value higher than 12 ng/mL should be diluted with the "Cal 0 / Sample diluent" or reported as "> 12 ng/mL".

## Samples storage

If the assay is not performed immediately, the samples can be stored:

- 3 days at 2-8°C
- 7 days at -20°C

It's recommended to perform only 1 freezing and thawing cycle.

## 7.5. Preparation of the Wash Solution

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

The diluted wash solution is stable up to 2 weeks at room temperature (20-26°C).

## 7.6. Test 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 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	Controls
Calibrators C <sub>0</sub> -C <sub>5</sub>	25 µL		
Controls			25 µL
Sample		25 µL	
Assay Reagent	50 µL	50 µL	50 µL
Mix by moving plate on the table (10 sec); it's very important to mix completely the solution. Incubate 1 hour at room temperature (20-26°C).			
Enzyme Conjugate	50 µL	50 µL	50 µL
Mix by moving plate on the table (10 sec); it's very important to mix completely the solution. 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.			
Washing step: fill the wells with 300 µL of diluted wash solution, wait 10sec and then remove the solution; repeat this washing procedure for a total of 5 times. In the case you use an automatic plate washer, use 400 µL of diluted wash solution.			
<u>Important note:</u> sensitivity and precision of the assay strictly depend on the correct execution of the washing step.			

Substrate Solution	100 µL	100 µL	100 µL
Incubate 15 minutes at room temperature (20-26°C) in the dark.			
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL
Shake the microplate gently. Read the absorbance at 450 nm against a reference wavelength of 620-630 nm. It's recommended to read the microplate within 10 minutes after adding the Stop Solution.			

## 8. QUALITY CONTROL

Good laboratory practice requires that controls have to be run with each calibration curve.

A statistically significant number of controls should be assayed to establish mean values and acceptable ranges to assure proper performance.

It is recommended to use control samples according to the local active regulations to assure the day to day validity of results.

Use controls at both normal and pathological levels.

The controls and the corresponding results of the QC-Laboratory are stated in the Certificate of Analysis provided with the kit; these data always refer to the kit lot in use and should be used for direct comparison of the results.

It is also recommended to make use of national or international Quality Assessment programs in order to ensure the accuracy of the results.

Employ appropriate statistical methods for analyzing control values and trends. If the results of the assay do not fit to the established acceptable ranges of control materials patient results should be considered invalid.

## 9. CALCULATION OF RESULTS

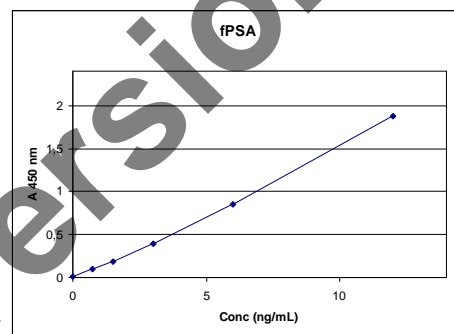
1. Calculate the mean absorbance for each duplicate.
2. Subtract the absorbance value of the Calibrator 0 from the mean absorbance values of Calibrators, control and samples.
3. Draw the calibration curve on lin-lin or log-log graph paper by plotting absorbance values of Calibrators against appropriate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

Samples with an expected PSA value higher than 12 ng/mL should be diluted with the "Cal 0 / Sample diluent" or reported as "> 12 ng/mL".

## 9.1. Example of Calibration curve

The following data are for example use only and must not be used in any case.

Wells	Identity	A 450 nm		Conc. ng/mL
1-2	Cal 0 ng/mL	0.011	0,009	
3-4	Cal 0.75 ng/mL	0.109	0.096	
5-6	Cal 1.5 ng/mL	0.185	0.179	
7-8	Cal 3 ng/mL	0.393	0.392	
9-10	Cal 6 ng/mL	0.871	0.837	
11-12	Cal 12 ng/mL	1.901	1.844	
13-14	Control LOw	0,218	0.231	2,05
15-16	Control High	1,009	0,989	7,80



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

## 10. EXPECTED VALUES LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

In a study performed with apparently healthy men, using the Dia.Metra Srl Free PSA kit the following data were observed:

Population	Uomini, sani
n° samples	120
Mean (ng/mL)	0,2
Median (ng/mL)	0,1
Percentile (ng/mL)	0,0 - 1,2
Range (ng/mL)	0,0 - 4,6

When total PSA values are between 4-10 ng/mL the ratio of free PSA / total PSA might be employed to increase the diagnostic specificity of PSA testing.

A ratio  $\leq 10\%$  indicates 49% to 65% risk of prostate cancer depending on age; a free/total PSA ratio  $> 25\%$  indicates a 9% to 16% risk of prostate cancer, depending on age. According to the American Cancer Society and National Cancer Institute men with f-PSA below 7 % should undergo biopsy (see reference 10).

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

The above values are only for user's guidance. It is recommended for each laboratory to establish its own specific values that take into consideration a population indigenous to the area where the laboratory is located.

**Note: PSA values and the free PSA / total PSA ratio 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. Assay range

The range of the assay is 0,095 - 12,0 ng/mL.

### 11.2. Analytical sensitivity

Analytical sensitivity has been investigated through the LoB (Limit of Blank), LoD (Limit of Detection), LoQ (limit of Quantitation) and Analytical Sensitivity (A.S.). The table below shows the results obtained.

	Results (ng/mL)
LoB	0,001
LoD	0,014
LoQ	0,095
A.S.	0,01

### 11.3. Analytical Precision

- Intra-assay (within assay)**

Intra-assay precision was determined by measuring each sample 10 times.

Patients	Number of replicates	Mean ng/mL	CV %
1	10	0,7	5,3
2	10	4,9	3,6
3	10	6,9	3,1
4	10	9,0	2,6

- Inter-assay (between assay)**

Inter-assay precision was determined by measuring each sample 10 times for 3 days.

Patients	Number of replicates	Mean ng/mL	CV %
1	30	0,7	10,0
2	30	4,6	8,0
3	30	6,5	6,8
4	30	8,3	6,3

- Inter-lot (between lot)**

Inter-lot precision was determined by measuring each sample 6 times with 3 different lots.

Patients	Number of replicates	Mean ng/mL	CV %
1	18	0,7	5,4
2	18	1,5	6,1
3	18	4,7	6,4
4	18	8,6	7,6

### 11.4. Accuracy

- Recovery**

4 samples were prepared by adding aliquots of samples with known free PSA concentration. The recovery (%) was calculated as percentage ratio between measured values and expected values.

	Sample			
	1	2	3	4
Conc (ng/mL)	1,4	1,9	3,8	4,9
Average (%)	88,8	92,5	88,5	92,9
Recovery	from	87,8	89,5	86,9
	to	89,9	95,4	90,1

- Linearity**

4 samples were measured undiluted and diluted with Calibrator 0. Recovery (%) was calculated as percentage ratio between measured values and expected values.

	Sample			
	1	2	3	4
Conc (ng/mL)	1,43	2,65	4,30	10,92
Average (%)	100,5	94,1	104,1	108,2
Recovery	from	88,6	87,5	98,6
	to	107,9	98,1	107,4

### 11.5. Analytical Specificity

- Endogenous interfering substances**

Interferences by Triglycerides, Bilirubin and Hemoglobin have been investigated by adding the interfering substance (at different concentration) to a serum sample and by comparing its concentration to the unspiked sample. 4 samples were investigated.

The interference has been evaluated as "significant" if it causes a concentration bias >10% between spiked and unspiked sample.

The table below shows the results obtained:

Substance	Concentration	Interference
Trigliceridi	7,5 mg/mL	No
Bilirubina	0,5 mg/mL	No
Emoglobina	4 mg/mL	No

Conclusion: the study showed no interference in the assay by the aforementioned substances. It's anyway recommended to avoid using highly lipemic or hemolyzed samples.

- **Cross-reactivity**

The following substances have been tested for cross-reactivity of the assay:

Substance	Concentration (ng/mL)	Cross-reactivity (%)
AFP	193,6	0,0
CEA	100,0	0,0
b-HCG	21,8	0,0
Kallikrein	1200,0	0,0
Rheumatic Factor	1200,0	0,0
HAMA	1200,0	0,0

Conclusion: according to the stated specifications, no one of the tested substances have interference with the assay at the concentrations stated.

- **Drug interferences**

Interferences by the substances listed below have been investigated by adding the interfering substance (at different concentration) to a serum sample and by comparing its concentration to the unspiked sample. 4 samples were investigated.

The interference has been evaluated as "significant" if it causes a concentration bias >15% between spiked and unspiked sample.

The table below shows the results obtained:

Cytostatic drugs	Conc. tested (µg/mL)
Carboplatin	700
Cisplatin	200
Calcium Folate	2,3
Cyclophosphamide	550
Fluorouracil	520
Dexamethasone	11
Paclitaxel	5,3
Doxorubicin • HCl	72

Hypertension drugs	Conc. tested (µg/mL)
Simvastatin	0,1
Irbesartan	1,5
Sildenafil Citrate	5,0
Furosemide	0,2

Antimicrobial agent	Conc. tested (µg/mL)
Benzalkonium Chloride	0,5

Conclusion: according to the stated specifications, no one of the tested drugs have interference with the assay at the concentrations stated.

### 11.6. Hook effect

No hook effect has been observed up to 240 ng/mL of f-PSA added to the sample.

### 11.7. Study on plasma samples

Plasma samples obtained using Lithium-heparin, Citrate and EDTA were investigated.

The result of the resulting plasma assay obtained has been compared with the result of the assay obtained on the serum taken from the same patient from which the plasma has been obtained (% recovery).

A difference in serum - plasma concentration <20% has been considered acceptable.

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

Results:

Plasma	Interference
Lithium-eparin	No
Citrate	No
EDTA	No

Diametra Free PSA assay can be performed on serum and plasma (Lithium-heparin, Citrate and EDTA) samples.

### 11.8. Specificity and clinical sensitivity

The diagnostic performances for the Free PSA kit can not be calculated in relation to the "free PSA" molecule because there is no threshold value as in the case of total PSA.

For the estimate of the risk of prostate cancer, the ratio between free PSA and total PSA refers, therefore no analysis can be made in relation to positive and negative samples knowing only the value of free PSA without knowing the total PSA value.

### 11.9. Correlation

The present updated free PSA kit was compared to the previous version of the product.

The linear regression curve is the following:

$$Y = 0,928 \cdot X + 0,021$$

$$R^2 = 0,939$$

## 12. WASTE MANAGEMENT

Reagents must be disposed off in accordance with local regulations.

## 13. LEGAL ASPECTS

### 13.1. 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.

### 13.2. Therapeutic Consequences

Therapeutic consequences should never be based on laboratory results alone even if all test results are in agreement with the items as stated under previous point 13.1. Any laboratory result is only a part of the total clinical picture of a patient.

Only in cases where the laboratory results are in acceptable agreement with the overall clinical picture of the patient should therapeutic consequences be derived. The test result itself should never be the sole determinant for deriving any therapeutic consequences.

### 13.3. Liability

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

Claims submitted due to customer misinterpretation of laboratory results subject to previous point 13.2. are also invalid. Regardless, in the event of any claim, the manufacturer's liability is not to exceed the value of the test kit. Any damage caused to the test kit during transportation is not subject to the liability of the manufacturer.

### 14. BIBLIOGRAPHY

1. World Cancer Report. World Health Organization. 2014. Chapter 5.11 ISBN 978-9283204299
2. Henttu P and Vihko P. Prostate-specific antigen and human glandular kallikrein: two kallikreins of the human prostate. *Amm Med* 1994, 26(3):157-64.
3. Balk SP, Ko YL and Bublely GJ. Biology of prostate-specific antigen. *J Clin Oncol.* 2003, 15;21(2):383-91.
4. Zhou AM et al. Multiple forms of prostate-specific antigen in serum: differences in immunorecognition by monoclonal and polyclonal assays. *Clin Chem.* 1993, 39(12):2483-91.
5. Fritsche HA and Babalan RJ. Analytical performance goals for measuring prostate-specific antigen. *Clin Chem*, 1993, 39: 1529-1529.
6. Velonas VM, Woo HH, dos Remedios CG, Assinder SJ. Current status of biomarkers for prostate cancer. *Int J Mol Sci.* 2013, 24;14(6):11034-60.
7. Gion M et al. Percent free prostate-specific antigen in assessing the probability of prostate cancer under optimal analytical conditions. 1998, *Clin Chem* 44(12):2462-70.
8. Akdas et al. The role of free prostate specific antigen in the diagnosis of prostate cancer. *British J Urol*,1997, 79: 920-923.
9. Chen YT et al. Using proportions of free to total prostate-specific antigen, age, and total prostate-specific antigen to predict the probability of prostate cancer. *Urology*, 1996, 47(4):518-24.
10. Catalona et al. Use of the percentage of free prostate-specific antigen to enhance differentiation of prostate cancer from benign prostatic disease: a prospective multicenter clinical trial. *JAMA*, 1998, 20;279(19):1542-7.
11. Liu J et al. Establishment of two new predictive models for prostate cancer to determine whether to require prostate biopsy when the PSA level is in the diagnostic gray zone (4-10 ng ml<sup>-1</sup>). *Asian J Androl.* 2019 21:1-4.
12. Huang Y, Li ZZ, Huang YL, Song HJ, Wang YJ. Value of free/total prostate-specific antigen (f/t PSA) ratios for prostate cancer detection in patients with total serum prostate-specific antigen between 4 and 10 ng/mL: A meta-analysis. *Medicine (Baltimore).* 2018; 97(13).
13. Duffy MJ. Biomarkers for prostate cancer: prostate-specific antigen and beyond. *Clin Chem Lab Med.* 2019, 12. aop.
14. Carlsson SV and Roobol MJ. Improving the evaluation and diagnosis of clinically significant prostate cancer in 2017. *Curr Op in Urol.* 2017 27(3): 198–204.
15. Milford Ward A et al. Prostate specific antigen: biology, biochemistry and available commercial assays. *Ann Clin Biochem*, 2001, 38: 633-651.
16. Price CP et al., Pre-and post-analytical factors that may influence use of serum prostate specific antigen and its isoforms in a screening program for prostate cancer. *Ann Clin Biochem*, 2001, 38: 188-216.
17. Ferguson J et al. Continued provision of WHO International Standards for total and free PSA: Content and commutability of replacement preparations. *Clin Biochem.* 2019 71:58-66.

Ed. 04/2020

DCM138-6

### Legal Manufacturer

Dia.Metra S.r.l.  
Via Pozzuolo 14  
06038 SPELLO (PG) Italy  
Tel. +39-0742-24851  
Fax +39-0742-316197  
E-mail: [info@diametra.com](mailto:info@diametra.com)

## Free PSA

para análisis diagnóstico

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

IVD



LOT

Ver etiqueta externa

2°C 8°C



Σ = 96 test

REF DKO138

### USO PREVISTO

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

### 1. IMPORTANCIA CLINICA

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

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

En el 1979, Wang et al. Aislaron un antígeno específico y lo llamaron PSA. El PSA es una serina-proteasa de 33kDa. Como quedó demostrado por estudios inmunohistológicos el PSA se localiza en el citoplasma de las células prostáticas, en el epitelio del ducto y en la secreción de la lamina ductal, todos tejidos normales de la próstata así como en los tejidos hiperplásicos benignos o malignos y en el cáncer metastáticos. Si la integridad estructural de la próstata se altera y/o las dimensiones de la glándula aumentan, la cantidad de PSA circulante se puede elevar. En la circulación sanguínea la mayor parte de la PSA forma complejos con inhibidores de las proteinasas. Solo una pequeña fracción de la PSA circula como PSA libre inactiva. Fundamentalmente se pueden distinguir tres principales formas de PSA, dos de las cuales son inmuno reactivas: la forma predominante es un complejo con la  $\alpha_1$ -antiquimiotripsina (ACT-PSA) y la PSA libre que representa entre el 10-40% de la PSA inmunológicamente detectable. La cantidad total de la PSA inmunoreactiva se conoce como PSA total (t-PSA).

La PSA unida a la  $\alpha_2$ -macroglobulina no puede ser detectada por los análisis inmunológicos y por lo tanto se le llama frecuentemente PSA oculta (o-PSA). Las metodologías actuales de tamizaje del cáncer prostático utilizan la detección de la t-PSA, niveles de 4,0ng/mL o mayores son fuertes indicadores de la probabilidad de un carcinoma prostático y dirigen hacia otros exámenes clínicos de seguimiento. Elevados niveles séricos de PSA pueden ser también causados por hiperplasias benignas que provocan un elevado porcentaje de falsos positivos en los procedimientos de tamizaje. Una posible solución a este problema implica la determinación de los niveles de PSA libre. Algunos estudios sugirieron que los niveles de PSA libre son mas bajos en los pacientes con cáncer prostático de los niveles en pacientes con hiperplasia prostática benigna. Por lo tanto la medición de la PSA libre en conjunto con la PSA total puede mejorar la especificidad del tamizaje del cáncer de la próstata en los hombres con elevados niveles de PSA total, lo cual permitiría reducir el número de biopsias prostáticas innecesarias con efectos mínimos sobre la tasa de incidencia del cáncer.

### 2. PRINCIPIO DEL METODO

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

### 3. REACTIVOS, MATERIALES E INSTRUMENTACION

#### 3.1. Reactivos y materiales provistos en el kit

1. PSA Calibradores (6 frascos, 0.5 mL cada uno)  
CAL0/diluyente de muestra(10 mL) REF DCE002/13806-0  
CAL1 REF DCE002/13807-0  
CAL2 REF DCE002/13808-0  
CAL3 REF DCE002/13809-0  
CAL4 REF DCE002/13810-0  
CAL5 REF DCE002/13811-0

Contienen conservante sin mercurio.

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

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

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

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

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

6. 40X Solución de lavado (1 frasco, 30 mL)  
Diluir con agua destilada ante de usarse.  
REF DCE057/13857-0

7. Sustrato Solution (1 frasco, 14 mL)  
Contiene TMB (tetramethylbenzidine) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
REF DCE004/13804-0

8. Solución de Parada (1 frasco, 14 mL)  
Contiene ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) (evitar el contacto, puede causar irritación y quemaduras)  
REF DCE005/13805-0

#### 3.2. Reactivos necesarios no incluidos en el Kit

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

#### 3.3. Material e instrumentación auxiliares

- Lavador microplacas
- 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 medico 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 reactivos deben manipularse como material potencialmente infeccioso.
- Debido al carácter potencialmente infeccioso de las muestra y de los componentes del kit, todos los desechos deberán manejarse según la normativa que la autoridad sanitaria local disponga al respecto. Esto también incluye residuos líquidos.
- Los reactivos de kit contienen conservantes, TMB, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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. Asegúrese de estar utilizando la revisión actual y válida de las 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 (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 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.
- Úsele 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 2 meses a 2-8°C.

## 7. PROCEDIMIENTO

### 7.1. Preparación de los Calibradores y Controles

Los Calibradores han sido calibrados contra el WHO NIBSC 17/102 y tienen las siguientes concentraciones:

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

Calibradores y Controles están listos para su uso.

### 7.2. Preparación del Conjugado

El reactivo "Enzyme Conjugado" está listo para usar.

### 7.3. Preparación del Reactivo de ensayo ("Assay reagent")

El reactivo "Assay reagent" está listo para usar.

### 7.4. Preparación de la muestra

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

No use muestras que contengan azida de sodio.

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 hemolisis y mejorar la estabilidad del PSA.

Nota importante: las muestras que contienen altos recuentos de factores reumatoides y anticuerpos humanos anti-ratón (HAMA) pueden dar resultados erróneos.

Las muestras con un valor de PSA superior de 12 ng/mL deben ser diluidas con el reactivo "Cal 0 / Diluyente de muestra" o informadas como "> 12 ng/mL".

### Conservación de las muestras

Si el ensayo no se realiza de inmediato, las muestras se pueden almacenar:

- 3 días a 2-8°C
- 7 días a -20°C

Se recomienda realizar solo un ciclo de congelación-descongelación en las muestras.

### 7.5. Preparación de la solución de lavado

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

La solución de lavado diluida es estable durante 2 semanas a temperatura ambiente (20-26°C).

### 7.6. Procedimiento

- **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 C <sub>0</sub> -C <sub>5</sub>	25 µL		
Control			25 µL
Muestra		25 µL	
Reactivo de ensayo	50 µL	50 µL	50 µL
Mezclar bien agitando con movimientos rotativos la placa sobre la mesa de trabajo. (10 sec). Incubar 1 hora a temperatura ambiente (20-26°C).			
Enzyme Conjugate	50 µL	50 µL	50 µL

Mezclar bien agitando con movimientos rotativos la placa sobre la mesa de trabajo. (10 sec).  
Incubar 1 hora a temperatura ambiente (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 lenando los pozos con 300 µL de solución de lavado diluida durante 10 segundos y luego descartar, repetir el lavado 4 veces (por un total de 5 veces).

Si utiliza una lavadora de placas automática, utilice 400 µL de solución de lavado diluida.

**Nota importante:** la sensibilidad y precisión del kit están fuertemente influenciadas por la correcta ejecución del procedimiento de lavado.

Sustrato Solution	100 µL	100 µL	100 µL
-------------------	--------	--------	--------

Incuba 15 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 630nm).  
Se recomienda leer la microplaca dentro de los 10 minutos posteriores a la adición de la solución de parada.

## 8. CONTROL DE CALIDAD

Las buenas prácticas de laboratorio requieren que se realicen verificaciones con cada curva de calibración.

Se debe analizar un número estadísticamente significativo de controles para establecer valores y rangos promedio aceptables y, por lo tanto, garantizar el rendimiento adecuado del kit.

Se recomienda utilizar muestras de control de acuerdo con la normativa local vigente para garantizar la validez diaria de los resultados.

Use los controles tanto a nivel normal como patológico.

Los controles y los resultados correspondientes del laboratorio de control de calidad se indican en el Certificado de Análisis presente en cada kit; estos siempre se refieren al lote del kit en uso y deben usarse para la comparación directa de los resultados.

También se recomienda utilizar programas de evaluación de calidad nacionales e internacionales para garantizar la precisión de los resultados.

Utilice métodos estadísticos apropiados para el análisis de valores de control y tendencias. Si los resultados de la prueba no se ajustan a las especificaciones aceptables establecidas de los materiales de control, estos resultados deben considerarse inválidos.

## 9. CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

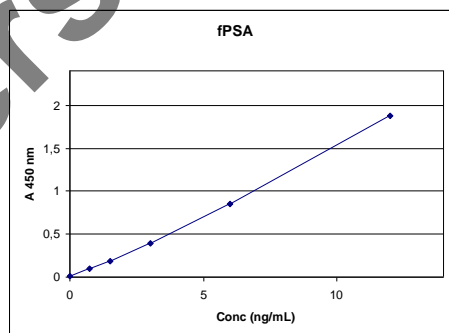
1. Calcular la absorbancia promedio de cada duplicado.
2. Restar el valor de absorbancia del Calibrador cero de las absorbancia de los Calibradores, controles y muestras.
3. Plotear la curva de los Calibradores en papel Linear-Linear o Log-Log (ABS versus Concentración), si dispone de un software de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

Las muestras con un valor de PSA superior de 12 ng/mL deben ser diluidas con el reactivo "Cal 0 / Diluyente de muestra" o informadas como "> 12 ng/mL".

### 9.1. Ejemplo de una curva de calibración

Los siguientes datos son solo para fines de ejemplo y no deben usarse de ninguna manera.

Pozo	Contenido	A 450 nm		Conc. ng/mL
1-2	Cal 0 ng/mL	0,011	0,009	/
3-4	Cal 0.75 ng/mL	0,109	0,096	/
5-6	Cal 1.5 ng/mL	0,185	0,179	/
7-8	Cal 3 ng/mL	0,393	0,392	/
9-10	Cal 6 ng/mL	0,871	0,837	/
11-12	Cal 12 ng/mL	1,901	1,844	/
13-14	Control Low	0,218	0,231	2,05
15-16	Control High	1,009	0,989	7,80



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

## 10. VALORES ESPERADOS Y LIMITACIONES DEL TEST

Los siguientes resultados se observaron en un estudio realizado en 120 hombres aparentemente sanos usando el kit Dia.Metra Srl Free PSA:

Población	Hombres sanos
n° muestras	120
Promedio (ng/mL)	0,2
Mediana (ng/mL)	0,1
Percentil (ng/mL) (2,5th - 97,5th)	0,0 - 1,2
Rango de valores (ng/mL)	0,0 - 4,6

Con valores de PSA total entre 4-10 ng/mL la relación entre free PSA / total PSA se puede utilizar para aumentar la especificidad diagnóstica del test de la PSA.

Una relación de f-PSA/t-PSA ≤10% indica un riesgo de cáncer de próstata entre 49% y 65%, dependiendo de la edad; una relación de f-PSA/t-PSA >25% indica un riesgo

de cáncer de próstata entre 9% y 16%, dependiendo de la edad

Según la American Cancer Society e il National Cancer Institute, hombres con valore de f-PSA del 7% o menos deben ser sometidos a biopsia (ver referencia 10).

**Notese que un valor aislado de concentración de free PSA no tiene ningún valor diagnóstico.**

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

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

## 11. CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

### 11.1. Assay range (Intervalo de dosaggio)

L'intervalo de dosaggio del kit es 0,095 - 12,0 ng/mL.

### 11.2. Sensibilidad Analítica

La sensibilidad analítica se ha estudiado investigando el LoB (Límite de blanco), LoD (Límite de detección), LoQ (Límite de cuantificación) y la sensibilidad analítica (A.S.). La siguiente tabla muestra los resultados obtenidos.

	Resultados (ng/mL)
LoB	0,001
LoD	0,014
LoQ	0,095
A.S.	0,01

### 11.3. Precisión analítica

- Whitin assay (intra-ensayo)**

La precisión intra-ensayo se determinó midiendo cada muestra 10 veces.

Paciente	Replicad.	Media ng/mL	CV %
1	10	0,7	5,3
2	10	4,9	3,6
3	10	6,9	3,1
4	10	9,0	2,6

- Between assay (inter-ensayo)**

La precisión inter-ensayo se determinó midiendo cada muestra 10 veces durante 3 días.

Paciente	Replicad.	Media ng/mL	CV %
1	30	0,7	10,0
2	30	4,6	8,0
3	30	6,5	6,8
4	30	8,3	6,3

- Between lot (inter-lot)**

La precisión inter-lot se determinó midiendo cada muestra 6 veces con 3 lotes de kits diferentes.

Paciente	Replicad.	Media ng/mL	CV %
1	18	0,7	5,4
2	18	1,5	6,1
3	18	4,7	6,4
4	18	8,6	7,6

### 11.4. Exactitud

- Recuperacion**

Se enriquecieron 4 muestras con la adición de soluciones que contenían PSA libre con concentraciones conocidas. La recuperación (%) se calculó como una relación porcentual entre los valores medidos y esperados.

	Muestras				
	1	2	3	4	
Conc. (ng/mL)	1,4	1,9	3,8	4,9	
Promedio recup. (%)	88,8	92,5	88,5	92,9	
Recuperacion	De	87,8	89,5	86,9	86,8
	A	89,9	95,4	90,1	97,6

- Linealidad**

Se analizaron 4 muestras sin diluir y en diluciones en serie con Calibrator 0. La recuperación (%) se calculó multiplicando la proporción porcentual entre los valores esperados y los valores medidos.

	Muestras				
	1	2	3	4	
Conc. (ng/ml)	1,43	2,65	4,30	10,92	
Promedio (%)	100,5	94,1	104,1	108,2	
Recuperacion	De	88,6	87,5	98,6	98,4
	A	107,9	98,1	107,4	115,0

### 11.5. Especificidad analítica

- Sustancias interferentes endógenas**

Las interferencias para la bilirrubina, la hemoglobina y los triglicéridos se estudiaron agregando la sustancia interferente a diferentes concentraciones a la muestra de suero, y comparando su concentración con la muestra sin llenar.

Se analizaron 4 muestras diferentes.

La interferencia se evaluó como "significativa" si causa una diferencia de concentración > 10% entre la muestra cargada y la no llena.

La siguiente tabla muestra los resultados obtenidos:

Sustancia	Concentración	Interferencia
Triglicéridos	7,5 mg/mL	No
Bilirrubina	0,5 mg/mL	No
Hemoglobina	4 mg/mL	No

Conclusión: no hay interferencia significativa de la bilirrubina, la hemoglobina y los triglicéridos en la concentración analizada.

Sin embargo, como buena práctica de laboratorio, recuerde no utilizar muestras altamente lipémicas o hemolizadas.

- **Reactividad cruzada**

Se han analizado las siguientes sustancias:

Sustancia	Concentración (ng/mL)	Reactividad cruzada (%)
AFP	193,6	0,0
CEA	100,0	0,0
b-HCG	21,8	0,0
Kallikrein	1200,0	0,0
Rheumatic Factor	1200,0	0,0
HAMA	1200,0	0,0

- **Interferencia de medicamentos**

Las interferencias para los medicamentos indicados a continuación se estudiaron agregando el medicamento a diferentes concentraciones a la muestra de suero y comparando su concentración con la muestra sin llenar. Se analizaron 4 muestras diferentes.

La interferencia se evaluó como "significativa" si causa una diferencia de concentración > 15% entre la muestra cargada y la no llena.

La siguiente tabla muestra los medicamentos analizados:

Medicamentos citostáticas	Conc. (µg/mL)
Carboplatin	700
Cisplatin	200
Calcium Folate	2,3
Cyclophosphamide	550
Fluorouracil	520
Dexamethasone	11
Paclitaxel	5,3
Doxorubicin • HCl	72

Medicamentos para la hipertensión	Conc. (µg/mL)
Simvastatin	0,1
Irbesartan	1,5
Sildenafil Citrate	5,0
Furosemide	0,2

Medicamentos antimicrobianas	Conc. (µg/mL)
Benzalkonium Chloride	0,5

Según las concentraciones indicadas, ningún fármaco ha dado interferencia.

### 11.6. Efecto Hook

No ha sido observado efecto hook con muestras con concentraciones hasta 240 ng/mL.

### 11.7. Estudio en muestras de plasma

Se investigaron 8 muestras de plasma obtenidas con heparina de litio, 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%.

Resultados:

Plasma	Interferencia
Heparina litio-plasma	No
Citrato-plasma	No
EDTA-plasma	No

### 11.8. Especificidad y sensibilidad clínica

Los Especificidad y sensibilidad clínica para el kit de PSA libre no se pueden calcular en relación con la molécula de "PSA libre" porque no hay un valor umbral como en el caso del PSA total.

Para la estimación del riesgo de cáncer de próstata, debe ser considerado la relación entre PSA libre y PSA total se refiere, y, por lo tanto, no se puede hacer un análisis en relación con muestras positivas y negativas que conozcan solo el valor de PSA libre sin conocer el valor total de PSA.

### 11.9. Correlación

El nuevo kit Dia.Metra Srl Free PSA ELISA ha sido comparado contra el kit anterior.

La curva de regresión lineal es la siguiente:

$$Y = 0,928 * X + 0,021$$

$$R^2 = 0,939$$

## 12. INDICACIONES PARA LA ELIMINACIÓN

Eliminar los reactivos conforme con la normativa local sobre la materia.

## 13. ASPECTOS LEGALES

### 13.1. 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 Dia.Metra.

### 13.2. Decisiones terapéuticas

Las decisiones terapéuticas jamás deben basarse únicamente sobre los resultados de laboratorio, aun si todos los resultados cumplen con lo especificado en el punto 13.1. El resultado del laboratorio es solamente una

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

### 13.3. Responsabilidad

Cualquiera modificación del Kit y/o el intercambio o mezcla de componentes de lotes distintitos de un kit a otro pueden modificar los resultados esperados y la validez en general del ensayo. Tales modificaciones y/o intercambio anulan cualquier solicitud de sustitución y/o reposición. Los reclamos debidos a una equivocada interpretación de los resultados de laboratorio por parte de los clientes según indicado en el punto 13.2. tampoco son validos. Independientemente de lo anterior in caso de cualquier reclamo, la responsabilidad del fabricante no supera el valor del kit. Daños provocados al kit durante el transporte no son responsabilidad del fabricante.

### 14. BIBLIOGRAFIA

1. World Cancer Report. World Health Organization. 2014. Chapter 5.11 ISBN 978-9283204299
2. Henttu P and Vihko P. Prostate-specific antigen and human glandular kallikrein: two kallikreins of the human prostate. *Amm Med* 1994, 26(3):157-64.
3. Balk SP, Ko YL and Bubley GJ. Biology of prostate-specific antigen. *J Clin Oncol*. 2003, 15;21(2):383-91.
4. Zhou AM et al. Multiple forms of prostate-specific antigen in serum: differences in immunorecognition by monoclonal and polyclonal assays. *Clin Chem*. 1993, 39(12):2483-91.
5. Fritsche HA and Babalan RJ. Analytical performance goals for measuring prostate-specific antigen. *Clin Chem*, 1993, 39: 1529-1529.
6. Velonas VM, Woo HH, dos Remedios CG, Assinder SJ. Current status of biomarkers for prostate cancer. *Int J Mol Sci*. 2013, 24;14(6):11034-60.
7. Gion M et al. Percent free prostate-specific antigen in assessing the probability of prostate cancer under optimal analytical conditions. 1998, *Clin Chem* 44(12):2462-70.
8. Akdas et al. The role of free prostate specific antigen in the diagnosis of prostate cancer. *British J Urol*, 1997, 79: 920-923.
9. Chen YT et al. Using proportions of free to total prostate-specific antigen, age, and total prostate-specific antigen to predict the probability of prostate cancer. *Urology*, 1996, 47(4):518-24.
10. Catalona et al. Use of the percentage of free prostate-specific antigen to enhance differentiation of prostate cancer from benign prostatic disease: a prospective multicenter clinical trial. *JAMA*, 1998, 20;279(19):1542-7.
11. Liu J et al. Establishment of two new predictive models for prostate cancer to determine whether to require prostate biopsy when the PSA level is in the diagnostic gray zone (4-10 ng ml<sup>-1</sup>). *Asian J Androl*. 2019 21:1-4.
12. Huang Y, Li ZZ, Huang YL, Song HJ, Wang YJ. Value of free/total prostate-specific antigen (f/t PSA) ratios for prostate cancer detection in patients with total serum prostate-specific antigen between 4 and 10 ng/mL: A meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2018; 97(13).
13. Duffy MJ. Biomarkers for prostate cancer: prostate-specific antigen and beyond. *Clin Chem Lab Med*. 2019, 12. aop.
14. Carlsson SV and Roobol MJ. Improving the evaluation and diagnosis of clinically significant prostate cancer in 2017. *Curr Op in Urol*. 2017 27(3): 198–204.
15. Milford Ward A et al. Prostate specific antigen: biology, biochemistry and available commercial assays. *Ann Clin Biochem*, 2001, 38: 633-651.
16. Price CP et al., Pre-and post-analytical factors that may influence use of serum prostate specific antigen and its isoforms in a screening program for prostate cancer. *Ann Clin Biochem*, 2001, 38: 188-216.
17. Ferguson J et al. Continued provision of WHO International Standards for total and free PSA: Content and commutability of replacement preparations. *Clin Biochem*. 2019 71:58-66.

Ed. 04/2020

DCM138-6

### Legal Manufacturer

Dia.Metra S.r.l.  
Via Pozzuolo 14,  
06038 SPELLO (PG) Italy  
Tel. +39-0742-24851  
Fax +39-0742-316197  
E-mail: [info@Diametra.com](mailto:info@Diametra.com)

<b>DiaMetra</b>	<b>Packaging Information Sheet</b>	<b>Mod. PIS000-1</b>
-----------------	------------------------------------	----------------------

	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	<b>LOT</b>	DE Chargenbezeichnung ES Código de lote FR Numero de lot GB Batch code IT Codice del lotto PT Código 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	<b>CONT</b>	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	<b>REF</b>	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

**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