


# EIAgen PSA Equi Kit

**REF** LI4027C

 96 tests








**Adaltis Italia S.p.A.**  
Via Cristoni, 12  
40033 Casalecchio di Reno – (BO) Italy  
Tel. +39-051-6136511 – Fax + 39-051-575280  
www.adaltis.com

**FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE ONLY** 

Store at 2...8 °C



## SYMBOLS USED ON LABELS

<b>MTPLATE</b>	microplate
<b>CONJ HRP 20x</b>	HRP Conjugate Concentrate
<b>BIOTIN Anti-PSA</b>	Biotin Anti-PSA
<b>CAL0</b>	Calibrator 0
<b>CAL1</b>	Calibrator 1
<b>CAL2</b>	Calibrator 2
<b>CAL3</b>	Calibrator 3
<b>CAL4</b>	Calibrator 4
<b>CAL5</b>	Calibrator 5
<b>CONTROL1</b> <b>CONTROL2</b>	Controls
<b>SOLN TMB</b>	TMB substrate
<b>SOLN STOP</b>	Stop solution
<b>WASH BUF 25X</b>	washing buffer concentrate
<b>LOT</b>	Lot number
<b>REF</b>	Catalogue Code
	Expiry date (Use by...)
 8°C	Temperature limitation (store at 2...8°C)
	Number of tests
	Keep away from sunlight
	Manufactured by
	Attention, See Instructions For Use
<b>IVD</b>	In vitro diagnostic medical device (In vitro diagnostic use)
	Biological risks (see SECTION 7- Warnings and Precautions).

### 1.0 INTENDED USE

The EIAgen PSA Equi KIT is intended for the quantitative determination of Total Prostate Specific Antigen (PSA) in human serum.

### 2.0 SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

PSA is a 32 kDa single chain glycoprotein serine protease with a chymotrypsin like specificity produced by the secretory epithelium of the prostate gland (1). PSA is normally secreted into the seminal fluid and plays a functional role in the cleavage of the seminal vesicle proteins and the liquefaction of the seminal coagulum (2).

Only low levels of PSA are normally present in the blood stream, and increasing serum concentrations indicate prostatic pathology, including benign prostatic hyperplasia (BPH) and cancer of the prostate (PCa). Determination of PSA is now widely used for detection and management of patients with prostatic cancer and considered as the superior serological marker for cancer of the prostate (3,8).

PSA has been shown to form stable complexes with different antiproteases and the dominating portion of PSA in patient serum occurs in complex with alfa1-antichymotrypsin (PSA-ACT) (4). However there are large variations in the relation between total PSA and PSA-ACT complex between different individuals.

Studies have also indicated that the proportion of free PSA is higher in benign prostatic disease as compared to prostatic cancer (5). The antibodies in the EIAgen PSA Equi kit have been carefully evaluated and selected to give the same molar response for free PSA as for the PSA-ACT complex (7). The EIAgen PSA Equi KIT thus gives a true "total" PSA value independent of the individual variations of free and ACT complexed PSA.

### 3.0 PRINCIPLE OF THE TEST

The EIAgen PSA Equi kit is a solid-phase, non-competitive immunoassay based upon the direct sandwich technique. Calibrators, controls and patient samples are incubated together with biotinylated anti-PSA monoclonal antibody and horseradish peroxidase (HRP) labelled tracer in Streptavidin coated microtiter strips. After washing, buffered Substrate/Chromogen reagent (hydrogen peroxide and 3, 3', 5, 5' tetra - methylbenzidine) is added to each well and the enzyme reaction is allowed to proceed. During the enzyme reaction a blue colour will develop if antigen is present. The intensity of the colour (Optical Density OD) is proportional to the amount of PSA present in the samples. The colour intensity is determined in a microtiter plate photometer at 620 nm (or optionally at 405 nm after addition of Stop Solution). Calibration curves are constructed for each assay by plotting OD value versus the concentration for each calibrator. The PSA concentrations of patient samples are then read from the calibration curve.

### 4.0 CONTENT OF THE KIT

#### 4.1 MICROPLATE (code 30PIA)

1 microplate of 12 strips of 8 breakable wells. The wells are coated with streptavidin. After opening, immediately return unused strips to the aluminium pouch, containing desiccant. Reseal carefully to keep dry.

#### 4.2 CONJUGATE (code 30HRP)

1 vial containing 0,75 mL of Stock solution (20x concentrate) of HRP conjugated to Anti-PSA monoclonal antibody from mouse, approximately 20 µg/mL. Contains preservatives.

To be mixed with Biotin Anti- PSA prior to use.

**Preparation of Conjugate (HRP- Anti-PSA) working solution:** Prepare the required quantity of conjugate working solution by mixing 50 µL of conjugate 20x concentrate with 1 mL of Biotin Anti- PSA per strip (see table below).

N° of strips	CONJUGATE µl	Biotin Anti- PSA mL
1	50	1
2	100	2
3	150	3
4	200	4
5	250	5
6	300	6
7	300	7
8	400	8
9	450	9
10	500	10
11	550	11
12	600	12

Be sure to use a clean plastic or glass bottle for preparation of the Conjugate working solution.

**Alternative:** Pour the content of the Conjugate 20x concentrate, into the vial of Biotin Anti- PSA and mix gently. Make sure that all of the Conjugate is transferred to the vial of Biotin Anti- PSA.

**STORAGE:** the Conjugate working solution is stable for 3 weeks at 2–8°C in a sealed container. Do not prepare more Conjugate working solution than will be used within this period and make sure that it is stored properly.

#### 4.3 BIOTIN Anti PSA (code 30BT) BIOTIN|Anti-PSA

1 vial containing 15 mL of Biotin labelled Anti-PSA monoclonal antibody from mouse, approximately 1 µg/mL. Contains phosphate buffered saline (pH 7.2), bovine serum albumin, bovine immunoglobulin, blocking agents, Tween 20, an inert blue dye and 0.01% methyl-isothiazolone (MIT) as preservative.  
Ready to use.

#### 4.4 CALIBRATORS

6 vials containing 0.75 mL of calibrator. The calibrators contain Human PSA in a Tris-HCl buffered salt solution containing bovine serum albumin, an inert yellow dye and 0.01% methyl-isothiazolone (MIT) as preservative.  
Ready for use.

Calibrator	symbol	code	concentration
Calibrator 0	<span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">CAL0</span>	30CAL0	0 µg/L
Calibrator 1	<span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">CAL1</span>	30CAL1	1 µg/L
Calibrator 2	<span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">CAL2</span>	30CAL2	2 µg/L
Calibrator 3	<span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">CAL3</span>	30CAL3	10 µg/L
Calibrator 4	<span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">CAL4</span>	30CAL4	30 µg/L
Calibrator 5	<span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">CAL5</span>	30CAL5	60 µg/L

#### Reference material

The 1st International Standard 96/670 may be used as a reference standard. Values for PSA Calibrators and Controls were assigned against a set of in-house reference standards whose values are traceable to the 1st International Standard.

#### 4.5 CONTROLS

Control	symbol	code	
Control 1	<span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">CONTROL1</span>	30CTRL1	1 vial of 0.75 ml
Control 2	<span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">CONTROL2</span>	30CTRL2	1 vial of 0.75 ml

Each control contains Human PSA in a Tris-HCl buffered salt solution containing bovine serum albumin, and 0.01% methylisothiazolone (MIT) as preservative.  
Ready for use.

#### 4.6 TMB-SUBSTRATE (code TMBB) SOLN|TMB

1 vial containing 12 mL of ready-to-use Hydrogen peroxide and 3,3',5,5' tetra-methylbenzidine (TMB) .  
Ready to use.

#### 4.7 STOP SOLUTION (code STOPB) SOLN|STOP

1 vial containing 15 mL of 0.12 M hydrochloric acid.  
Ready to use.

#### 4.8 WASHING BUFFER 25X (code TLAVB) WASH|BUF|25X

1 bottle containing 50 mL of wash buffer concentrate. Wash buffer concentrate contains a Tris-HCl buffered salt solution with Tween 20. contains German II as preservative.

**Preparation of Wash Buffer working solution:** Pour the 50 mL Washing Buffer Concentrate into a clean container and dilute 25-fold by adding 1200 mL of distilled or deionised water to give a Wash Buffer working solution.

**STORAGE:** the stability of diluted wash buffer is 2 weeks at 2-25°C in a sealed container.

#### 5.0 STORAGE AND STABILITY AFTER THE FIRST OPENING

- Store kit components at 2...8° C and do not use after the reported expiry date.
- After use, the microplate should be resealed, the bottle caps replaced and tightened and the kit stored at 2...8°C.
- The opened kit should be used within expiry date indicated on labels.

#### 6.0 MATERIALS AND EQUIPMENT REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- **Microtiter plate shaker:** Shaking should be medium to vigorous. Longitudinal shaking approximately 200 strokes/min, oscillations 700—900/min.
- **Microtiter plate wash device:** Automatic plate wash capable of performing 1, and 6 washing cycles, or semi manual microtiter plate washing device connected to vacuum pump or water-jet vacuum and a liquid trap for retaining aspirated liquid. The Nunc Immuno-8 manual

strip washer is recommended if an automatic microtiter plate wash is not used.

- **Microtiter plate photometer:** with a wavelength of 620 nm and/or 405 nm; and 450nm for ultra sensitive determination (see par 9.2 items B – J) and an OD range of 0 to 3.0.
- **Precision pipettes:** with disposable plastic tips for dispensing microlitre volumes. An 8-channel pipette or respenser pipette with disposable plastic tips for delivery of 100 µL is useful but not essential. Pipettes for dispensing millilitre volumes.
- **Distilled or deionised water:** For preparation of Wash Solution
- **Others:** reagent reservoirs for multichannel pipettes, paper towels, and timer

## 7.0 WARNINGS OR PRECAUTIONS

### 7.1 SAFETY PRECAUTIONS

- All reagents in this kit are for in vitro diagnostic use only
- Only experienced laboratory personnel should use this test and handling should be agreement with GLP.
- Operators should wear gloves and protective clothing when handling any patient sera or serum based products.
- Avoid contact with reagents containing hydrogen peroxide, hydrochloric acid and preservatives which may be toxic if ingested. Do not pipette by mouth. Avoid contact of reagents or patient samples with skin or mucous membranes. If contact occurs, immediately flush with large quantities of water. Avoid splashing or creation of aerosols. Reusable glassware must be thoroughly washed and rinsed so that it is total of all detergents.
- Materials used in the preparation of human source reagents have been tested for the presence of antibodies to Human Immunodeficiency Virus (HIV 1 and 2), as well as for Hepatitis B Surface Antigen (HBsAg) and HCV and found to be negative. All material is tested with FDA approved assays. Because no test method can offer complete assurance that HIV, HBsAg or other infectious agents are absent, it is recommended that human serum based products be handled with the same precautions used for patient specimens.
- Follow all local, state and national regulations for disposal of all waste material. To dispose of reagents containing azide, flush away using copious amounts of water. Dispose with caution as sodium azide can form explosive compounds on prolonged contact with lead or copper piping.

### 7.2 TECHNICAL PRECAUTIONS

#### A. Correct use of reagents

- The performance data represented here were obtained using specific reagents listed in this package insert. Do not use reagents from other manufacturers in the kits.
- Do not use reagents from other EIAgen kits with this kit. Do not mix reagents from different kit lots.
- Do not dilute or adulterate the kit reagents, unless directed by the kit protocol.
- The **TMB Substrate** is very sensitive for contamination. The TMB HRP Substrate should be colourless or slightly bluish. A blue colour indicates that the reagent has been contaminated and should be discarded. For optimal stability of the TMB Substrate, pour the required amount from the vial to a carefully cleaned reservoir or preferably a disposable plastic tray to avoid contamination of the reagent. Be sure to use clean disposable plastic pipette tips (or respenser pipette tip).

#### B. Correct pipetting procedure

- Be sure to use clean disposable plastic pipette tips and a proper pipetting technique when handling samples and reagents. Avoid carry-over by holding the pipette tip slightly above the top of the well and avoid touching the plastic strip or surface of the liquid. A proper pipetting technique is of particular importance when handling the TMB HRP-Substrate solution.

#### C. Correct washing procedure

- Pre-washing of the strips before the assay is necessary
- Microplate washing is important. Improperly washed wells will give erroneous results  
WASHING PROCEDURE: A careful washing procedure of the strips is essential. Ensure that each well is filled up completely to the top edge and that the aspiration of the wells between and after the washing cycles is complete and the wells are dry. If there is liquid left in the wells, invert the plate and tap it carefully against absorbing paper.  
Automatic strip washer: Follow the manufacturer's instructions for maintenance and wash the required number of wash cycles prior to and after each incubation step. The aspiration/wash device should not be left standing with the Wash Solution for long periods as the needles may get clogged, giving poor liquid delivery and suction.

#### D. Adherence to assay procedure and specifications

- The test protocol must be followed strictly. Observe the indicated incubation times and temperature and the washing procedure. These are

critical steps. Do not allow the wells to dry between incubations. Please refer also to section 9.0\_ASSAY PROCEDURE.

- Include the positive and negative controls in every test run to monitor for reagent stability and correct assay performance. The obtained OD values for calibrators and concentration for controls have to be always compared to the ones reported in QC sheet. Please refer also to section 10.1\_VALIDITY OF THE ASSAY AND 10.2\_ QUALITY CONTROL.
- Do not use the kit to determine values outside the range indicated in the Instruction for Use. Please refer also to section 10.5\_MEASUREMENTS RANGE.

## 8.0 SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE

The kit is intended for use with serum. Collect blood by venipuncture and separate the serum according to common procedures. Samples can be stored at 2–8°C for 24 hours. For longer periods stores samples at -20°C or below. Samples should not be stored in a self-defrosting freezer and not be thawed and refrozen before analysis. Allow frozen samples to thaw slowly, preferably at 2–8°C over night and then bring the samples to room temperature before analysis.

## 9.0 ASSAY PROCEDURE

### 9.1 REAGENT PREPARATION

- Bring all reagents to room temperature (20...25°C). The assay should only be performed at temperatures between 20–25°C to obtain accurate results.
- Prepare washing buffer working solution according to par. 4.8
- Prepare conjugate working solution according to par 4.2;
- Select sufficient microwells for the test. Transfer the required number of microtiter plate strips to a strip frame. (Immediately return the remaining strips to the aluminum pouch containing a desiccant and reseal carefully). Before starting to pipette calibrators and patient specimens it is advisable to mark the strips to be able to clearly identify the samples during and after the assay.
- Perform each determination in duplicate for both calibrators and patient samples. A calibration curve should be run with each assay.

**NOTE:** The Calibrator 1 shall be used when ultra sensitive measurement is desired. Please refer to at par 9.2 items B and H Option for full instructions.

### 9.2 PIPETTING AND INCUBATION STEPS

- Wash** each strip once with the Wash Buffer working solution: Do not wash more strips than can be handled within 30 min.
- Pipette** 25 µL in duplicate of the Calibrators (CAL 0, 2, 3, 4, 5) , Controls (C 1, C 2) and patient specimens into the strip wells;  
**NOTE** For ultrasensitive determination of PSA in the low range (0-10 µg/L), CAL 1 (1 µg/L) should be included in the calibration curve. It is then necessary to exclude the two highest calibrators CAL 4 (30 µg/L) and CAL 5 ( 60 µg/L).
- Add** 100 µL of Conjugate working solution to each well using a 100 µL precision pipette (or an 8-channel 100 µL precision pipette). Avoid carry-over by holding the pipette tip slightly above the top of the well and avoid touching the plastic strip or the surface of the liquid.
- Incubate** the plate for 1 hours (± 10 min) at room temperature (20-25°C) with constant shaking of the plate using a microtiter plate shaker.
- Aspirate** the incubation solution and **wash** each strip 6 times with the Wash Buffer working solution using the wash procedure described in section 7.2.C
- Add** 100 µL of TMB HRP-Substrate to each well using the same pipetting technique as in item C. The TMB Substrate should be added to the wells as quickly as possible and the time between addition to the first and last well should not exceed 5 min.
- Incubate** for 30 min (± 5 min) at room temperature with constant shaking. Avoid exposure to direct sunlight.
- Immediately **read** the absorbance at 620 nm in a microtiter plate photometer.  
**Option 1:** If the laboratory does not have access to a microtiter plate photometer capable of reading at 620 nm, the OD can be determined as follows: Add 100 µL of Stop Solution. Mix and read the OD at 405 nm in a microtiter plate photometer within 15 minutes after addition of Stop Solution.  
**Option 2** For ultrasensitive determination of PSA in the low range 0-10 µg/L (see NOTE in item B), measurements of OD should be done according to Option 1 but reading at 450 nm.

## 10.0 CALCULATION OF RESULTS

### 10.1 VALIDITY OF THE ASSAY

Control 1 and 2 may be used for validation of the assay series. Ranges of expected results are indicated on the vial labels. If values outside of the specified range are obtained, a complete check of reagents and reader performance should be made and the analysis repeated.

### 10.2 QUALITY CONTROL

Each laboratory may in addition prepare its own serum pools at different levels, which can be used as internal controls in order to assure the precision of the assay.

If the results should fall out with the expected range, repeat the assay using freshly prepared controls. If the results continue to fall outside the specific range, and after equipment, adherence to the protocol and laboratory procedure have been verified, seek assistance from the supplier. Do not report patient results if the control results fall out with the acceptable ranges.

### 10.3 DATA REDUCTION: AUTOMATED METHOD

If a microtiter plate photometer reader with built-in data calculation program is used refer to the manual for the plate reader and create a program using the concentration stated on the labels of each Calibrator.

For automatic calculation of Total PSA results it is recommended to use either of the following methods:

- *Cubic spline* fit method. Calibrator 0 should be included in the curve with the value 0 µg/L.
- *Spline smoothed* curve fit method. Calibrator 0 should be used as plate blank.
- Interpolation with *point-to-point* evaluation. Calibrator 0 should be included in the curve with the value 0 µg/L.
- *Quadratic curve* fit method. Calibrator 0 should be included in the curve with the value 0 µg/L.

**NOTE:** 4-parametric or linear regression should not be used.

### 10.4 DATA REDUCTION: MANUAL METHOD

For manual evaluation, a calibration curve is constructed by plotting the OD values obtained for each PSA calibrator against the corresponding PSA concentration (in µg/L), see figure below. The unknown PSA concentrations can then be read from the calibration curve using the mean OD value of each patient specimen.

### 10.5 MEASUREMENT RANGE

The EIAgen PSA Equi kit measures concentrations between 0.1 and 60 µg/L. If PSA concentrations above the measuring range are to be expected, it is recommended to dilute samples with normal human male serum prior to analysis.

**NOTE:** The serum used for dilution should also be measured in order to determine the endogenous PSA concentration

If samples in an initial analysis give PSA levels higher than 60 µg/L the samples should be diluted 1/10 with normal male human serum and reanalyzed to obtain the accurate PSA concentration.

The PSA concentration of the undiluted sample is calculated as:

$$\text{Dilution } 1/10 = 10 \times ([\text{PSA}]_{\text{diluted sample}} - (0.9 \times [\text{PSA}]_{\text{Normal male serum}}))$$

### 11.0 EXPECTED VALUES

Healthy males are expected to have PSA values below 4 µg/L. However, age related variations have been shown to occur (6, 8). It is recommended that each laboratory establish its own normal range to account for such local environmental factors as diet, climate, living conditions, patient selection, etc.

### 12.0 LIMITATION OF THE PROCEDURE.

The level of PSA cannot be used as absolute evidence for the presence or absence of malignant disease. The results of the test should be interpreted only in conjunction with other investigations and procedures in the diagnosis of disease and the management of patients. The PSA test should not replace any established clinical examination.

The calibrators of the EIAgen PSA Equi kit should not be used for recovery studies of PSA. For recovery studies it is recommended to use a highly elevated patient sample.

Anti-reagent antibodies (human anti-mouse antibody (HAMA) or heterophilic antibodies) in the patient sample may occasionally interfere with the assay, even though specific blocking agents are included in the buffer.

### 13.0 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

#### 13.1 PRECISION

Total precision was determined according to NCCLS guideline EP5-A (9) using four levels of frozen pooled human serum containing added PSA and six

different EIAgen PSA Equi reagent combinations. Each sample was randomly pipetted (n=2/analysis) and analysed twice each day over 20 days.

Sample	Replicates	Mean µg/L	Within-run SD µg/L	Within run CV %	Between day SD µg/L	Between day CV %
PSA 1	80	1.42	0.04	2.7	0.03	2.2
PSA 2	80	5.92	0.13	2.2	0.06	1.0
PSA 3	80	14.2	0.35	2.5	0.12	0.8
PSA 4	80	39.2	0.60	1.5	0.60	1.5

### 13.2 DETECTION LIMIT

The detection limit of the EIAgen PSA equi kit is < 0.1 µg/L defined as the concentration corresponding to the mean of the OD values of the calibrator 0 plus 2 standard deviations according to formula:

$$(2 \times \text{SD CAL 0}) / (\text{OD CAL 2} - \text{OD CAL 0}) \times 2 \mu\text{g/L}$$

### 13.3 RECOVERY

Spiked serum samples were prepared by adding aliquots of samples with highly elevated PSA to normal male serum samples. The recovery of the antigen was within ± 10% of the expected values. NOTE: Recovery studies should not be performed using the kit calibrators.

### 13.4 HOOK EFFECT

No hook effect has been noticed with samples up to 23000 µg/L.

**NOTE:** In very high samples the colour of the substrate will change from blue to greenish (and eventually yellow in extremely high samples). This will lead to a falsely low OD at 620 nm, and in extreme cases the OD may fall within the calibration curve range and noticed as a hook.

### 13.5 LINEARITY

Patient samples were diluted with normal male human serum and analyzed. The obtained values were within ± 10% of the expected values.

### 13.6 SPECIFICITY

The EIAgen PSA Equi kit is based on two mouse monoclonal antibodies, PSA10 and PSA66, directed against two distinct epitopes exposed both in the PSA-ACT complex and in free PSA. This antibody combination provides an equimolar response for free PSA and the PSA-ACT complex (7). The NCCLS guideline EP7-P (10) was followed to determine possible sources of interference. The following substances and concentrations were tested and found not to interfere with the test.

	Concentration with no significant (± 10%) interference
Lipemia (Intralipid®)	10 mg/mL
Bilirubin, unconjugated	0.6 mg/mL
Hemoglobin	5 mg/mL

### 14.0 AUTOMATION

Application protocols for the proper automation (Personal Lab and Nexgen) on the Adaltis microtiterstrips analyzers are available upon request at Adaltis directly.

### 15.0 SUGGESTIONS FOR TROUBLESHOOTING

Adherence to assay procedure and specifications, as well as a correct use of reagents and proper pipetting, may help to avoid the following kinds of errors.

ERROR	POSSIBLE CAUSES / SUGGESTIONS
OD very different (± 50%) from OD reported on QC	<ul style="list-style-type: none"> <li>- incorrect dispensing volume of reagents (suggestion: check the correspondence between the volume dispensed by the pipette and the one required by the assay; re-calibrate again pipettes)</li> <li>- incorrect temperature or incorrect incubation time (suggestion: more care in the incubator maintenance; note down the beginning of the incubation)</li> <li>- error in washing or in photometer reading (suggestion: check operating or settings of respective instruments)</li> <li>- contamination of Substrate (suggestion: use only disposable and clean plastic containers)</li> </ul>
Low reproducible results	<ul style="list-style-type: none"> <li>- not constant dispensing volume of samples or reagents (suggestion: check the pipettes precision and the correspondence between the volume dispensed by the pipette and the one required by the assay; re-calibrate again pipettes)</li> <li>- error in washing or in reading (suggestion: check operating or settings of respective instruments)</li> <li>- contamination of Substrate (suggestion: use only disposable and clean plastic containers)</li> <li>- pollution or degradation of reagents (suggestion: use appropriate tips, disposable and clean plastic containers for reagents and high quality distilled or equivalent water)</li> </ul>
no colourimetric reaction after addition of substrate	<ul style="list-style-type: none"> <li>- some reagent not pipetted</li> <li>- strong contamination of conjugate or Substrate</li> <li>- errors in performing the assay procedure (e.g. accidental pipetting of reagents in a wrong sequence or from the wrong vial, etc.)</li> </ul>
too low reaction (too low ODs)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- incorrect conjugate dilution</li> <li>- incubation time too short, incubation temperature too low</li> </ul>
too high reaction (too high ODs)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- incorrect conjugate dilution</li> <li>- incubation time too long, incubation temperature too high</li> <li>- water quality for wash buffer insufficient (low grade of deionization)</li> <li>- insufficient washing (conjugates not properly removed)</li> </ul>
unexplainable outliers	<ul style="list-style-type: none"> <li>- contamination of pipettes, tips or containers</li> <li>- inconstant and insufficient washing (conjugates not properly removed)</li> </ul>
too high within-run CV%	<ul style="list-style-type: none"> <li>- reagents and/or strips not pre-warmed to Room Temp. prior to use</li> <li>- plate washer is not washing correctly (suggestion: clean washer head)</li> </ul>
too high between-run CV%	<ul style="list-style-type: none"> <li>- incubation conditions not constant (time, temperature)</li> <li>- controls and samples not dispensed at the same time (with the same intervals) (check pipetting order)</li> <li>- person-related variation</li> </ul>

### 16.0 REFERENCES

1. Wang MC, Valenzuela LA, Murphy GP, Chu TM (1979). Purification of a human prostate specific antigen. Invest Urol 17: 159-163.
2. Lilja H. (1985). A kallikrein-like serine protease in prostatic fluid cleaves the predominant seminal vesicle protein. J Clin Invest 76: 1899-1903.
3. Oesterling JE (1991). Prostate specific antigen: A critical assessment of the most useful tumor marker for adenocarcinoma of the prostate. J Urology 145: 907-923.
4. Lilja H., Christensson A., Dahlén U., Matikainen M-T, Nilsson O., Pettersson K., Lövgren T. (1991). Prostate-specific antigen in serum occurs predominantly in complex with α1-antichymotrypsin. Clin Chem 37: 1618-1625.
5. Christensson A., Björk T., Nilsson O., Dahlén U., Matikainen M-T., Cockett ATK, Abrahamsson PA, Lilja J. (1993). Serum prostate specific antigen complexed to α1-antichymotrypsin as an indicator of prostate cancer. J Urology 150: 100-105.
6. Oesterling JE., Cooner WH., Jacobsen SJ., Guess HA., Lieber MM. (1993). The influence of patient age on the serum prostate. Specific antigen concentration: An important clinical observation. Urol Clin North Am 20: 671-80, 1993a.
7. Nilsson O., Peter A. Andersson I., Nilsson K., Grundström B., and Karlsson B. (1997) Antigenic determinants of prostatespecific antigen (PSA) and development of assays specific for different forms PSA. Br J Cancer 75(6): 789-797.
8. P Price C., Allard J., Davies G., Dawney A., J Duffy M., France M., Mandarino G., Milford Ward A., Patel B., Sibley P. and Sturgeon C. Pre- and post-analytical factors that may influence use of serum prostate specific antigen and its isoforms in a screening programme for prostate cancer. Ann Clin Biochem 2001; 38: 188-216.
9. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices. Approved Guideline EP5-A (1999).
10. National Committee for Clinical Laboratory Standards, National Evaluation Protocols for Interference Testing, Evaluation protocol Number 7, Vol. 6, No 13, August (1986)



Biogefährdung (siehe ABSCHNITT 7 – Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen).

# EIAgen PSA Equi Kit

 LI4027C  96 Bestimmungen

**Adaltis Italia S.p.A.**  
Via Cristoni, 12  
40033 Casalecchio di Reno – (BO) Italien  
Tel. +39-051-6136511 – Fax + 39-051-575280  
www.adaltis.com



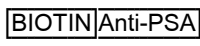






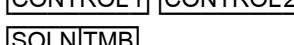
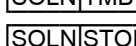
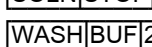
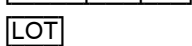



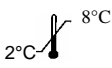



NUR ZUR IN VITRO DIAGNOSTISCHEN VERWENDUNG


 0459

LAGERUNG BEI 2...8°C

 De

## SYMBOLE, DIE AUF DEN ETIKETTEN VERWENDET WERDEN

	Mikroscheibe
	HRP Konjugatkonzentrat
	Biotin Anti-PSA
	Kalibrator 0
	Kalibrator 1
	Kalibrator 2
	Kalibrator 3
	Kalibrator 4
	Kalibrator 5
	Kontrollen
	TMB Substrat
	Stopplösung
	Waschpufferkonzentrat
	Lotnummer
	Bestellnummer
	Verfalldatum (verwendbar bis...)
	Lagerung bei 2...8°C
	Anzahl der Bestimmungen
	Nicht direktem Sonnenlicht aussetzen.
	Hersteller:

 Achtung, Gebrauchsanweisung beachten

### 1.0 VERWENDUNGSZWECK

Der EIAgen PSA Equi KIT dient der quantitativen Bestimmung von PSA (Total Prostate Specific Antigen) in humanem Serum.

### 2.0 PHYSIOLOGIE

PSA ist eine 32 kDa einkettige Glykoprotein-Serinprotease mit Chymotrypsin-ähnlicher Spezifität, die vom sekretorischen Epithel der Prostataerkrankungen erzeugt wird (1). PSA wird normalerweise in die Samenflüssigkeit sezerniert und spielt bei der Spaltung von Bläschenproteinen und der Verflüssigung von Samenkoagulum eine bedeutende Rolle (2).

Bei gesunden Männern ist der PSA-Spiegel generell niedrig; ansteigende Serumkonzentrationen sind ein Hinweis auf Prostataerkrankungen einschließlich benigner Prostatahyperplasie und Prostatakrebs (PCa). Die PSA-Ermittlung wird heute verbreitet zur Feststellung und Behandlung von Prostatakrebs eingesetzt und wird als hervorragender serologischer Marker für Prostatakrebs betrachtet (3, 8).

PSA bildet erwiesenermaßen stabile Komplexe mit unterschiedlichen Antiproteasen und der bedeutendste PSA-Anteil im Patientenserum findet sich zusammengesetzt mit Alfa1-Antichymotrypsin (PSA-ACT) (4). Zwischen verschiedenen Patienten gibt es allerdings große Schwankungen zwischen totalem PSA und PSA-ACT-Komplex.

Außerdem weisen einige Studien darauf hin, dass der Anteil an freiem PSA bei benignen Prostataerkrankungen höher liegt als bei Prostatakrebs (5). Die Antikörper des EIAgen PSA Equi Kits wurden sorgfältig untersucht und nach dem Kriterium ausgewählt, dass sowohl für freie PSA als für den PSA-ACT-Komplex dieselbe molare Reaktion erhalten wird (7). Dadurch bietet der EIAgen PSA Equi Kit unabhängig von individuellen Schwankungen freier und ACT-komplexbildender PSA einen echten 'Gesamt'-PSA-Wert.

### 3.0 TESTPRINZIP

Der EIAgen PSA Equi Kit ist ein festphasiger, nicht-kompetitiver Immunoassay nach dem Prinzip des direkten 'Sandwichverfahrens'. Kalibratoren, Kontrollen und Patientenproben werden mit biotinyliertem Anti-PSA monoklonalem Antikörper und HRP-Tracer (Meerrettichperoxidase) in Treptavidin-impregnierten Mikrotiterstreifen inkubiert. Nach dem Waschen wird jeder Vertiefung (Well) gepuffertes Substrat/Chromogen Reagens (Wasserstoffperoxid und 3, 3', 5, 5' tetra - Methylbenzidin) hinzugefügt und die Enzymreaktion verläuft weiter. Ist Antigen vorhanden, entsteht im Verlauf der Reaktion eine Blaufärbung. Die Farbintensität (Absorption, OD) ist proportional zur in den Proben vorhandenen PSA-Konzentration. Die Farbintensität wird in einem Mikrotiter-Photometer

bei 620 nm (oder nach Zugabe der Stopplösung optional bei 405 nm) bestimmt. Die Kalibrierungskurven für jeden Assay werden durch Plotten des OD-Werts im Verhältnis zur Konzentration jedes Kalibrators ermittelt. Dann werden die PSA-Konzentrationen der Patientenproben von der Kalibrierungskurve abgelesen.

### 4.0 INHALT DES KITS

#### 4.1 MIKROSCHLEIBE (Code 30PIA)



1 Mikroscheibe, 12 Streifen mit 8 aufbrechbaren Vertiefungen. Die Vertiefungen sind mit Streptavidin imprägniert. Nicht verwendete Streifen sind nach dem Öffnen unverzüglich in den ein Trocknungsmittel enthaltenden Aluminiumbeutel zu geben. Den Beutel wieder dicht verschließen, so dass keine Feuchtigkeit eindringen kann.

#### 4.2 KONJUGAT (Code 30HRP)



1 Fläschchen mit 0,75 ml Stammlösung (20x Konzentrat) an Anti-PSA monoklonalem Antikörper (Maus) konjugiertem HRP, circa 20 µg/ml. Enthält Konservierungsstoffe.

Muss vor Verwendung mit Biotin Anti-PSA gemischt werden.

**Vorbereitung der Konjugat (HRP- Anti-PSA) Arbeitslösung:** Die erforderliche Menge Konjugat-Arbeitslösung wird zubereitet, indem 50 µl Konjugat 20x Konzentrat mit 1 ml Biotin Anti-PSA pro Streifen gemischt werden (siehe Tabelle unten).

Anzahl Streifen	KONJUGAT $\mu$ l	Biotin Anti- PSA ml
1	50	1
2	100	2
3	150	3
4	200	4
5	250	5
6	300	6
7	300	7
8	400	8
9	450	9
10	500	10
11	550	11
12	600	12

Zur Vorbereitung der Arbeitslösung muss eine saubere Kunststoff- oder Glasflasche verwendet werden.

**Alternative:** Den Inhalt des Konjugat 20x Konzentrats in das Fläschchen Biotin Anti-PSA geben und vorsichtig mischen. Dabei ist sicherzustellen, dass das Konjugat zur Gänze in das Fläschchen mit Biotin Anti-PSA gegeben wird.

**AUFBEWAHRUNG:** Die Konjugat-Arbeitslösung ist bei 2–8°C in einem dicht verschlossenen Behälter 3 Wochen lang stabil. Bitte nur die innerhalb dieses Zeitraums auch verwendete Lösungsmenge zubereiten und diese ordnungsgemäß aufbewahren.

#### 4.3 BIOTIN Anti PSA (Code 30BT) BIOTIN|Anti-PSA

1 Fläschchen mit 15 ml Biotin-gekennzeichnete Anti-PSA-Antikörper (Maus, monoklonal), circa 1  $\mu$ g/ml. Enthält phosphatgepufferte Salzlösung (pH 7,2), Serumalbumin (Rind), Immunglobulin (Rind), Blockiermittel, Tween 20, einen inerten Farbstoff (blau) und 0,01 % Methyl-isothiazolon (MIT) als Konservierungsmittel.

Gebrauchsfertig.

#### 4.4 KALIBRATOREN

6 Fläschchen mit 0,75 ml Kalibrator. Die Kalibratoren enthalten humane PSA in einer Tris-HCl-gepufferten Salzlösung mit Serumalbumin (Rind), einem inerten Farbstoff (Gelb) und 0,01 % Methyl-isothiazolon (MIT) als Konservierungsmittel.

Gebrauchsfertig.

Kalibrator	Symbol	Code	Konzentration
Kalibrator 0	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">CAL0</span>	30CAL0	0 $\mu$ g/L
Kalibrator 1	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">CAL1</span>	30CAL1	1 $\mu$ g/L
Kalibrator 2	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">CAL2</span>	30CAL2	2 $\mu$ g/L
Kalibrator 3	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">CAL3</span>	30CAL3	10 $\mu$ g/L
Kalibrator 4	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">CAL4</span>	30CAL4	30 $\mu$ g/L
Kalibrator 5	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">CAL5</span>	30CAL5	60 $\mu$ g/L

#### Bezugsquellen und Unterlagen

Als Bezugsstandard kann der 1. Internationale Standard 96/670 verwendet werden.

Die Werte für PSA-Kalibratoren und Kontrollen wurden im Rahmen von Bezugsstandards im Haus zugewiesen, deren Werte sich auf die des 1. Internationalen Standards zurückverfolgen lassen.

#### 4.5 KONTROLLEN

Kontrolle	Symbol	Code	
Kontrolle 1	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">CONTROL1</span>	30CTRL1	1 0,75-ml-Fläschchen
Kontrolle 2	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">CONTROL2</span>	30CTRL2	1 0,75-ml-Fläschchen

Jede Kontrolle enthält humane PSA in einer Tris-HCl-gepufferten Salzlösung mit Serumalbumin (Rind) und 0,01 % Methyl-isothiazolon (MIT) als Konservierungsmittel.

Gebrauchsfertig.

#### 4.6 TMB-SUBSTRAT (Code TMBB) SOLN|TMB

1 Fläschchen mit 12 ml gebrauchsfertigem Wasserstoffperoxid und 3,3',5,5'-tetra-Methylbenzidin (TMB).

Gebrauchsfertig.

#### 4.7 STOPPLÖSUNG (Code STOPB) SOLN|STOP

1 Fläschchen mit 15 ml 0,12 M Salzsäure.

Gebrauchsfertig.

#### 4.8 WASCHPUFFER 25X (Code TLAVB) WASH|BUF|25X

1 Flasche mit 50 ml Waschpufferkonzentrat. Waschpufferkonzentrat enthält Tris-HCl-gepufferte Salzlösung mit Tween 20. Enthält German II als Konservierungsmittel.

**Vorbereitung der Waschpuffer-Arbeitslösung:** Die 50 ml Waschpufferkonzentrat in einen sauberen Behälter geben und 25-fach mit 1200 ml destilliertem oder deionisiertem Wasser verdünnen; dies ergibt die Waschpuffer-Arbeitslösung.

**AUFBEWAHRUNG:** In einem dicht verschlossenen Behälter ist der Waschpuffer 2 Wochen lang stabil, solange er bei 2-25°C gelagert wird.

#### 5.0 LAGERUNG UND STABILITÄT NACH DEM ERSTEN ÖFFNEN

- Kitkomponenten bitte bei 2...8°C lagern und nach dem Verfallsdatum nicht mehr verwenden.
- Die Mikroscheibe nach Verwendung dicht verschließen, die Flaschenverschlüsse fest zuschrauben und bei 2...8°C lagern.
- Ein einmal geöffneter Kit muss vor dem auf den Etiketten angegebenen Verfallsdatum aufgebraucht werden.

#### 6.0 ZUSÄTZLICH BENÖTIGTE MATERIALIEN (NICHT MITGELIEFERT)

- **Mikrotiter-Scheibenschüttler:** Der Schüttelvorgang sollte mäßig bis kräftig verlaufen. Längsschüttelung circa 200 Hübe/min 0 strokes/min, 700—900 Schwingungen/min.
- **Waschvorrichtung für die Mikrotiter-Scheibe:** Automatischer Scheibenwascher, der einen oder sechs Waschzyklen bietet oder semi-Handwaschvorrichtung, die an eine Unterdruckpumpe oder ein Wasserstrahlvakuum angeschlossen ist und mit einem Flüssigkeitsauffang für die abgesaugte Flüssigkeit ausgestattet ist. Wenn keine automatische Mikrotiter-Scheibenwaschvorrichtung verwendet wird, wird der Einsatz der manuellen Nunc-Immuno-8-Streifenwaschvorrichtung empfohlen.
- **Mikrotiter-Scheibenphotometer:** mit einer Wellenlänge von 620 nm und/oder 405 nm; und 450nm für ultrasensible Bestimmung (siehe Abschnitt 9.2, B – J) und einem OD-Bereich von 0 bis 3,0.
- **Präzisionspipetten:** mit Wegwerfspitzen aus Kunststoff zur Verteilung von Mikrolitermengen. Eine 8-Kanal-Pipette oder Responder-Pipette mit Wegwerfspitzen aus Kunststoff zum Verteilen von 100  $\mu$ L wird empfohlen, ist aber nicht unbedingt erforderlich. Pipetten zur Verteilung von Millilitermengen.
- **Destilliertes oder deionisiertes Wasser:** Zur Vorbereitung der Waschlösung
- **Anderes:** Reagenzreservoirs für Vielkanalpipetten, Papiertücher und Timer

#### 7.0 WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

- #### 7.1 SICHERHEITSMASSNAHMEN
- Alle in diesem Kit enthaltenen Reagenzien sind ausschließlich zur in-vitro diagnostischen Verwendung bestimmt.
  - Nur zur Verwendung durch entsprechend geschulte Laborfachkräfte, die mit den Richtlinien der 'guten Laborpraxis' (GLP) vertraut sind.
  - Beim Umgang mit Patientenseren oder Serumprodukten müssen Handschuhe und Schutzkleidung getragen werden.
  - Jede Berührung von Reagenzien, die Wasserstoffperoxid, Salzsäure oder Konservierungsstoffe enthalten, ist zu vermeiden; werden sie geschluckt besteht Vergiftungsgefahr. Nicht mit dem Mund pipettieren. Berührung von Reagenzien oder Patientenproben mit Haut oder Schleimhäuten vermeiden. Bei Berührungen unverzüglich mit reichlich Wasser abspülen. Spritzer und Aerosolbildung vermeiden. Wieder zu verwendende Glasbehälter müssen gründlich gewaschen und abgespült werden, so dass keine Waschmittelreste vorhanden sind.
  - Sämtliche zur Vorbereitung von Reagenzien humanen Ursprungs verwendeten Materialien wurden auf Anti-HIV 1 und 2, auf Hepatitis-B-Oberflächengen (HbsAG) und auf HCV überprüft und negativ gefunden. Alle Materialien werden unter Einsatz von FDA-zugelassenen Assays getestet. Da keine Testmethode eine absolute Sicherheit bieten kann, dass keine HIV-, HBsAg- oder andere Infektionserreger vorhanden sind, sollten Humanserumprodukte prinzipiell als infektiös betrachtet und mit derselben Vorsicht wie Patientenproben behandelt werden.
  - Alle örtlichen, regionalen und bundesbehördlichen Vorschriften zur Abfallentsorgung müssen befolgt werden. Azid enthaltende Reagenzien können mit reichlich Wasser weggespült werden. Bitte beachten, dass Natriumazid bei längerem Kontakt mit Blei- oder Kupferrohren explosionsfähige Verbindungen bilden kann.

#### 7.2 TECHNISCHE VORSICHTSMASSNAHMEN

- #### A. Korrekte Verwendung von Reagenzien
- Die hier angegebenen Leistungs- und Wertedaten wurden mit den in diesem Kit gelieferten Reagenzien erhalten. Bitte verwenden Sie keine Reagenzien anderer Hersteller mit diesen Kits.
  - Verwenden Sie auch keine Reagenzien aus anderen ElAgens-Kits mit diesem Kit. Reagenzien unterschiedlicher Kits dürfen prinzipiell nicht gemischt verwendet werden.
  - Die Reagenzien dürfen nicht verfälscht und auch nicht verdünnt werden, es sei denn, dies wird vom Kitprotokoll vorgeschrieben.
  - Das **TMB Substrat** ist äußerst anfällig für Kontamination. Das TMB HRP Substrat sollte farblos oder leicht bläulich sein. Eine Blaufärbung weist darauf hin, dass das Reagens kontaminiert ist und entsorgt werden muss. Eine optimale Stabilität des TMB Substrats wird erreicht, indem die erforderliche Menge aus dem Fläschchen in einen

sorgfältig gereinigten Behälter oder eine Einweg-Kunststoffschale gegeben wird, um die Kontaminierung des Reagenz zu vermeiden. Ausschließlich saubere Einwegpipetten aus Kunststoff (oder Responder-Pipettenspitzen) verwenden.

#### B. Korrektes Pipettierverfahren

- Beim Umgang mit Proben und Reagenzien müssen saubere Einwegpipettenspitzen aus Kunststoff sowie ein geeignetes Pipettierverfahren eingesetzt werden. Verschleppungen werden vermieden, indem die Pipettenspitze etwas oberhalb der Well gehalten wird und eine Berührung des Kunststoffstreifens oder der Oberfläche der Flüssigkeit vermieden wird. Der Einsatz eines ordnungsgemäßen Pipettierverfahrens ist besonders beim Umgang mit der TMB HRP-Substratlösung unerlässlich.

#### C. Korrektes Waschverfahren

- Die Streifen müssen vor dem Assay vorgewaschen werden.
- Auch das Waschen der Mikroscheibe ist wichtig. Unzureichend gewaschene Wells führen zu fehlerhaften Ergebnissen.  
**WASCHVORGANG:** Es ist von größter Bedeutung, die Streifen sorgfältig zu waschen. Bitte sicherstellen, dass jede Well bis zum oberen Rand gefüllt ist, dass die Wells zwischen und nach den Waschzyklen vollständig aspiriert werden und die Wells trocken sind. Sollte sich in den Wells noch Restflüssigkeit befinden, die Scheibe umdrehen und vorsichtig über saugfähigem Papier abklopfen.  
**Automatische Streifenwaschvorrichtung:** Die Anleitungen des Herstellers sind zu befolgen und die erforderliche Anzahl der Waschzyklen vor und nach jedem Inkubationsschritt durchzuführen. Die Absaug-/Waschvorrichtung sollte nicht längere Zeit mit der Waschlösung stehen gelassen werden, da die Nadeln dadurch verstopft werden können, was ihre Funktionstüchtigkeit beeinträchtigt.

#### D. Korrekte Testdurchführung und Einhaltung spezifischer Anleitungen

- Die angegebenen Inkubationszeiten, Temperaturen und Waschanweisungen müssen befolgt werden. Die korrekte Durchführung dieser Schritte ist unerlässlich. Die Wells dürfen zwischen Inkubationen nicht trocknen. Bitte siehe auch ABSCHNITT 9.0\_TESTDURCHFÜHRUNG
- Die positiven und negativen Kontrollen sind in jeder Bestimmung mitzuführen, um die Stabilität der Reagenzien und die korrekte Assayleistung zu überwachen. Die für Kalibratoren und Konzentrationen für Kontrollen ermittelten OD-Werte sind stets mit den auf dem QC-Blatt angegebenen zu vergleichen. Bitte siehe auch Abschnitt 10.1\_VALIDITÄT DES ASSAYS und 10.2\_QUALITÄTSKONTROLLE
- Der Kit darf nicht zur Bestimmung von ausserhalb den in der Anleitung vorgegebenen liegenden werten eingesetzt werden. Bitte siehe auch ABSCHNITT 10.5\_MESSBEREICH.

#### 8.0 SAMMLUNG/ENTNAHME VON PROBEN UND AUFBEWAHRUNG

Der Kit ist zur Verwendung mit Serum bestimmt. Blutproben mittels Venenpunktion entnehmen und das Serum in gängigen Verfahren isolieren. Proben können 24 Stunden bei 2–8°C gelagert werden. Bei längerer Lagerung sind die Proben bei -20°C oder niedriger zu lagern. Proben dürfen nicht in einem Gefrierschrank mit Abtauautomatik aufbewahrt werden und vor der Analyse nicht aufgetaut und wieder eingefroren werden. Gefrorene Proben langsam auftauen, am besten über Nacht bei 2–8°C. Proben vor der Analyse auf Raumtemperatur bringen.

#### 9.0 TESTDURCHFÜHRUNG

##### 9.1 VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- Alle Reagenzien auf Raumtemperatur (20...25°C) bringen. Der Test sollte nicht bei Temperaturen außerhalb 20–25°C durchgeführt werden, um präzise Ergebnisse nicht zu gefährden.
- Die Waschpuffer-Arbeitslösung ist nach Anleitung in Punkt 4.8 vorzubereiten.
- Die Konjugat-Arbeitslösung ist nach Anleitung in Punkt 4.2 vorzubereiten.
- Es müssen ausreichend Mikro-Wells für den Test bereitstehen. Die erforderliche Anzahl Mikrotiter-Scheibenstreifen auf einen Streifenrahmen übertragen. (Die restlichen Streifen unverzüglich in den Aluminiumbeutel mit Trocknungsmittel geben und Beutel sorgfältig verschließen.) Es wird empfohlen, die Streifen vor Beginn der Pipettierung von Kalibratoren und Patientenproben zu kennzeichnen, so dass Proben während des Tests und nach dem Test eindeutig identifizierbar sind.
- Jede Bestimmung im Duplikat sowohl für Kalibratoren als auch Patientenproben durchführen. Bei jedem Test sollte eine Kalibrierungskurve erstellt werden.

**HINWEIS:** Kalibrator 1 ist dann einzusetzen, wenn eine ultraempfindliche Messung gewünscht wird. Genaue Anweisungen finden Sie unter 9.2, Punkt B und H.

#### 9.2 PIPETTIER- UND INKUBATIONSSCHRITTE

- A. Jeden Streifen einmal mit **Waschpuffer-Arbeitslösung waschen**; Nur so viele Streifen waschen wie innerhalb von 30 Minuten verarbeitet werden können.
- B. 25 µl (im Duplikat) der Kalibratoren (CAL 0, 2, 3, 4, 5), Kontrollen (C 1, C 2) und Patientenproben in die Streifen-Well **pipettieren**.  
**HINWEIS:** Für ultraempfindliche Bestimmung von PSA im niedrigen Bereich (0-10 µg/l) ist CAL 1 (1 µg/l) mit in die Kalibrationskurve aufzunehmen. Dann sind die zwei höchsten Kalibratoren, CAL 4 (30 µg/l) und CAL 5 (60 µg/l) auszuschließen.
- C. Mit einer 100 µl Präzisionspipette (oder einer 8-kanaligen 100 µl Präzisionspipette) 100 µl der Konjugat-Arbeitslösung in jede Streifen-Well **zufügen**. Verschleppungen werden vermieden, indem die Pipettenspitze etwas oberhalb der Well gehalten wird und eine Berührung des Kunststoffstreifens oder der Oberfläche der Flüssigkeit vermieden wird.
- D. Die Scheibe 1 Stunde (± 10 min) bei Zimmertemperatur (20-25°C) **inkubieren**, wobei die Scheibe durchgehend mit einem Mikrotiter-Scheibenrüttler geschüttelt wird.
- E. Die Inkubationslösung **aspirieren** und jeden Streifen 6 Mal mit der **Waschpuffer-Arbeitslösung** wie in Abschnitt 7.2.C beschrieben **waschen**.
- F. Jedem Streifen 100 µl TMB HRP-Substrat **zufügen**, dabei wie in Punkt C beschrieben vorgehen. Das TMB Substrat muss so schnell wie möglich zugefügt werden; zwischen Bearbeiten der ersten und der letzten Well sollten nicht mehr als 5 Minuten liegen.
- G. 30 min (± 5 min) bei Raumtemperatur und konstantem Schütteln **inkubieren**. Direkte Sonneneinstrahlung vermeiden.
- H. Extinktion bei 620 nm in einem Mikrotiter-Scheibenphotometer unverzüglich **ablesen**.

**Option 1:** Steht kein zur Ablesung bei 620 nm geeigneter Mikrotiter-Photometer zur Verfügung, kann die OD auch wie folgt bestimmt werden: 100 µl Stopplösung zufügen. Mischen und OD bei 405 nm innerhalb von 15 Minuten nach Zugabe der Stopplösung in einem Mikrotiter-Scheibenphotometer ablesen.

**Option 2:** Für ultraempfindliche Bestimmung von PSA im niedrigen Bereich 10 µg/l (siehe HINWEIS unter Punkt B) ist die OD wie unter Option 1 beschrieben zu bestimmen, die Ablesung jedoch bei 450 nm vorzunehmen.

#### 10.0 TESTAUSWERTUNG

##### 10.1 VALIDITÄT DES TESTS

Kontrolle 1 und 2 können zur Nachprüfung der Testserie eingesetzt werden. Die erwarteten Ergebnisbereiche werden auf den Fläschchenetiketten angegeben. Liegen erhaltene Werte außerhalb des festgelegten Bereichs, müssen alle Reagenzien sowie das Lesegerät überprüft und die Analyse wiederholt werden.

##### 10.2 QUALITÄTSKONTROLLE

Zudem kann jedes Labor eigene Serumpools einsetzen, die als interne Kontrollen herangezogen werden, um die Testgenauigkeit zu belegen. Bei Ergebnissen außerhalb des erwarteten Bereichs ist der Test mit frisch vorbereiteten Kontrollen zu wiederholen. Werden auch nach Überprüfung der Geräte sowie trotz strenger Einhaltung des Protokolls sowie geeigneter Labormethoden weiterhin außerhalb des Bereichs liegende Ergebnisse erhalten, wenden Sie sich bitte um Unterstützung an den Zulieferer. Geben Sie keine Patientenergebnisse weiter, wenn die Kontrollen nicht im akzeptablen Bereich liegen.

##### 10.3 DATENAUSWERTUNG: AUTOMATISIERTES VERFAHREN

Wird ein Mikrotiter-Photometer-Lesegerät mit integriertem Rechenprogramm verwendet, lesen Sie bitte die dazugehörige Anleitung und erstellen Sie mittels Angabe der auf dem Etikett jedes Kalibrators angegebenen Konzentrationen.

Für die automatische Berechnung von Gesamt-PSA-Ergebnissen wird eine der folgenden Methoden empfohlen:

- *Fitting-Verfahren* mit *Cubic spline*-Kurve. Der Kalibrator 0 ist mit einem Wert von 0 µg/L in die Kurve aufzunehmen.
- *Fitting-Verfahren* mit *Spline smoothed*-Kurve. Der Kalibrator 0 ist als Leermessung mitzuführen.
- Interpolation mit *Punkt-zu-Punkt*-Auswertung. Der Kalibrator 0 ist mit einem Wert von 0 µg/L in die Kurve aufzunehmen.
- *Fitting-Verfahren* mit *Quadratischer Kurve*. Der Kalibrator 0 ist mit einem Wert von 0 µg/L in die Kurve aufzunehmen.

**HINWEIS:** 4-parametrische oder lineare Regression sind nicht einzusetzen.

##### 10.4 DATENAUSWERTUNG: MANUELLES VERFAHREN

Bei manueller Auswertung wird eine Kalibrierungskurve erstellt, indem die für jeden Kalibrator erhaltenen OD-Werte auf die entsprechende PSA-Konzentration (in µg/l) abgebildet werden; siehe Abb. Unten. Die unbekannteren PSA-Konzentrationen können dann anhand des mittleren OD-Werts jeder Patientenprobe von der Kalibrierungskurve abgelesen werden.

### 10.5 MESSBEREICH

Mit dem EIAGEN PSA Equi Kit können Konzentrationen zwischen 0,1 und 60 µg/l gemessen werden. Werden PSA-Konzentrationen oberhalb des Messbereichs erwartet, wird empfohlen, die Proben vor der Analyse mit normalem männlichem Humanserum zu verdünnen.

HINWEIS: Das zur Verdünnung verwendete Serum ist ebenfalls zu messen, so dass die endogene PSA-Konzentration bestimmt werden kann.

Wenn Proben der Erstanalyse PSA-Werte höher als 60 µg/l ergeben, sind die Proben 1/10 mit normalem männlichem Humanserum zu verdünnen und erneut zu analysieren, um die präzise PSA-Konzentration zu erhalten.

Die PSA-Konzentration unverdünnter Proben wird wie folgt berechnet:

$$\text{Verdünnung } 1/10 = 10 \times \left( \frac{[\text{PSA}]_{\text{Verdünnte Probe}}}{[\text{PSA}]_{\text{Normales männliches Serum}}} - 0,9 \right)$$

### 11.0 ERWARTETE WERTE

Bei gesunden Männern wird ein PSA-Wert unter 4 µg/l erwartet; allerdings können altersbedingte Schwankungen durchaus auftreten (6, 8). Es wird jedem Labor empfohlen, einen eigenen Messbereich zu erstellen, der örtliche Gegebenheiten wie Ernährung, Klima, Lebensbedingungen, Patientenauswahl etc. berücksichtigt.

### 12.0 GRENZEN DES TESTVERFAHRENS

Die PSA-Konzentration kann nicht als absoluter Nachweis für das Vorhandensein bzw. Nichtvorhandensein maligner Krankheiten betrachtet werden. Die Testergebnisse müssen zusammenhängend mit anderen Untersuchungen und Verfahren der Krankheitsdiagnose und Patientenbehandlung ausgewertet werden. Der PSA-Test sollte nicht anstelle regulärer klinischer Untersuchungen durchgeführt werden.

Die Kalibratoren des EIAGEN PSA Equi Kits sind nicht für PSA-Wiederfindungsstudien einzusetzen. Für derartige Studien wird die Verwendung stark erhöhter Patientenproben empfohlen.

Anti-Reagenz-Antikörper (humane Anti-Maus-Antikörper (HAMA) oder Heterophile Antikörper) in Patientenproben können den Test eventuell beeinflussen, obwohl der Puffer spezifische Blockierungsmittel enthält.

### 13.0 TESTCHARAKTERISTIKA

#### 13.1 PRÄZISION

Die insgesamt Testpräzision wurde laut NCCLS-Richtlinie EP5-A (9) bestimmt, indem 4 Gruppen gefrorenen, gemischten Humanserums mit zugegebenem PSA und sechs verschiedene EIAGEN PSA Equi Reagenzkombinationen verwendet wurden. Jede Probe wurde nach Zufallsprinzip pipettiert (n=2/Analyse) und 20 Tage lang zweimal täglich analysiert.

Probe	Replikate	Mittelwert µg/L	Intra-assay SD µg/L	Intra-Assay CV %	Inter-Tag SD µg/L	Inter-Tag CV %
PSA 1	80	1,42	0,04	2,7	0,03	2,2
PSA 2	80	5,92	0,13	2,2	0,06	1,0
PSA 3	80	14,2	0,35	2,5	0,12	0,8
PSA 4	80	39,2	0,60	1,5	0,60	1,5

#### 13.2 ERFASSUNGSGRENZE

Die untere Erfassungsgrenze des EIAGEN PSA Equi Kit liegt bei < 0,1 µg/l und wird laut der unten angegebenen Formel als die mit dem Mittelwert der OD-Werte von Kalibrator 0 plus 2 Standardabweichungen entsprechende Konzentration definiert:

$$(2 \times \text{SD CAL 0}) / (\text{OD CAL 2} - \text{OD CAL 0}) \times 2 \mu\text{g/L}$$

#### 13.3 WIEDERFINDUNG

Spitzenserumproben wurden durch Zugabe von Probenaliquoten mit stark erhöhtem PSA zu normalen männlichen Serumproben vorbereitet. Die Wiederfindung des Antigens lag im Bereich von ± 10 % der erwarteten Werte. HINWEIS: Die Kitkalibratoren sind zur Durchführung von Wiederfindungsstudien nicht geeignet.

#### 13.4 HOOK-EFFEKT

Bei Proben bis zu 23000 µg/l wurde kein Hook-Effekt beobachtet.

HINWEIS: Bei sehr hohen Proben wechselt die Farbe des Substrats von blau auf grün (bei extrem hohen Proben weiter auf gelb). Dies führt zu einer fälschlich niedrigen OD bei 620 nm; in Extremfällen kann die OD innerhalb der Kalibrierungskurve aufscheinen und als Hook registriert werden.

#### 13.5 LINEARITÄT

Patientenproben wurden mit normalem männlichem Humanserum verdünnt und analysiert. Die erhaltenen Werte lagen im Bereich von ± 10% der erwarteten Werte.

### 13.6 SPEZIFITÄT

Der EIAGEN PSA Equi Kit basiert auf den zwei Antikörpern (Maus, monoklonal) PSA10 und PSA66, die gegen zwei distinkte, sowohl im PSA-ACT-Komplex als auch in freiem PSA ausgesetzte Epitope gerichtet werden. Diese Antikörperkombination ergibt eine äquimolare Reaktion für freie PSA und den PSA-ACT-Komplex (7). Zur Bestimmung möglicher Beeinträchtigungen wurde nach der NCCLS-Richtlinie EP7-P (10) vorgegangen. Die folgenden Substanzen und Konzentrationen wurden getestet und als den Test nicht beeinträchtigend befunden.

	Konzentration ohne bedeutende (± 10 %) Beeinträchtigung
Lipämie (Intralipid®)	10 mg/ml
Bilirubin, unkonjugiert	0,6 mg/ml
Hämoglobin	5 mg/ml

### 14.0 AUTOMATISIERUNG

Anwendungsprotokolle für die korrekte Automatisierung (Personal Lab und Nexgen) der Adaltis Mikrotiterstreifen-Analysiergeräte sind auf Anfrage direkt von Adaltis verfügbar.

### 15.0 "TROUBLESHOOTING" (PROBLEMLÖSUNGEN)

Die genaue Einhaltung des Testverfahrens, spezifischer Anweisungen sowie die korrekte Verwendung von Reagenzien und der Einsatz geeigneter Pipettierverfahren reduzieren das Risiko der in der folgenden Tabelle angegebenen Fehlerquellen bedeutend.

PROBLEM	MÖGLICHE URSACHEN / HINWEISE ZUR BEHEBUNG
OD bedeutend unterschiedlich (± 50%) von auf QC angegebener OD	<ul style="list-style-type: none"> <li>falsche Reagenzolumina (Behebung: prüfen, ob das mit der Pipette verabreichte Volumen mit dem vom Test vorgeschriebenen übereinstimmt; Pipetten neu kalibrieren)</li> <li>Temperatur oder Inkubationszeit stimmen nicht (Behebung: genaue Einhaltung der Temperaturen/Zeiten; notieren Sie sich den Anfangszeitpunkt der Inkubation)</li> <li>Wasch- oder photometrischer Ablesefehler (Behebung: Betrieb und Einstellungen der jeweiligen Geräte überprüfen)</li> <li>Substratkontamination (Behebung: ausschließlich Einweg- und saubere Kunststoffbehälter verwenden)</li> </ul>
Nur geringe nachvollziehbare Ergebnisse	<ul style="list-style-type: none"> <li>inkonsistente Volumina von Proben oder Reagenzien (Behebung: Präzision der Pipetten prüfen und nachprüfen, ob das mit der Pipette verabreichte Volumen mit dem vom Test vorgeschriebenen übereinstimmt; Pipetten neu kalibrieren)</li> <li>Wasch- oder Ablesefehler (Behebung: Betrieb und Einstellungen der jeweiligen Geräte überprüfen)</li> <li>Substratkontamination (Behebung: ausschließlich Einweg- und saubere Kunststoffbehälter verwenden)</li> <li>Verschmutzung oder Verminderung von Reagenzien (Behebung: geeignete Spitzen, Einweg- und saubere Kunststoffbehälter für Reagenzien verwenden sowie ausschließlich erstklassiges destilliertes oder gleichwertiges Wasser verwenden)</li> </ul>
keine farbmetrische Reaktion nach Substratzugabe	<ul style="list-style-type: none"> <li>Reagenz teilweise nicht pipettiert</li> <li>starke Kontamination von Konjugat oder Substrat</li> <li>Fehlerhafte Testdurchführung (z.B. Reagenzien irrtümlicherweise in falscher Folge oder aus dem falschen Fläschchen pipettiert.)</li> </ul>
Reaktion (ODs) zu niedrig	<ul style="list-style-type: none"> <li>Konjugatverdünnung stimmt nicht</li> <li>Inkubationszeit zu kurz; Inkubationstemperatur zu niedrig</li> </ul>
Reaktion (ODs) zu hoch	<ul style="list-style-type: none"> <li>Konjugatverdünnung stimmt nicht</li> <li>Inkubationszeit zu lang; Inkubationstemperatur zu hoch</li> <li>unzureichende Wasserqualität des Waschpuffers (unzureichend deionisiert)</li> <li>unzureichende Waschung (Konjugate nicht ausreichend entfernt)</li> </ul>
unerklärbare Ausreißer	<ul style="list-style-type: none"> <li>Kontamination von Pipetten, Spitzen oder Behältern</li> <li>unregelmäßige und unzureichende Waschung (Konjugate nicht ausreichend entfernt)</li> </ul>
Intraassay-CV% zu hoch	<ul style="list-style-type: none"> <li>Reagenzien und/oder Streifen wurden vor Verwendung nicht auf Raumtemperatur gebracht.</li> <li>Scheibenwaschvorrichtung wäscht unzureichend (Behebung: Waschkopf reinigen)</li> </ul>
Interassay-CV% zu hoch	<ul style="list-style-type: none"> <li>unbeständige Inkubationsbedingungen (Zeit, Temperatur)</li> <li>Kontrollen und Proben werden nicht zur selben Zeit oder in denselben Zeitabständen verabreicht (Pipettierfolge überprüfen)</li> <li>personenbezogene Variationen</li> </ul>

### 16.0 LITERATURHINWEISE

- Wang MC, Valenzuela LA, Murphy GP, Chu TM (1979). Purification of a human prostate specific antigen. Invest Urol 17: 159-163.
- Lilja H. (1985). A kallikrein-like serine protease in prostatic fluid cleaves the predominant seminal vesicle protein. J Clin Invest 76: 1899-1903.
- Oesterling JE (1991). Prostate specific antigen: A critical assessment of the most useful tumor marker for adenocarcinoma of the prostate. J Urology 145: 907-923.
- Lilja H., Christensson A., Dahlén U., Matikainen M-T, Nilsson O., Pettersson K., Lövgren T. (1991). Prostate-specific antigen in serum occurs predominantly in complex with α1-antichymotrypsin. Clin Chem 37: 1618-1625.
- Christensson A., Björk T., Nilsson O., Dahlén U., Matikainen M-T., Cockett ATK, Abrahamsson PA, Lilja (1993). Serum prostate specific

antigen complexed to a1-antichymotrypsin as an indicator of prostate cancer. *J Urology* 150: 100–105.

6. Oesterling JE., Cooner WH., Jacobsen SJ., Guess HA., Lieber MM. (1993). The influence of patient age on the serum prostate. Specific antigen concentration: An important clinical observation. *Urol Clin North Am* 20: 671–80, 1993a.
7. Nilsson O., Peter A. Andersson I., Nilsson K., Grundström B., and Karlsson B. (1997) Antigenic determinants of prostatespecific antigen (PSA) and development of assays specific for different forms PSA. *Br J Cancer* 75(6): 789–797.
8. P Price C., Allard J., Davies G., Dawnay A., J Duffy M., France M., Mandarino G., Milford Ward A., Patel B., Sibley P. and Sturgeon C. Pre-and post-analytical factors that may influence use of serum prostate specific antigen and its isoforms in a screening programme for prostate cancer. *Ann Clin Biochem* 2001; 38: 188–216.
9. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices. Approved Guideline EP5-A (1999).
10. National Committee for Clinical Laboratory Standards, National Evaluation Protocols for Interference Testing, Evaluation protocol Number 7, Vol. 6, No 13, August (1986)



# EIAgen PSA Equi Kit

**REF** LI4027C


96 pruebas








**Adaltis Italia S.p.A.**  
 Via Cristoni, 12  
 40033 Casalecchio di Reno – (BO) Italia  
 Tel. +39-051-6136511 – Fax + 39-051-575280  
 www.adaltis.com

**PARA USO DIAGNÓSTICO IN VITRO ÚNICAMENTE**


Conservar a 2...8°C



## SÍMBOLOS UTILIZADOS EN LAS ETIQUETAS

<b>MTPLATE</b>	Microplaca
<b>CONJ HRP 20x</b>	Conjugado concentrado HRP
<b>BIOTIN Anti-PSA</b>	Anti-PSA Biotina
<b>CAL0</b>	Calibrador 0
<b>CAL1</b>	Calibrador 1
<b>CAL2</b>	Calibrador 2
<b>CAL3</b>	Calibrador 3
<b>CAL4</b>	Calibrador 4
<b>CAL5</b>	Calibrador 5
<b>CONTROL1</b> <b>CONTROL2</b>	Controles
<b>SOLN TMB</b>	Sustrato TMB
<b>SOLN STOP</b>	Solución de interrupción
<b>WASH BUF 25X</b>	Tampón de lavado concentrado
<b>LOT</b>	Número de lote
<b>REF</b>	Código de catálogo
	Fecha de caducidad (utilizar antes de...)
8°C	
	Límites de temperatura (conservar entre 2 y 8°C)
	Número de pruebas
	Mantener alejado de la luz
	Fabricado por
	Atención, consulte las Instrucciones de uso

**IVD** Dispositivo médico para diagnóstico in vitro (diagnóstico in vitro solamente)

### 1.0 USO PREVISTO

El EIAgen PSA Equi KIT permite la determinación cuantitativa del antígeno prostático específico (PSA) total en suero humano.

### 2.0 RESUMEN Y EXPLICACIÓN DE LA PRUEBA

El antígeno específico prostático (PSA) es una glicoproteína de cadena sencilla y peso molecular de 32 kDa con actividad de serín-proteasa similar a quimotripsina; es secretado por el epitelio de la glándula prostática (1). El PSA normalmente se secreta al líquido seminal y desempeña una función característica en la división de las proteínas de la vesícula seminal y para la licuefacción del coágulo seminal (2).

Normalmente, en el flujo sanguíneo hay presentes bajos niveles de PSA, y un aumento de su concentración sérica puede indicar una enfermedad prostática, incluida la hiperplasia prostática benigna (BPH) o el carcinoma de próstata (PCa). La determinación del PSA, que es considerado el marcador serológico idóneo para este tipo de cánceres (3,8), es ahora un método generalizado para la detección y tratamiento de pacientes con carcinoma prostático.

El PSA ha demostrado formar complejos estables con varias antiproteasas, y la mayor parte de PSA en el suero del paciente se encuentra en complejo con alfa-1-antiquimotripsina (PSA-ACT) (4). Sin embargo, existen grandes variaciones individuales en la proporción entre el PSA total y en su complejo PSA-ACT.

Los estudios también demuestran que la proporción de PSA libre es mayor en la enfermedad prostática benigna que en el cáncer de próstata (5). Los anticuerpos del EIAgen PSA Equi kit han sido evaluados y seleccionados cuidadosamente para dar la misma respuesta molar para el PSA libre que en complejo PSA-ACT (7). El EIAgen PSA Equi KIT ofrece un valor de PSA "total" verdadero que es independiente de las variaciones individuales de PSA libre y en complejo PSA-ACT.

### 3.0 PRINCIPIO DEL PROCEDIMIENTO

El EIAgen PSA Equi kit es un inmunoensayo no competitivo de fase sólida que se basa en la técnica de sandwich directo. Los calibradores, controles y muestras del paciente se incuban con anticuerpos monoclonales anti-PSA biotinilados y un isótopo radioactivo marcado con peroxidasa de rábano (HRP) en tiras de microtitulación sensibilizadas con estreptavidina. Después del lavado, se añade sustrato tamponado/reactivo cromogénico (peróxido de hidrógeno y 3,3',5,5' tetra - metilbenzidina) a cada pocillo y se deja que proceda la reacción enzimática. Se desarrollará un color azul si hay antígeno presente. La intensidad del color (densidad óptica, DO) es proporcional a la cantidad de PSA presente en las muestras. La intensidad del color se determina con un fotómetro de placa de microvaloración a 620 nm (como alternativa, a 405 nm después de añadir la solución de interrupción). Las curvas de calibración de cada ensayo se generan representando el valor de DO frente a la concentración respectiva de cada calibrador. La concentración de PSA en las muestras de pacientes se puede leer a partir de la curva de calibración.

### 4.0 CONTENIDO DEL KIT

#### 4.1 MICROPLACA (código 30PIA)

**MTPLATE**

1 microplaca de 12 tiras con 8 pocillos separables. Los pocillos están sensibilizados con estreptavidina. Después de abrir la microplaca, devuelva inmediatamente las tiras no utilizadas a la bolsa de aluminio con el desecante. Vuelva a sellar la bolsa para mantenerlas secas.

#### 4.2 CONJUGADO (código 30HRP)

**CONJ|HRP|20x**

1 frasco con 0,75 mL de solución (concentrada 20x) de conjugado HRP con un anticuerpo monoclonal anti-PSA de ratón, aproximadamente 20 µg/mL. Contiene conservantes.

Para mezclar con Anti-PSA Biotina antes del uso.

**Preparación de la solución de trabajo de conjugado (HRP- anti-PSA):**  
 Prepare la cantidad requerida de solución de trabajo mezclando 50 µL de conjugado concentrado 20x con 1 mL de anti-PSA biotina en cada tira (véase la siguiente tabla).

N° de tiras	CONJUGADO µl	Anti-PSA Biotina mL
1	50	1
2	100	2
3	150	3
4	200	4
5	250	5
6	300	6
7	300	7
8	400	8
9	450	9
10	500	10
11	550	11
12	600	12

Asegúrese de utilizar una botella limpia de plástico o de cristal para preparar la solución de trabajo de conjugado.

**Alternativa:** Vierta el contenido del conjugado concentrado 20x en el frasco de anti-PSA biotina y mezcle sin agitar. Asegúrese de transferir todo el conjugado al frasco de anti-PSA biotina.

**ALMACENAMIENTO:** esta solución de conjugado es estable durante 3 semanas a 2 - 8°C en un recipiente sellado. No prepare más cantidad de solución de trabajo de conjugado que la que vaya a utilizar en ese periodo y asegúrese de que es almacenada correctamente.

#### 4.3 Anti-PSA BIOTINA (código 30BT) **BIOTIN|Anti-PSA**

1 frasco con 15 mL de un anticuerpo monoclonal anti-PSA de ratón marcado con biotina, aproximadamente 1 µg/mL. Contiene solución salina de tampón fosfato (pH 7,2), albúmina sérica bovina, inmunoglobulina bovina, agentes bloqueantes, Tween 20, un colorante azul inactivo y metil-isotiazolone (MIT) al 0,01% como conservante.

[Listo para el uso.](#)

#### 4.4 CALIBRADORES

6 frascos con 0,75 mL de calibrador. Los calibradores contienen PSA humano en una solución salina de tampón Tris-HCl que contiene albúmina sérica bovina, un colorante amarillo inactivo y metil-isotiazolone (MIT) al 0,01% como conservante.

[Listo para el uso.](#)

Calibrador	Símbolo	Código	Concentración
Calibrador 0	<b>CAL0</b>	30CAL0	0 µg/L
Calibrador 1	<b>CAL1</b>	30CAL1	1 µg/L
Calibrador 2	<b>CAL2</b>	30CAL2	2 µg/L
Calibrador 3	<b>CAL3</b>	30CAL3	10 µg/L
Calibrador 4	<b>CAL4</b>	30CAL4	30 µg/L
Calibrador 5	<b>CAL5</b>	30CAL5	60 µg/L

#### Referencias

El 1<sup>er</sup> Estándar Internacional 96/670 puede utilizarse como el estándar de referencia.

Los valores de calibradores y controles para PSA se han establecido a partir de unos estándares de referencia internos cuyos valores cumplen el 1<sup>er</sup> Estándar Internacional.

#### 4.5 CONTROLES

Control	Símbolo	Código	
Control 1	<b>CONTROL1</b>	30CTRL1	1 frasco de 0,75 ml
Control 2	<b>CONTROL2</b>	30CTRL2	1 frasco de 0,75 ml

Cada uno de los controles contiene PSA humano en solución salina de tampón Tris-HCl que contiene albúmina sérica bovina y metil-isotiazolone (MIT) al 0,01% como conservante.

[Listo para el uso.](#)

#### 4.6 SUSTRATO TMB (código TMBB)

**SOLN|TMB**

1 frasco con 12 mL de peróxido de hidrógeno listo para utilizar y 3,3',5,5' tetra-metilbenzidina (TMB).

[Listo para el uso.](#)

#### 4.7 SOLUCIÓN DE INTERRUPCIÓN (código STOPB)

**SOLN|STOP**

1 frasco con 15 mL de ácido clorhídrico 0,12 M.

[Listo para el uso.](#)

#### 4.8 TAMPÓN DE LAVADO 25X (código TLAVB) **WASH|BUF|25X**

1 botella con 50 mL de tampón de lavado concentrado. El tampón concentrado contiene una solución salina de tampón Tris-HCl con Tween 20, y German II como conservante.

**Preparación de la solución de trabajo de tampón de lavado:** Vierta los 50 mL de tampón de lavado concentrado en un recipiente limpio y dilúyalo 25 veces añadiendo 1.200 mL de agua destilada o desionizada para obtener la solución de trabajo.

**ALMACENAMIENTO:** el tampón de lavado diluido es estable durante 2 semanas a 2 - 25°C en un recipiente sellado.

#### 5.0 CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD TRAS LA APERTURA INICIAL

- Conserve los componentes del kit a 2 - 8°C y no los utilice después de la fecha de caducidad indicada.
- Después del uso, guarde la microplaca herméticamente sellada, cierre las botellas con los tapones y conserve el kit a 2 - 8°C.
- El kit, después de abrirlo, se debe utilizar antes de la fecha de caducidad indicada en las etiquetas.

#### 6.0 MATERIALES Y EQUIPO NECESARIOS NO SUMINISTRADOS

- **Agitador de placa de microtitulación:** debe realizar una agitación casi vigorosa. En dirección longitudinal debe tener aproximadamente 200 impulsos/minuto, con 700—900 oscilaciones/minuto.
- **Dispositivo de lavado de placa de microtitulación:** sistema de lavado automático de placa con capacidad para 1 y 6 ciclos de lavado, o dispositivo de lavado semi manual de placa conectado a una bomba de aspiración o a un aspirador de chorro de agua y un filtro para retener el líquido aspirado. El sistema de lavado manual Nunc Immuno-8 está recomendado si no se dispone de un sistema de lavado automático de placa.
- **Fotómetro de placa de microtitulación:** con longitudes de onda de 620 nm y/o 405 nm, y de 450 nm para determinación ultrasensible (véase la sección 9.2, apartados B - J), con un rango de DO de 0 a 3,0.
- **Pipetas de precisión:** con puntas desechables de plástico para dispensar volúmenes en microlitros. Una pipeta de 8 vías o una pipeta con puntas desechables de plástico para dispensar 100 µL será útil pero no es indispensable. Pipetas para dispensar volúmenes en mililitros.
- **Agua destilada o desionizada:** para preparar la solución de lavado.
- **Otros:** depósitos de reactivos para pipetas de vías múltiples, toallas de papel y temporizador.

#### 7.0 ADVERTENCIAS O PRECAUCIONES

##### 7.1 MEDIDAS DE SEGURIDAD

- Todos los reactivos incluidos en este kit son para el uso diagnóstico in vitro solamente.
- Este ensayo sólo debe ser realizado por personal de laboratorio con experiencia mediante la aplicación de buenas prácticas de laboratorio (BPL).
- Para manipular sueros de pacientes, o productos a base de suero, es preciso llevar guantes e indumentaria de protección.
- Evite el contacto con reactivos que contengan peróxido de hidrógeno, ácido clorhídrico o conservantes, ya que pueden ser tóxicos por ingestión. No utilice la pipeta con la boca. No permita que los reactivos ni las muestras de pacientes entren en contacto con la piel o las mucosas. Si entrase en contacto con estas sustancias, lave inmediatamente la zona afectada con abundante agua. Evite las salpicaduras o la formación de aerosoles. Los utensilios de cristal reutilizables deben lavarse y aclararse bien para eliminar los restos de detergente.
- Las pruebas a que se han sometido los materiales para reactivos con componentes de origen humano demuestran la ausencia de anticuerpos contra el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH 1 y 2), el antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg) y HCV. Todos los materiales se analizan con métodos de ensayo aprobados por la FDA. Dado que no existe ningún método que garantice la total ausencia de VIH, HbsAg u otros agentes infecciosos, es recomendable adoptar las mismas precauciones que con las muestras extraídas a pacientes para manipular los productos de suero humano.
- Cumpla todos los reglamentos locales, regionales y nacionales sobre eliminación de residuos. Elimine los reactivos que contengan azida por el desagüe con abundantes cantidades de agua. Tenga precaución, ya que la azida sódica puede dar lugar a la formación de azidas explosivas por contacto prolongado con tuberías de cobre o plomo.

##### 7.2 PRECAUCIONES TÉCNICAS

###### A. Uso correcto de los reactivos

- Los datos representados se han obtenido mediante el uso de los reactivos que se indican en el folleto del envase. No utilice reactivos de otros fabricantes con los kits.
- No utilice reactivos de otros kits EIAgen con este kit, ni reactivos de lotes diferentes.
- No diluya ni adultere los reactivos a menos que esté indicado en el protocolo del kit.

- El **sustrato TMB** es muy sensible a la contaminación. El sustrato TMB HRP debe ser incoloro o ligeramente azulado. Si presenta un color azul, esto indica que se ha contaminado y debe eliminarse. Para una óptima estabilidad del sustrato TMB, vierta la cantidad que se requiere del frasco en un depósito muy limpio o, preferiblemente, una bandeja desechable de plástico, a fin de que el reactivo no se contamine. Asegúrese de utilizar puntas de plástico desechables limpias (o puntas de pipeta dispensadora).

#### B. Procedimiento de dispensado correcto

- Asegúrese de utilizar puntas desechables de plástico limpias y un método de dispensado adecuado cuando manipule las muestras y los reactivos. Para evitar cualquier transferencia de líquido, sostenga la punta de la pipeta ligeramente por encima del pocillo y no toque la tira de plástico ni la superficie del líquido. Un método de dispensado correcto es de gran importancia para manipular la solución de sustrato TMB HRP.

#### C. Procedimiento de lavado correcto

- Es necesario lavar las tiras antes del ensayo.
- Es importante lavar la microplaca. Un lavado incorrecto de los pocillos dará lugar a resultados erróneos.

**PROCEDIMIENTO DE LAVADO:** Es indispensable un procedimiento de lavado de las tiras cuidadoso. Compruebe que cada pocillo se ha llenado por completo hasta su borde superior, que la aspiración de los pocillos entre y después de los ciclos de lavado ha terminado, y que están secos. Si aún queda líquido, invierta la placa y golpéela ligeramente contra el papel absorbente.

**Sistema de lavado automático de tiras:** Siga las instrucciones del fabricante para el mantenimiento y cumpla el número de ciclos de lavado requerido antes y después de cada incubación. El dispositivo de aspiración/lavado no debe permanecer con la solución de lavado durante largos periodos de tiempo, ya que las agujas pueden obstruirse causando un débil suministro y aspiración del líquido.

#### D. Conformidad del procedimiento de ensayo y las especificaciones

- Siga estrictamente el protocolo de ensayo y aplique los tiempos de incubación, temperaturas y procedimientos de lavado señalados. Son pasos decisivos para el ensayo. No deje que los pocillos se sequen entre intervalos de incubación. Consulte también la sección 9.0\_PROCEDIMIENTO DE ENSAYO.
- Para verificar la estabilidad de los reactivos y la correcta realización de la prueba, incluya siempre controles positivos y negativos en cada ensayo. Los valores de DO obtenidos para los calibradores y la concentración de los controles siempre se deben comparar con los incluidos en la hoja de control de calidad. Consulte también la sección 10.1\_VALIDAZ DEL ENSAYO y la sección 10.2\_CONTROL DE CALIDAD.
- No utilice el kit para determinar valores que estén fuera del rango señalado en las Instrucciones de uso. Consulte también la sección 10.5\_RANGO DE MEDICIÓN.

### 8.0 EXTRACCIÓN Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS

El kit es para su uso con suero. Extraiga la sangre por venipunción y separe el suero mediante los procedimientos usuales. Las muestras pueden conservarse durante 24 horas a 2 - 8°C. Es necesario congelarlas a -20°C o una temperatura menor para periodos más prolongados. Las muestras no se deben almacenar en un congelador autodescongelante, ni se pueden descongelar y volver a congelar antes del análisis. Deje que las muestras congeladas se descongelen lentamente, preferiblemente durante la noche a 2 - 8°C, y que alcancen la temperatura ambiente antes del análisis.

## 9.0 PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

### 9.1 PREPARACIÓN DE REACTIVOS

- Espere a que todos los reactivos se encuentren a temperatura ambiente (20 - 25°C). El ensayo se debe realizar únicamente a una temperatura entre 20 y 25°C para obtener resultados correctos.
- Prepare la solución de trabajo del tampón de lavado como se describe en la sección 4.8
- Prepare la solución de trabajo del conjugado como se describe en la sección 4.2.
- Seleccione un número de micropocillos suficiente para el ensayo. Traslade la cantidad necesaria de tiras de la placa a un marco para tiras. (Devuelva las tiras no utilizadas inmediatamente a la bolsa de aluminio con el desecante y ciérrela herméticamente). Antes de empezar a dispensar los calibradores y las muestras del paciente, se recomienda marcar las tiras a fin de identificar claramente las muestras durante y después del ensayo.
- Realice todas las determinaciones por duplicado, tanto de los calibradores como de las muestras del paciente. Se debe generar una curva de calibración en cada ensayo.

**NOTA:** El calibrador 1 se utiliza cuando se desea una medición ultrasensible. Consulte las instrucciones en los apartados B y H de la sección 9.2.

## 9.2 USO DE LA PIPETA E INCUBACIÓN

- Lave** cada tira una vez con la solución de trabajo de tampón de lavado. No lave mayor número de tiras de las que puedan manipularse en 30 minutos.
- Dispense** por duplicado 25 µL de calibradores (CAL 0, 2, 3, 4, 5), controles (C1, C2) y muestras del paciente en los pocillos de las tiras.  
**NOTA:** Para la determinación ultrasensible de PSA en bajas concentraciones (0-10 µg/L) debe incluirse el CAL 1 (1 µg/L) en la curva de calibración. También será necesario excluir los dos calibradores más altos CAL 4 (30 µg/L) y CAL 5 (60 µg/L).
- Añada** 100 µL de solución de trabajo de conjugado en cada pocillo utilizando una pipeta de 100 µL (o una pipeta de 100 µL de 8 vías). Evite cualquier transferencia de líquido sosteniendo la punta de la pipeta ligeramente por encima del pocillo y no toque la tira de plástico ni la superficie del líquido.
- Incube** la placa durante 1 hora (± 10 min) a temperatura ambiente (20-25°C) agitándola constantemente con un agitador de placa de microtitulación.
- Aspire** la solución de incubación y **lave** 6 veces cada una de las tiras con la solución de trabajo de tampón de lavado siguiendo el procedimiento que se describe en el apartado C de la sección 7.2.
- Añada** 100 µL de sustrato TMB HRP en cada pocillo siguiendo el método de dispensado que se describe en el apartado C. El sustrato TMB se tiene que añadir tan rápido como sea posible a los pocillos, y el tiempo transcurrido entre el primer y último pocillo no debe ser superior a 5 minutos.
- Incube** durante 30 minutos (± 5 minutos) a temperatura ambiente agitando constantemente. Evite toda exposición a luz solar directa.
- Lea** enseguida la absorbancia a 620 nm en un fotómetro de placa de microvaloración.

**Opción 1:** si el laboratorio tiene disponible un fotómetro de placa con capacidad de lectura a 620 nm, la DO se puede determinar como sigue: añada 100 µL de solución de interrupción. Mezcle y lea la DO a 405 nm en un fotómetro de placa en 15 minutos después de añadir la solución de interrupción.

**Opción 2:** Para la determinación ultrasensible de PSA en bajas concentraciones de 0-10 µg/L (véase la NOTA en el apartado B), la medición de DO se efectúa como se describe en la Opción 1, pero con lectura a 450 nm.

## 10.0 CÁLCULO DE RESULTADOS

### 10.1 VALIDAZ DEL ENSAYO

Los controles 1 y 2 se utilizan también para validar las series de un ensayo. Los rangos de resultados previstos están indicados en las etiquetas de los frascos. Si se obtienen valores fuera del rango especificado, será necesario comprobar los reactivos y el funcionamiento del lector, además de repetir el análisis.

### 10.2 CONTROL DE CALIDAD

Cada laboratorio puede preparar sus propios pools de suero en distintos niveles, que sirven como controles internos para garantizar la precisión del ensayo.

Si los resultados no están incluidos en el rango previsto, tendrá que repetir el ensayo con controles recién preparados. Si tras comprobar el equipo, así como el cumplimiento del protocolo y el procedimiento de laboratorio, los resultados siguen estando fuera del rango especificado, tendría que solicitar ayuda al proveedor. Si los resultados no están incluidos en los rangos de aceptación, no los notifique.

### 10.3 REDUCCIÓN DE DATOS: MÉTODO AUTOMATIZADO

Si se utiliza un lector de fotómetro de placa con un programa incorporado de cálculo de datos, consulte el manual de instrucciones del lector y cree un programa con la concentración indicada en la etiqueta de cada calibrador. Para calcular automáticamente los resultados de PSA total, se recomienda uno de los siguientes métodos:

- Método de *spline cúbica*. Se debe incluir en la curva el calibrador 0 con valor de 0 µg/L.
- Método de *spline suavizada*. El calibrador 0 se utiliza para el ensayo en blanco de la placa.
- Interpolación con evaluación *punto a punto*. Se debe incluir en la curva el calibrador 0 con valor de 0 µg/L.

- Método de curva cuadrática. El calibrador 0 se incluye en la curva con valor de 0 µg/L.

**NOTA:** No se puede utilizar la regresión paramétrica cuadruple ni lineal.

#### 10.4 REDUCCIÓN DE DATOS: MÉTODO MANUAL

Para la evaluación manual, se genera una curva de calibración representando los valores de DO obtenidos para cada calibrador de PSA frente a la concentración de PSA correspondiente (en µg/L); véase la siguiente figura. Entonces, las concentraciones de PSA no conocidas se pueden leer en esta curva de calibración utilizando la DO media de cada muestra del paciente.

#### 10.5 RANGO DE MEDICIÓN

El EIAgen PSA Equi kit mide concentraciones entre 0,1 y 60 µg/L. Si se esperan concentraciones de PSA superiores al rango de medición, es recomendable diluir las muestras con suero humano de varón normal antes del análisis.

**NOTA:** El suero utilizado para esta dilución también se deberá medir a fin de determinar su concentración de PSA endógeno.

Si en un primer análisis los niveles de PSA son superiores a 60 µg/L, las muestras deben diluirse 1/10 con suero humano de varón normal y volver a analizarse para obtener su concentración de PSA precisa.

La concentración de PSA en muestras no diluidas se calcula como sigue:

$$\text{Dilución } 1/10 = 10 \times ([\text{PSA}]_{\text{Muestra diluida}} - (0,9 \times [\text{PSA}]_{\text{Suero de varón normal}}))$$

#### 11.0 VALORES ESPERADOS

Los varones sanos tienen unos valores de PSA esperados inferiores a 4 µg/L. Sin embargo, está demostrado que ocurren variaciones relacionadas con la edad (6, 8). Es recomendable que cada laboratorio establezca su propio rango de medición considerando los factores locales, como la dieta, el clima, la calidad de vida y la selección de los pacientes.

#### 12.0 LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

El nivel de PSA no debe considerarse una prueba evidente de la existencia o ausencia de enfermedades malignas. Los resultados de esta prueba deben interpretarse junto con otras investigaciones y procedimientos de diagnóstico y tratamiento del paciente. La prueba de PSA no puede reemplazar a ningún análisis clínico establecido.

Los calibradores del EIAgen PSA Equi kit no se deben utilizar en estudios de recuperación de PSA. Para estos estudios, se recomienda una muestra con alta concentración.

Los anticuerpos de los reactivos anti-PSA (el anticuerpo humano anti-ratón (HAMA) o anticuerpos heterófilos) en la muestra pueden interferir ocasionalmente con el ensayo, aunque el tampón contiene bloqueantes específicos.

#### 13.0 CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

##### 13.1 PRECISIÓN

La precisión total se ha determinado según la norma general EP5-A (9) de la NCCLS utilizando un pool de suero humano que contenía PSA añadido en cuatro concentraciones, y seis combinaciones distintas de reactivos del EIAgen PSA Equi kit. Cada muestra se dispuso aleatoriamente (n=2/análisis) y se analizó diariamente dos veces durante 20 días.

Muestra	Duplicados	Media µg/L	Intra-ensayo SD µg/L	Intra-ensayo CV%	Interdiario SD µg/L	Interdiario CV%
PSA 1	80	1,42	0,04	2,7	0,03	2,2
PSA 2	80	5,92	0,13	2,2	0,06	1,0
PSA 3	80	14,2	0,35	2,5	0,12	0,8
PSA 4	80	39,2	0,60	1,5	0,60	1,5

##### 13.2 LÍMITE DE DETECCIÓN

El límite de detección del EIAgen PSA Equi kit es < 0,1 µg/L y se define como la concentración que corresponde a los valores medios de DO para el calibrador 0 más dos desviaciones estándar, según la fórmula:

$$(2 \times \text{SD CAL } 0) / (\text{DO CAL } 2 - \text{DO CAL } 0) \times 2 \text{ µg/L}$$

##### 13.3 RECUPERACIÓN

Las muestras de suero se prepararon añadiendo fracciones de muestras de varón con niveles de PSA de muy elevados a normales. La recuperación del antígeno se mantuvo en un ±10% de los valores esperados. **NOTA:** No se deben realizar estudios de recuperación con los calibradores del kit.

##### 13.4 EFECTO DE HOOK

No se ha notificado el efecto de hook (gancho) con muestras de hasta 23.000 µg/L.

**NOTA:** En las muestras con alta concentración, el color del sustrato cambiará de azul a verdoso (eventualmente, de verdoso a amarillo si la concentración es muy elevada). Esto hará que se lea una DO falsamente baja a 620 nm, y

en casos extremos, la DO aparece incluida en el rango de la curva de calibración como un efecto de gancho.

#### 13.5 LINEALIDAD

Las muestras se diluyeron con suero humano de varón normal y se analizaron. Los valores obtenidos correspondieron en un ±10% a los valores esperados.

#### 13.6 ESPECIFICIDAD

El EIAgen PSA Equi kit se basa en dos anticuerpos monoclonales provenientes del ratón, PSA10 y PSA66, dirigidos contra dos antígenos determinantes encontrados tanto en el complejo PSA-ACT como en el PSA libre. Esta combinación de anticuerpos ofrece una respuesta equimolar para el PSA libre y el complejo PSA-ACT (7). La norma general EP7-P de la NCCLS (10) se ha cumplido para determinar las posibles causas de interferencia. Las siguientes sustancias y concentraciones se probaron sin que demostraran interferencia alguna con la prueba.

	Concentración sin interferencia significativa (± 10%)
Lipemia (Intralipid®)	10 mg/mL
Bilirrubina, no conjugada	0,6 mg/mL
Hemoglobina	5 mg/mL

#### 14.0 AUTOMATIZACIÓN

Puede solicitar directamente a Adaltis los protocolos aplicables para una correcta automatización (Personal Lab y Nexgen) de los analizadores de tiras de microtitulación Adaltis.

### 15.0 SUGERENCIAS PARA LA SOLUCIÓN DE PROBLEMAS

La adecuada aplicación de los procedimientos y las especificaciones del ensayo, así como un uso correcto de los reactivos y una dosificación apropiada, pueden evitar los siguientes errores.


ERROR	POSIBLE CAUSA / SUGERENCIAS
DO muy distinta ( $\pm 50\%$ ) de la indicada en el control de calidad	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Se ha dispensado un volumen de reactivos incorrecto (sugerencia: compruebe si el volumen dosificado por la pipeta se corresponde con el requerido para el ensayo; vuelva a calibrar las pipetas).</li> <li>- Temperatura o tiempo de incubación incorrectos (sugerencia: preste más atención al mantenimiento del incubador; anote el tiempo de inicio de la incubación).</li> <li>- Error de lavado o de lectura del fotómetro (sugerencia: compruebe el funcionamiento o los ajustes de ambos instrumentos).</li> <li>- Contaminación del sustrato (sugerencia: utilice recipientes desechables de plástico que estén limpios).</li> </ul>
Escasa reproducibilidad de resultados	<ul style="list-style-type: none"> <li>- El volumen dispensado de muestras o reactivos no es constante (sugerencia: compruebe la precisión de las pipetas y si el volumen dispensado se corresponde con el requerido para el ensayo; vuelva a calibrar las pipetas).</li> <li>- Error de lavado o de lectura (sugerencia: compruebe el funcionamiento o los ajustes de ambos instrumentos).</li> <li>- Contaminación del sustrato (sugerencia: utilice recipientes desechables de plástico que estén limpios).</li> <li>- Reactivos contaminados o degradados (sugerencia: utilice puntas adecuadas, recipientes desechables de plástico que estén limpios para los reactivos, y agua destilada de alta calidad o equivalente).</li> </ul>
No se produce reacción colorimétrica tras añadir el sustrato	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Algunos reactivos no se han dosificado.</li> <li>- Conjugado o sustrato muy contaminado.</li> <li>- Errores en la ejecución del ensayo (como dosificación accidental de reactivos en una secuencia equivocada o procedentes de un frasco equivocado, etc.)</li> </ul>
Escasa reacción (DO demasiado baja)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Dilución incorrecta del conjugado.</li> <li>- Intervalo de incubación demasiado corto, temperatura de incubación demasiado baja.</li> </ul>
Reacción exagerada (DO demasiado alta)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Dilución incorrecta del conjugado.</li> <li>- Intervalo de incubación demasiado largo, temperatura de incubación demasiado alta.</li> <li>- Calidad del agua del tampón de lavado insuficiente (bajo grado de desionización).</li> <li>- Lavado insuficiente (eliminación inadecuada de conjugados).</li> </ul>
Observaciones inexplicables	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Contaminación de las pipetas, puntas o recipientes.</li> <li>- Lavado insuficiente y no constante (eliminación inadecuada de conjugados).</li> </ul>
CV% intraensayo demasiado alto	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Los reactivos y/o tiras no se encontraban a temperatura ambiente antes de utilizarlos.</li> <li>- El sistema de lavado de la placa no funciona correctamente (sugerencia: limpie el cabezal del dispositivo).</li> </ul>
CV% interensayo demasiado alto	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Condiciones de incubación variables (tiempo, temperatura).</li> <li>- Controles y muestras no dispensados al mismo tiempo (según el mismo intervalo de tiempo) (compruebe la secuencia de dosificación).</li> <li>- Variación en función de la persona.</li> </ul>

### 16.0 BIBLIOGRAFÍA

1. Wang MC, Valenzuela LA, Murphy GP, Chu TM (1979). Purification of a human prostate specific antigen. Invest Urol 17: 159-163.
2. Lilja H. (1985). A kallikrein-like serine protease in prostatic fluid cleaves the predominant seminal vesicle protein. J Clin Invest 76: 1899-1903.
3. Oesterling JE (1991). Prostate specific antigen: A critical assessment of the most useful tumor marker for adenocarcinoma of the prostate. J Urology 145: 907-923.
4. Lilja H., Christensson A., Dahlén U., Matikainen M-T, Nilsson O., Pettersson K., Lövgren T. (1991). Prostate-specific antigen in serum occurs predominantly in complex with  $\alpha 1$ -antichymotrypsin. Clin Chem 37: 1618-1625.
5. Christensson A., Björk T., Nilsson O., Dahlén U., Matikainen M-T., Cockett ATK, Abrahamsson PA, Lilja (1993). Serum prostate specific antigen complexed to  $\alpha 1$ -antichymotrypsin as an indicator of prostate cancer. J Urology 150: 100-105.
6. Oesterling JE., Cooner WH., Jacobsen SJ., Guess HA., Lieber MM. (1993). The influence of patient age on the serum prostate. Specific antigen concentration: An important clinical observation. Urol Clin North Am 20: 671-80, 1993a.
7. Nilsson O., Peter A. Andersson I., Nilsson K., Grundström B., and Karlsson B. (1997) Antigenic determinants of prostatespecific antigen (PSA) and development of assays specific for different forms PSA. Br J Cancer 75(6): 789-797.
8. P Price C., Allard J., Davies G., Dawney A., J Duffy M., France M., Mandarino G., Milford Ward A., Patel B., Sibley P. and Sturgeon C. Pre- and post-analytical factors that may influence use of serum prostate specific antigen and its isoforms in a screening programme for prostate cancer. Ann Clin Biochem 2001; 38: 188-216.
9. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices. Approved Guideline EP5-A (1999).
10. National Committee for Clinical Laboratory Standards, National Evaluation Protocols for Interference Testing, Evaluation protocol Number 7, Vol. 6, No 13, August (1986)

# EIAgen PSA Equi Kit

**REF** LI4027C

 96 tests






**Adaltis Italia S.p.A.**  
Via Cristoni, 12  
40033 Casalecchio di Reno – (BO) Italy  
Tel. +39-051-6136511 – Fax + 39-051-575280  
www.adaltis.com


**SOLO PER USO DIAGNOSTICO IN VITRO**  0459


Conservare a 2...8 °C



## SIMBOLI UTILIZZATI SULLE ETICHETTE

<b>MTPLATE</b>	micropiastra
<b>CONJ HRP 20x</b>	coniugato HRP concentrato
<b>BIOTIN Anti-PSA</b>	Anti-PSA Biotina
<b>CAL0</b>	Calibratore 0
<b>CAL1</b>	Calibratore 1
<b>CAL2</b>	Calibratore 2
<b>CAL3</b>	Calibratore 3
<b>CAL4</b>	Calibratore 4
<b>CAL5</b>	Calibratore 5
<b>CONTROL1</b> <b>CONTROL2</b>	Controlli
<b>SOLN TMB</b>	substrato TMB
<b>SOLN STOP</b>	soluzione bloccante
<b>WASH BUF 25X</b>	soluzione di lavaggio concentrata
<b>LOT</b>	numero di lotto
<b>REF</b>	codice catalogo
	data di scadenza
 8°C 2°C	limitazioni di temperatura (conservare a 2...8°C)
	numero di determinazioni
	proteggere dalla luce solare
	Fabbricato da

 **Attenzione, leggere attentamente le istruzioni per l'uso**
**IVD** solo per uso diagnostico in vitro

 **Rischio biologico (ved. Sezione.7 avvertenze e precauzioni)**

### 1.0 FINALITÀ D'USO

Il kit EIAgen PSA Equi permette la determinazione quantitativa del PSA (Antigene Prostatico Specifico) totale nel siero umano.

### 2.0 INTRODUZIONE E SPIEGAZIONE DEL TEST

PSA, glicoproteina a singola catena di 32 kDa, è una proteasi serinica dotata di specificità chimotripsina simile. E' prodotta esclusivamente dall'epitelio secretorio della ghiandola prostatica (1). PSA è rilasciata generalmente nel fluido seminale, e gioca un ruolo fondamentale nella scissione proteolitica delle proteine delle vescicole seminali, e nella liquefazione del coagulo seminale (2). Solo piccole quantità di PSA sono normalmente presenti nel flusso sanguigno e un aumento delle sue concentrazioni nel siero può indicare patologie a livello prostatico quali l'iperplasia benigna (BPH) e il cancro. La determinazione di PSA è largamente impiegata per la rilevazione e la cura di pazienti con cancro alla prostata (PCa), poiché rappresenta il principale indicatore sierico per il carcinoma della prostata (3,8). Il PSA forma complessi stabili con differenti anti-proteasi, e la porzione circolante che predomina nel siero è un complesso con Alfa 1-antichimotripsina (PSA-ACT) (4). Tuttavia esistono notevoli differenze inter-soggettive nel bilancio PSA libero e complesso PSA-ACT. Studi hanno evidenziato che i livelli PSA libero sono più alti nelle forme benigne rispetto ai livelli che si registrano nel cancro della prostata (5).

Gli anticorpi del kit EIAgen PSA Equi sono stati accuratamente selezionati ed esaminati affinché garantiscano la stessa risposta molare per il PSA libero e per il complesso PSA-ACT (7). Il kit EIAgen PSA Equi permette la determinazione del PSA totale a prescindere dalle variazioni individuali del PSA libero e del complesso PSA-ACT.

### 3.0 PRINCIPIO DEL TEST

EIAgen PSA Equi è un saggio non-competitivo in fase solida basato sul principio "sandwich" per la determinazione di PSA Totale (PSA libero e PSA ACT complesso). I calibratori, i controlli ed i campioni dei pazienti sono incubati in pozzetti di una micropiastra, sensibilizzata con Streptavidina, insieme ad anticorpi monoclonali murini anti-PSA biotinilati, e ad altri anticorpi monoclonali murini anti-PSA coniugati con perossidasi di rafano (HRP). Durante l'incubazione il PSA presente nei campioni e nei calibratori viene legato contemporaneamente sia dagli anticorpi biotinilati che da quelli coniugati con HRP. L'immunocomplesso (sandwich) risultante si lega ai pozzetti della micropiastra sensibilizzata con Streptavidina attraverso la porzione biotinilata degli anticorpi monoclonali anti-PSA. Dopo il lavaggio si dispensa in ogni pozzetto il reagente substrato/cromogeno che durante la successiva incubazione evidenzia l'immunocomplesso rimasto legato al pozzetto tramite reazione enzimatica e colorimetrica. L'intensità della colorazione è proporzionale alla quantità di PSA presente nei campioni. La densità ottica (OD) delle soluzioni in ogni pozzetto è misurata tramite un fotometro per micropiastre a 620 nm (o a 405 nm dopo l'aggiunta della soluzione bloccante).

Per ogni dosaggio viene tracciata una curva di calibrazione facendo corrispondere ad ogni concentrazione dei calibratori il rispettivo valore di OD. La concentrazione di PSA libero per ogni campione viene ricavata per interpolazione sulla curva di calibrazione della rispettiva OD.

### 4.0 MATERIALI CONTENUTI NEL KIT

#### 4.1 MICROPIASTRA (codice 30PIA) **MTPLATE**

1 micropiastra con 12x8 pozzetti sensibilizzati con Streptavidina.  
Conservare la micropiastra nella confezione chiusa e in presenza dell'essiccante. Proteggere dall'umidità.

#### 4.2 CONIUGATO (codice 30HRP) **CONJ|HRP|20x**

1 fialone contenente 0.75 mL di soluzione concentrata 20X di anticorpo monoclonale murino Anti-PSA coniugato alla HRP (circa 20 µg/mL).  
Contiene conservanti.

Deve essere diluito con Biotin Anti- PSA prima dell'uso.

**Preparazione della soluzione di lavoro del Coniugato:** preparare la quantità richiesta di soluzione di lavoro del coniugato diluendo 50 µL di Coniugato concentrato 20x con 1 mL di Biotin Anti- PSA per strip (vedere la tabella sottostante).

N° of strips	CONIUGATO µl	Biotin Anti- PSA mL
1	50	1
2	100	2
3	150	3
4	200	4
5	250	5
6	300	6
7	350	7
8	400	8
9	450	9
10	500	10
11	550	11
12	600	12

Essere sicuri di utilizzare flaconi di plastica o di vetro per la preparazione della soluzione dell'anticorpo.

**Alternativa:** versare il contenuto del flacone contenente il Coniugato concentrato 20x nel flacone contenente il *Biotin Anti-PSA* e mescolare delicatamente. Assicurarsi che tutto il contenuto del Coniugato concentrato venga trasferito nel flacone del *Biotin Anti-PSA*.

**CONSERVAZIONE:** la soluzione di lavoro del coniugato è stabile per 3 settimane a 2–8°C in un contenitore sigillato. Non preparare più soluzione di lavoro del coniugato rispetto a quella che può essere utilizzata entro le 3 settimane.

#### 4.3 BIOTIN Anti-PSA (codice 30BT) BIOTINAnti-PSA

il flacone contiene 15 mL di anticorpo monoclonale biotinilato Anti-PSA murino, approssimativamente 1 µg/mL in tampone fosfato (pH 7.2), contenente albumina sierica bovina, immunoglobuline bovine, agenti bloccanti, Tween 20, un colorante blu inerte metil-isotiazolone (MIT) 0.01% come conservante.

Pronto all'uso.

#### 4.4 CALIBRATORI

6 flaconi contenenti 0.75 mL di calibratori contenenti PSA umano, in una soluzione tampone salina Tris-HCl con albumina sierica bovina, un colorante inerte giallo e metil-isotiazolone (MIT) 0.01% come conservante.

Pronti all'uso.

Le concentrazioni sono:

Calibratore	simbolo	codice	concentrazion e
Calibratore 0	<span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">CAL0</span>	30 CAL0	0 µg/L
Calibratore 1	<span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">CAL1</span>	30 CAL1	1 µg/L
Calibratore 2	<span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">CAL2</span>	30 CAL2	2 µg/L
Calibratore 3	<span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">CAL3</span>	30 CAL3	10 µg/L
Calibratore 4	<span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">CAL4</span>	30 CAL4	30 µg/L
Calibratore 5	<span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">CAL5</span>	30 CAL5	60 µg/L

#### Materiali di riferimento.

Il "1st International Standard 96/670" può essere usato come standard di riferimento. I valori di concentrazione dei calibratori e controlli sono assegnati contro un set di calibratori di riferimento interni tarati a loro volta contro il "1st International Standard".

#### 4.5 CONTROLLI

Controllo	simbolo	codice	
Controllo 1	<span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">CONTROL1</span>	30 CTRL1	1 flacone da 0.75 mL
Controllo 2	<span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">CONTROL2</span>	30 CTRL2	1 flacone da 0.75 mL

Ciascun controllo contiene l'antigene PSA umano in tampone tris-HCl contenente albumina sierica bovina e metilisotiazolone (MIT) 0.01% come conservante. Pronti all'uso.

#### 4.6 SUBSTRATO TMB (codice TMBB) SOLNTMB

1 flacone contenente 12 mL di perossido di idrogeno e 3,3',5,5' tetra-metilbenzidina (TMB).

Pronto all'uso.

#### 4.7 SOLUZIONE BLOCCANTE (codice STOPB) SOLNSTOP

1 contenente 15 mL of acido cloridrico 0.12M.

Pronto all'uso.

#### 4.8 SOLUZIONE DI LAVAGGIO 25X (codice TLAVB)

WASHBUF25X

1 flacone (50 mL) contenente una soluzione tampone salina Tris-HCl con Tween 20. Contiene German II come conservante. Concentrato 25X.

Diluire il contenuto del flacone fino a 1250 mL con acqua distillata prima dell'uso.

**Preparazione della soluzione di lavaggio diluita:** versare 50 mL di soluzione di lavaggio concentrata in un contenitore pulito e diluire 25 volte aggiungendo 1200 mL di con acqua distillata o deionizzata. Mescolare bene prima dell'uso.

**CONSERVAZIONE:** conservare questa soluzione a 2...8° C se non viene utilizzata immediatamente. La soluzione diluita è stabile a 2...25° C per 2 settimane in un contenitore sigillato.

#### 5.0 CONSERVAZIONE E STABILITÀ DOPO PRIMA APERTURA

- Conservare i componenti del kit a 2...8°C; non utilizzare dopo la data di scadenza indicata.
- Dopo l'utilizzo conservare la micropiastra nella sua confezione e chiudere bene i flaconi con i rispettivi tappi. Conservare il kit a 2...8°C
- Il kit una volta aperto deve essere utilizzato entro la data di scadenza riportata sulle etichette.

#### 6.0 MATERIALI E STRUMENTI NECESSARI NON FORNITI NEL KIT

- **Agitatore per micropiastre:** l'agitazione dovrebbe essere tra il medio e il vigoroso; l'agitazione longitudinale deve essere tarata sulle 200 strokes/min, e 700 - 900 oscillazioni/min.
- **Lavatore di micropiastre:** lavatore automatico di micropiastre in grado di eseguire 1 - 6 cicli di lavaggio o lavatore di micropiastre semi automatico collegato con una pompa a vuoto con contenitore per i liquidi aspirati. Si consiglia il lavatore di strip manuale Nunc Immuno-8 nel caso che un lavatore di micropiastre automatico non sia disponibile.
- **Fotometro per micropiastre:** lettore fotometrico con filtro 620 e/o 405 nm e 450 nm per determinazioni ultra sensibili (vedere par 9.2 punti B e J) ed un intervallo di OD da 0 a 3.0.
- **Pipette di precisione:** con puntali di plastica monouso in grado di dispensare in modo preciso microlitri. Utili, ma non indispensabili, per dispensare volumi di 100 µl sono le pipette a 8 canali. Sono necessarie anche delle pipette in grado di dispensare volumi dell'ordine del millilitro.
- **Acqua distillata o deionizzata** - per la preparazione della soluzione di lavaggio.
- **Altro:** Porta reattivi per pipette multi-canale, carta assorbente, timer.

#### 7.0 AVVERTENZE E PRECAUZIONI

##### 7.1 NORME DI SICUREZZA

- Tutti i reagenti in questo kit sono per uso diagnostico in vitro.
- Si raccomanda l'utilizzo di questo kit solo da parte di personale con esperienza e nel rispetto delle Norme di Buona Pratica di Laboratorio (GLP). Gli operatori devono indossare guanti ed abiti protettivi nel manipolazione dei sieri dei pazienti e dei prodotti a base di siero.
- I reagenti che contengono conservanti, perossido d'idrogeno, acido cloridrico possono essere tossici se ingeriti. Non pipettare con la bocca. Evitare il contatto dei reagenti o dei campioni con pelle e mucose. In caso di contatto, sciacquare abbondantemente con acqua. Evitare gli schizzi e la dispersione nell'aria.
- Lavare accuratamente la vetreria riutilizzabile e asciugarla in modo da eliminare ogni traccia di sapone.
- I materiali di origine umana usati per la preparazione di alcuni reagenti sono stati testati per controllare la presenza di Anticorpi contro il Virus dell'Immunodeficienza Umana (HIV 1 e 2) , e la presenza dell'Antigene di superficie dell'epatite B (HBsAg) e dell'Antigene dell'Epatite C e sono risultati negativi. Tutti i materiali sono stati analizzati con saggi approvati da FDA. Tuttavia, dal momento che nessun metodo può offrire completa garanzia sull'assenza di agenti infettivi, si raccomanda di manipolare tutti i prodotti contenenti materiale di origine umana con le stesse precauzioni utilizzate per i campioni dei pazienti.
- Eseguire lo smaltimento dei rifiuti seguendo le disposizioni e le leggi vigenti. Durante l'eliminazione dei reagenti contenenti sodio azide porre attenzione al fatto che la sodio azide può formare composti esplosivi a contatto prolungato con piombo e rame.

##### 7.2 PRECAUZIONI TECNICHE

###### A. Utilizzo corretto dei reagenti

- Le prestazioni qui riportate sono state ottenute impiegando i reagenti specifici elencati in queste istruzioni per l'uso. Non usare i reagenti provenienti da kit di altri produttori.
- Non utilizzare reagenti provenienti da altri kit EIAgen. Non usare reagenti provenienti da lotti diversi di kit.
- Non diluire o modificare i reagenti del kit, a meno che non sia descritto in questa metodica.
- il Substrato TMB può essere contaminato molto facilmente. Se ciò accidentalmente avviene diventa blu, in tal caso non usarlo e scartarlo.. Per una stabilità ottimale del Substrato, versare la quantità necessaria in un contenitore accuratamente pulito o preferibilmente in una vaschetta di plastica monouso.

###### B. Precauzioni per una corretta procedura di pipettamento

- Assicurarsi di usare pipette con puntali di plastica monouso ed usare una appropriata tecnica di pipettamento nel manipolare campioni e reattivi. Evitare la contaminazione del reattivo tenendo il puntale della pipetta leggermente al di sopra del bordo superiore del pozzetto, evitando di toccare la plastica della strip o la superficie del liquido.
- Una appropriata tecnica di pipettamento è particolarmente importante quando si maneggia il Substrato TMB.

###### C. Precauzioni per una corretta procedura di lavaggio

- Il pre-lavaggio delle strips è essenziale.
- Il lavaggio della micropiastra è un passaggio critico. Pozzetti non correttamente lavati possono causare risultati falsati del test.  
**PROCEDURA DI LAVAGGIO:** una attenta procedura di lavaggio delle strips è essenziale. Assicurarsi che ogni pozzetto sia completamente riempito fino al bordo superiore e che l'aspirazione del liquido nei pozzetti fra un lavaggio

e l'altro ed alla fine dei lavaggi sia completa in modo tale che i pozzetti siano completamente asciutti. In caso rimanga del liquido residuo nei pozzetti capovolgere la micropiastra, premendola attentamente sulla carta assorbente.

**Lavaggio automatico:** seguire le istruzioni del produttore per la manutenzione dello strumento usato ed effettuare il numero richiesto di cicli di lavaggio prima e dopo ogni incubazione. I sistemi di lavaggio ed aspirazione non devono essere lasciati per lunghi periodi a contatto con la soluzione di lavaggio in quanto gli ugelli potrebbero intasarsi compromettendo le operazioni di dispensazione.

#### D. Conformità alla procedura e alle specifiche

- Il protocollo del saggio deve essere seguito strettamente. Rispettare i tempi, la temperatura di incubazione e la procedura di lavaggio: questi passaggi sono critici. Non lasciare seccare i pozzetti fra un'incubazione e l'altra. Leggere attentamente la sezione 9.0\_PROCEDURA DEL SAGGIO
- Includere sempre il controllo positivo e negativo in ogni seduta analitica per controllare la stabilità dei reagenti e la corretta esecuzione del saggio. I valori ottenuti di OD dei calibratori e di concentrazione dei controlli, per la loro accettabilità, devono essere sempre confrontati con quelli riportati nel certificato di analisi. Leggere anche le sezioni 10.1\_VALIDITÀ DEL SAGGIO E 10.2\_CONTROLLO DI QUALITÀ.
- Non usare il kit per la determinazione di valori al di fuori del *range* indicato nelle istruzioni per l'uso. Leggere sezione 10.5\_INTERVALLO DI MISURA.

#### 8.0 RACCOLTA DEL CAMPIONE E CONSERVAZIONE

- Il kit richiede l'utilizzo di siero.
- Prelevare il sangue per via venosa e separare il siero seguendo la normale procedura.
- I campioni possono essere conservati a 2-8°C per 24 ore. Congelare i campioni a -20°C o al di sotto se i tempi di conservazione sono più lunghi.
- I campioni non devono essere conservati in un congelatore a scongelamento automatico.
- Evitare ripetuti cicli di congelamento e scongelamento.
- Scongelare i campioni lentamente, preferibilmente in frigorifero a 2-8°C durante la notte.

#### 9.0 PROCEDURA DEL TEST

##### 9.1 PREPARAZIONE DEI REAGENTI

- Lasciare che i reagenti raggiungano la temperatura ambiente (20...25°C). Per dare risultati attendibili il saggio deve essere eseguito a temperatura tra 20-25°C.
- Preparare la soluzione di lavaggio diluita (par. 4.8) e la soluzione di lavoro del coniugato (par. 4.2).
- Assicurarsi di aver preparato un numero sufficiente di pozzetti. Trasferire il numero necessario di strips nell'apposito supporto (riporre le restanti strips nella busta di alluminio contenente una sostanza disidratante e sigillare).
- Prima di dispensare i calibratori ed i campioni è consigliabile segnare le strips in modo tale da poterle facilmente identificare durante e dopo il dosaggio.
- Si raccomanda di eseguire la determinazione dei campioni in duplicato.
- Includere sempre la curva di calibrazione; in doppio, in ogni seduta.

**NOTA:** il Calibratore 1 dovrebbe essere incluso se si desiderano misure ultra sensibili. Leggere attentamente il par 9.2 punti B e H.

##### 9.2 PROCEDURA DI ESECUZIONE DEL SAGGIO

- Lavare** le strips una volta con la soluzione di lavaggio diluita. Non lavare un numero maggiore di strips rispetto a quelle che possono essere usate entro 30 min.
- Dispensare** in duplicato 25 µL di ogni calibratore (CAL 0, 2, 3, 4, 5), controllo (1 e 2) e dei campioni nei pozzetti;  
**NOTA:** per determinazioni ultra sensibili di PSA (nel range 0-10 µg/L) dovrebbe essere incluso nella curva di calibrazione anche il calibratore CAL 1 (1 µg/L). È poi necessario escludere i due calibratori più alti CAL 4 (30 µg/L) e CAL 5 (60 µg/L).
- Dispensare 100 µL di soluzione di lavoro del coniugato in ogni pozzetto usando la pipetta di precisione da 100 µl (o una pipetta di precisione a 8 canali).** Evitare la contaminazione mantenendo il puntale leggermente al di sopra del bordo del pozzetto senza toccare la plastica o la superficie del liquido.
- Incubare per 1 ora (± 10 min) a temperatura ambiente (20-25°C) in costante agitazione usando un agitatore di micropiastre.**
- Aspirare la soluzione di incubazione e lavare 6 volte i pozzetti con la soluzione di lavaggio diluita seguendo il procedimento di lavaggio descritto al punto 7.2.C.**
- Dispensare 100 µl di Substrato TMB in ogni pozzetto; usare la stessa procedura di pipettamento descritta al punto C; il substrato deve essere dispensato nei pozzetti il più in fretta possibile ed il tempo trascorso tra la dispensazione nel primo pozzetto e l'ultimo non deve superare i 5**

min.

- Incubare a temperatura ambiente per 30 minuti (± 5 min) con costante agitazione. Evitare l'esposizione diretta alla luce.**
- Leggere subito le OD a 620 nm con il lettore di micropiastre.**
- Opzione 1: Se non si può effettuare una lettura con fotometro capace di leggere a 620 nm, le OD possono essere determinate come segue:** aggiungere 100 µL di soluzione bloccante. Mescolare e leggere le OD a 405 nm con un fotometro da micropiastra entro 15 minuti (a partire dall'aggiunta della soluzione bloccante).

**Opzione 2:** Nel caso di determinazioni ultra sensibili di PSA (nel range 0-10 µg/L) (vedere nota al punto B), la misura delle OD dovrebbe essere eseguita come specificato nell'Opzione 1 ma leggendo a 450 nm.

#### 10.0 CALCOLO DEI RISULTATI

##### 10.1 VALIDITÀ DEL SAGGIO

I controlli 1 e 2 devono essere usati per validare la serie analitica. L'intervallo dei valori attesi è indicato sull'etichetta dei flaconi. Se i valori ottenuti sono al di fuori dell'intervallo atteso, deve essere effettuato un controllo completo della funzionalità dei reagenti e del lettore ed il dosaggio deve essere ripetuto. Vedere anche il paragrafo 10.2.

##### 10.2 CONTROLLO QUALITÀ

Ogni laboratorio inoltre dovrebbe preparare il proprio pool di sieri a differenti concentrazioni che può essere usato come controllo interno per assicurarsi delle prestazioni del dosaggio.

Se i risultati sono al di fuori dell'intervallo dei valori attesi ripetere il saggio utilizzando dei controlli preparati di fresco; se i risultati continuano ad essere al di fuori dell'intervallo atteso nonostante sia stata controllata l'aderenza alla procedura e l'efficienza della strumentazione, chiedere assistenza al fornitore. In risultati ottenuti per i pazienti non devono essere refertati se i controlli interni cadono al di fuori del range di accettabilità.

##### 10.3 ELABORAZIONE DEI DATI: METODO AUTOMATICO

Se è disponibile un lettore di micropiastre con procedimento di calcolo programmato consultarne il manuale e creare un programma usando le concentrazioni di PSA riportate sulle etichette di ogni calibratore.

Per il calcolo automatico dei risultati si raccomanda di usare uno dei seguenti metodi.

- il metodo di *fitting* con curva *Cubic spline*. Il calibratore 0 deve essere incluso nella curva con valore 0 µg/L.
- il metodo di *fitting* con curva *Spline smoothed*. Il calibratore 0 deve essere usato come bianco della micropiastra.
- Interpolazione con valutazione punto a punto. Il calibratore 0 deve essere incluso nella curva con valore 0 µg/L.
- il metodo di *fitting* con curva *quadratica*. Il calibratore 0 deve essere incluso nella curva con valore 0 µg/L.

**NOTA:** Non usare i metodi di valutazione 4 parametri o di regressione lineare.

##### 10.4 ELABORAZIONE DEI DATI: METODO MANUALE

La curva di calibrazione viene tracciata riportando su grafico i valori di densità ottica (OD) ottenuti per ogni calibratore contro la corrispondente concentrazione di PSA espressa in µg/L.

Le concentrazioni incognite di PSA possono quindi essere ricavate dalla curva di calibrazione per interpolazione del valore medio di OD di ogni campione.

##### 10.5 INTERVALLO DI MISURA

In kit EIAgen PSA Equi misura concentrazioni tra 0.1 e 60 µg/L. Se ci si aspetta che le concentrazioni di PSA nei campioni siano al di sopra di 60 µg/L, prima della esecuzione del test diluire i campioni 1/10 con un siero maschile con valori di PSA nel range di normalità.

**NOTA:** eseguire il test anche sul siero usato per la diluizione al fine di determinare la concentrazione del PSA Totale endogena.

La concentrazione di PSA nel campione non diluito è calcolata come:

$$\text{Diluizione } 1/10 = 10 \times ([\text{PSA}]_{\text{campione diluito}} - 0.9 \times [\text{PSA}]_{\text{siero normale}})$$

##### 11.0 VALORI ATTESI

Ci si aspetta che i soggetti in salute presentino valori di PSA al di sotto dei 4 µg/L. Tuttavia, si sono manifestate variazioni dovute all'età (6, 8). Si raccomanda a ciascun laboratorio di stabilire il proprio intervallo su cui basarsi per considerare alcuni fattori ambientali locali come ad esempio la dieta, il clima, le condizioni di vita, la tipologia dei pazienti, ecc.

##### 12.0 LIMITI DELLA PROCEDURA

I livelli di PSA non forniscono assoluta evidenza per la presenza od assenza di patologie maligne. I risultati del test devono essere interpretati alla luce di altri accertamenti e procedure diagnostiche per la definizione della diagnosi del paziente. La sola determinazione del PSA totale non deve sostituire qualsiasi esame clinico di validità consolidata.

I calibratori forniti nei kit EIAgen PSA Equi non possono essere impiegati per studi di recupero. Si raccomanda l'uso di campioni di pazienti ad elevate concentrazioni per studi di recupero.

Anticorpi diretti contro agenti contenuti nei reattivi (anticorpi umani anti topo HAMA o anticorpi eterofili) possono occasionalmente interferire nel dosaggio, anche se specifici agenti bloccanti sono contenuti nei tamponi.

### 13.0 CARATTERISTICHE DEL SAGGIO

#### 13.1 PRECISIONE

La precisione totale è stata determinata in accordo con linee guida NCCLS EP5-A (9) utilizzando 4 livelli di pool di sieri umani congelati con aggiunta di PSA e sei differenti combinazioni di reagenti EIAgen PSA Equi. Ogni campione è stato pipettato a caso (n=2/analisi) e testato due volte al giorno per 20 giorni.

campioni	replicati	media µg/L	Intra-saggio SD (µg/L)	Intra-saggio CV %	Inter-saggio SD (µg/L)	Inter-saggio CV %
PSA 1	80	1.42	0.04	2.7	0.03	2.2
PSA 2	80	5.92	0.13	2.2	0.06	1.0
PSA 3	80	14.2	0.35	2.5	0.12	0.8
PSA 4	80	39.2	0.60	1.5	0.60	1.5

#### 13.2 LIMITE DI RILEVAZIONE

Il limite di rilevazione del kit EIAgen Equi PSA è < 0.1 µg/L definito come la concentrazione corrispondente alla media dei valori di OD del calibratore 0 più 2 deviazioni standard secondo la formula

$$(2 \times \text{SD CAL } 0) / (\text{OD CAL } 2 - \text{OD CAL } 0) \times 2 \text{ } \mu\text{g/L}$$

#### 13.3 RECUPERO

Dei campioni di siero sono stati preparati aggiungendo aliquote diverse di un campione contenente alti livelli di PSA ad un siero maschile con livelli normali. Il recupero dell'antigene è stato entro il ±10% del valore atteso.

Note: La valutazione del recupero **non** deve essere effettuata utilizzando i calibratori del kit.

#### 13.4 EFFETTO GANCIO

Non si è verificato nessun effetto gancio in campioni fino a 23000 µg/L.

**NOTA:** in campioni molto concentrati il colore del substrato potrebbe cambiare da blu a verdastro (ed eventualmente in giallo in campioni estremamente concentrati). Questo potrebbe portare ad un valore di OD a 620 nm falsamente basso e in casi estremi il valore di OD potrebbe cadere all'interno dell'intervallo della curva di calibrazione e potrebbe essere interpretato come un effetto gancio.

#### 13.5 LINEARITÀ

Campioni di pazienti sono stati diluiti con siero maschile con livelli normali di PSA, e analizzati. I valori ottenuti sono stati entro ± 10% dei valori attesi.

#### 13.6 SPECIFICITÀ

L' EIAgen PSA Equi kit è basato su due anticorpi monoclonali PSA10 e PSA66, diretti contro due distinti epitopi esposti sul complesso PSA-ACT e PSA libero. Questa combinazione di anticorpi fornisce una risposta equimolare per il PSA libero e per il complesso PSA-ACT (7). La linea guida NCCLS EP7-P (10) è stata seguita per determinare le possibili fonti di interferenza.

Le seguenti sostanze sono state analizzate alle concentrazioni indicate e sono state trovate non interferenti nel saggio.

	Concentrazione con interferenza non significativa (± 10%)
Lipemia (Intralipid®)	10 mg/mL
Bilirubina libera	0.6 mg/mL
Emoglobina	5 mg/mL

#### 14.0 AUTOMAZIONE

I protocolli di applicazione per una corretta automazione sugli analizzatori (Personal Lab e Nexgen) Adaltis sono disponibili su richiesta diretta ad Adaltis.

#### 15.0 SUGGERIMENTI PER LA RISOLUZIONE DEI PROBLEMI

L'aderenza alla procedura e alle specifiche, così come il corretto uso dei reagenti e l'opportuna dispensazione possono evitare i seguenti tipi di errori.

ERRORE	POSSIBILI CAUSE e SUGGERIMENTI
OD molto diverse (± 50%) da quelle riportate nel QC	<ul style="list-style-type: none"> <li>errato volume di dispensazione dei campioni o dei reagenti (suggerimento: controllare la corrispondenza fra il volume impostato nelle pipette e quello richiesto dal saggio, tararle nuovamente)</li> <li>errata temperatura o errato tempo di incubazione (suggerimento: manutenzione più scrupolosa dell'incubatore, annotare all'inizio dell'incubazione)</li> <li>errore nell'esecuzione dei lavaggi e della lettura fotometrica (suggerimento: controllare il funzionamento o le impostazioni dei rispettivi strumenti)</li> <li>contaminazione del Substrato (suggerimento: usare contenitori di plastica monouso puliti)</li> </ul>
Risultati poco riproducibili	<ul style="list-style-type: none"> <li>volume di dispensazione dei reagenti e campioni non costante (suggerimento: controllare la precisione delle pipette e la corrispondenza tra il volume dispensato e quello richiesto dal saggio, nel caso tararle nuovamente)</li> <li>errore nell'esecuzione dei lavaggi e della lettura fotometrica (suggerimento: controllare il funzionamento o le impostazioni dei rispettivi strumenti)</li> <li>contaminazione del Substrato (suggerimento: usare contenitori di plastica monouso puliti)</li> <li>inquinamento o degradazione dei reagenti (suggerimenti: utilizzare puntali appropriati, contenitori per il travaso dei reagenti, monouso adatti e acqua distillata o equivalente)</li> </ul>
Nessuna reazione colorimetrica dopo l'aggiunta del Substrato.	<ul style="list-style-type: none"> <li>alcuni reagenti non sono stati dispensati</li> <li>forte contaminazione del coniugato o del Substrato</li> <li>Errata sequenza di esecuzione (es. dispensazione accidentale di reagenti in una sequenza sbagliata o dal contenitore sbagliato)</li> </ul>
Reazione troppo blanda (OD troppo basse)	<ul style="list-style-type: none"> <li>coniugati non diluiti correttamente</li> <li>tempo di incubazione troppo breve, temperature di incubazione troppo bassa</li> </ul>
Reazione troppo intensa (OD troppo alte)	<ul style="list-style-type: none"> <li>coniugati non diluiti correttamente</li> <li>tempo di incubazione troppo lungo o temperatura di incubazione troppo alta,-</li> <li>qualità scadente dell'acqua usata per la soluzione di lavaggio (basso grado di deionizzazione)</li> <li>lavaggio non efficiente (coniugato non propriamente rimosso)</li> </ul>
Inspiegabile risultati aberranti	<ul style="list-style-type: none"> <li>contaminazione delle pipette, dei puntali o dei contenitori</li> <li>lavaggio incostante e insufficiente (coniugato non propriamente rimosso)</li> </ul>
CV% intrasaggio elevato	<ul style="list-style-type: none"> <li>reagenti e/o strip non portate a temperatura ambiente prima dell'uso</li> <li>il lavatore per micropiastre non lava correttamente (suggerimento: pulire la testa del lavatore)</li> </ul>
CV% intersaggio elevato	<ul style="list-style-type: none"> <li>condizioni di incubazione non costanti (tempo o temperature)</li> <li>controlli e campioni non dispensati allo stesso tempo (con stessi intervalli; (suggerimento: controllare la sequenza di dispensazione)</li> <li>variabilità intrinseca degli operatori</li> </ul>

#### 16.0 RIFERIMENTI

- Wang MC, Valenzuela LA, Murphy GP, Chu TM (1979). Purification of a human prostate specific antigen. Invest Urol 17: 159-163.
- Lilja H. (1985). A kallikrein-like serine protease in prostatic fluid cleaves the predominant seminal vesicle protein. J Clin Invest 76: 1899-1903.
- Oesterling JE (1991). Prostate specific antigen: A critical assessment of the most useful tumor marker for adenocarcinoma of the prostate. J Urology 145: 907-923.
- Lilja H., Christensson A., Dahlén U., Matikainen M-T, Nilsson O., Pettersson K., Lövgren T. (1991). Prostate-specific antigen in serum occurs predominantly in complex with α1-antichymotrypsin. Clin Chem 37: 1618-1625.
- Christensson A., Björk T., Nilsson O., Dahlén U., Matikainen M-T., Cockett ATK, Abrahamsson PA, Lilja H. (1993). Serum prostate specific antigen complexed to α1-antichymotrypsin as an indicator of prostate cancer. J Urology 150: 100-105.
- Oesterling JE., Cooner WH., Jacobsen SJ., Guess HA., Lieber MM. (1993). The influence of patient age on the serum prostate. Specific antigen concentration: An important clinical observation. Urol Clin North Am 20: 671-80, 1993a.
- Nilsson O., Peter A. Andersson I., Nilsson K., Grundström B., and Karlsson B. (1997) Antigenic determinants of prostatespecific antigen (PSA) and development of assays specific for different forms of PSA. Br J Cancer 75(6): 789-797.
- P Price C., Allard J., Davies G., Dawnay A., J Duffy M., France M., Mandarino G., Milford Ward A., Patel B., Sibley P. and Sturgeon C. Pre-analytical factors that may influence use of serum prostate specific antigen and its isoforms in a screening programme for prostate cancer. Ann Clin Biochem 2001; 38: 188-216.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards, Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices. Approved Guideline EP5-A (1999).
- National Committee for Clinical Laboratory Standards, National Evaluation Protocols for Interference Testing, Evaluation protocol Number 7, Vol. 6, No 13, August (1986).

# EIAgen PSA Equi Kit

REF LI4027C  
testes



96

**Adaltis Italia S.p.A.**

Via Cristoni, 12  
40033 Casalecchio di Reno – (Bologna) Itália  
Tel.: +39-051-6136511 – Fax + 39-051-575280  
www.adaltis.com

**APENAS PARA USO DIAGNÓSTICO IN VITRO**



Conservar a 2...8°C

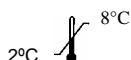


## SÍMBOLOS USADOS NOS RÓTULOS

MTPLATE	microplaca
CONJ HRP 20x	Conjugado HRP concentrado
BIOTIN Anti-PSA	Biotina Anti-PSA
CAL0	Calibrador 0
CAL1	Calibrador 1
CAL2	Calibrador 2
CAL3	Calibrador 3
CAL4	Calibrador 4
CAL5	Calibrador 5
CONTROL1 CONTROL2	Controlos
SOLN TMB	Substrato TMB
SOLN STOP	Solução de Paragem
WASH BUF 25X	Tampão de lavagem concentrado
LOT	Número de lote
REF	Código de catálogo



Prazo de validade (Usar até...)



Limite de temperatura (conservar a 2...8°C)



Número de testes



Conservar ao abrigo da luz solar



Fabricado por



Atenção, consulte as instruções de utilização



Dispositivo médico de diagnóstico in vitro (uso diagnóstico in vitro)



Riscos Biológicos (Consultar SECÇÃO 7 – Advertências Precauções).

## 1.0 UTILIZAÇÃO PREVISTA

O EIAgen PSA Equi foi concebido para a determinação quantitativa de antígeno prostático específico (PSA) total em amostras de soro humano.

## 2.0 RESUMO E EXPLICAÇÃO DO TESTE

A PSA é uma glicoproteína de cadeia única de 32 kDa com actividade de protease serina e uma especificidade do tipo da cimetripsina, produzida pelo epitélio secretório da glândula prostática (1). A PSA é normalmente segregada no fluido seminal e desempenha um papel importante na clivagem das proteínas da vesícula seminal e na liquefação do coágulo seminal (2).

Normalmente, só estão presentes na corrente sanguínea níveis baixos de PSA, pelo que, concentrações séricas crescentes indicam patologia da próstata, incluindo hiperplasia prostática benigna (HPB) e cancro da próstata (CaP). A determinação da PSA é, agora, extensamente usada para a detecção e tratamento dos doentes com cancro da próstata, sendo considerada o melhor marcador serológico para o cancro da próstata (3,8). Verificou-se que a PSA forma complexos estáveis com antiproteases diferentes e que a porção dominante de PSA no soro dos doentes ocorre no complexo com alfa1-antiquimotripsina (PSA-ACT) (4). No entanto, existem grandes variações na relação entre a PSA total e o complexo PSA-ACT, entre indivíduos diferentes.

Os estudos também indicaram que a proporção de PSA livre é maior na doença prostática benigna, quando comparado com o cancro da próstata (5). Os anticorpos no kit EIAgen PSA Equi foram cuidadosamente avaliados e seleccionados para fornecerem a mesma resposta molar tanto para a PSA livre como para o complexo PSA-ACT (7). Deste modo, kit EIAgen PSA Equi fornece um valor "total" verdadeiro da PSA, independentemente das variações individuais da PSA livre e ligada a ACT.

## 3.0 PRINCÍPIO DO TESTE

O kit EIAgen PSA Equi é um ensaio não competitivo, de fase sólida, baseado na técnica de sandwich directa. Os calibradores, os controlos e as amostras dos doentes são incubados juntamente com o anticorpo monoclonal anti-PSA biotilado e com o marcador peroxidase de amoníaco (HRP), em tiras de microtítulos cobertas com Estreptavidina. Após a lavagem, é adicionado a cada um dos poços o substrato/cromogénio (peróxido de hidrogénio e 3, 3', 5, 5' tetra - metilbenzidina) tamponado, ocorrendo de seguida a reacção enzimática. Durante a reacção enzimática desenvolve-se uma coloração azul na presença do antígeno. A intensidade da cor (Densidade óptica – D.O) é proporcional à quantidade de PSA presente nas amostras. A intensidade da cor é determinada numa placa de microtitulação.

espectrofotómetro a 620 nm (ou, opcionalmente, a 405 nm após a adição da solução de paragem). As curvas de calibração são construídas para cada ensaio desenhando o valor da D.O. versus a concentração de cada calibrador. As concentrações de PSA das amostras do paciente são, então, lidas a partir da curva de calibração.

## 4.0 CONTEÚDO DO KIT

### 4.1 MICROPLACA (código 30PIA)

MTPLATE

1 microplaca com 12 tiras de 8 poços divisíveis. Os poços são cobertos com estreptavidina. Após a abertura, coloque imediatamente as tiras não utilizadas dentro da embalagem de alumínio, que contém dessecante. Volte a selar a embalagem para manter as tiras secas.

### 4.2 CONJUGADO (código 30HRP)

CONJ|HRP|20x

1 frasco com 0,75 ml de solução Stock (concentrada 20x) de HRP conjugado com anticorpo monoclonal anti-PSA de rato (aproximadamente 20 µg/mL). Contém conservantes.

Para ser misturado com Biotina Anti-PSA antes da sua utilização.

**Preparação da solução de trabalho de conjugado (HRP- Anti-PSA):** Prepare a quantidade requerida de solução de trabalho de conjugado, misturando 50 µL de conjugado concentrado 20 x com 1 ml de biotina anti-PSA por tira (ver tabela abaixo).

Nº de tiras	CONJUGADO µl	Biotina Anti-PSA mL
1	50	1
2	100	2
3	150	3
4	200	4
5	250	5
6	300	6
7	300	7
8	400	8
9	450	9
10	500	10
11	550	11
12	600	12

Certifique-se de que utiliza um frasco de plástico ou vidro limpo, para preparação da solução de trabalho de conjugado.

**Alternativa:** Introduza o conteúdo do conjugado concentrado 20 x no frasco que contém biotina anti-PSA e misture suavemente. Certifique-se de que todo o conjugado é transferido para dentro do frasco de biotina anti-PSA.

**CONSERVAÇÃO:** a solução de trabalho de conjugado é estável durante 3 semanas a 2–8°C, num recipiente selado. Não prepare mais solução de trabalho de conjugado do que a quantidade que usará durante este período e certifique-se de que esta é conservada adequadamente.

**4.3 BIOTINA Anti PSA (código 30BT) [BIOTIN|Anti-PSA]**

1 frasco com 15 ml de anticorpo monoclonal anti-PSA, de rato, marcado com Biotina (aproximadamente 1 µg/ml). Contém tampão fosfato (pH 7,2), albumina de soro bovino, imunoglobulina de bovino, agentes bloqueadores, Tween 20, um corante azul inerte e 0,01% de metilisotiazolona (MIT), como conservante.

Pronto a usar.

**4.4 CALIBRADORES**

6 frascos contendo 0,75 ml de calibrador Os calibradores contêm PSA humana numa solução salina com tampão Tris-HCl, contendo albumina de soro bovino, um corante amarelo inerte e 0,01% de metilisotiazolona (MIT), como conservante.

Pronto a usar.

Calibrador	Símbolo	Código	concentração
Calibrador 0	CAL0	30CAL0	0 µg/L
Calibrador 1	CAL1	30CAL1	1 µg/L
Calibrador 2	CAL2	30CAL2	2 µg/L
Calibrador 3	CAL3	30CAL3	10 µg/L
Calibrador 4	CAL4	30CAL4	30 µg/L
Calibrador 5	CAL5	30CAL5	60 µg/L

**Material de referência**

O 1º Padrão Internacional 96/670 pode ser usado como um padrão de referência.

Os valores para os calibradores PSA e para os controlos foram atribuídos contra um conjunto de padrão de referência internos, cujos valores são rastreáveis até ao 1º Padrão Internacional.

**4.5 CONTROLOS**

Controlo	Símbolo	Código	
Controlo 1	CONTROL1	30CTRL1	1 frasco de 0,75 ml
Controlo 2	CONTROL2	30CTRL2	1 frasco de 0,75 ml

Cada um dos controlos contém PSA humana numa solução salina com tampão Tris-HCl, contendo albumina de soro bovino 0,01% de metilisotiazolona (MIT), como conservante.

Pronto a usar.

**4.6 SUBSTRATO TMB (código TMBB) [SOLN|TMB]**

Um frasco com 12 ml de peróxido de hidrogénio e 3,3',5,5' tetrametilbenzidina (TMB) pronto a usar.

Pronto a usar.

**4.7 SOLUÇÃO DE PARAGEM (código STOPB) [SOLN|STOP]**

1 frasco de 15 ml de 0,12 M de ácido clorídrico.

Pronto a usar.

**4.8 TAMPÃO DE LAVAGEM 25X (código TLAVB) [WASH|BUF|25X]**

1 frasco com 50 ml de concentrado de tampão de lavagem. O concentrado de tampão de lavagem contém uma solução salina de tampão Tris-HCl com Tween 20. Contém German II como conservante.

**Preparação da solução de trabalho de Tampão de Lavagem:** Introduza 50 ml de concentrado de Tampão de Lavagem num recipiente limpo e dilua-o 25 vezes adicionando 1200 ml de água destilada ou desionizada para obter uma solução de trabalho de Tampão de Lavagem.

**CONSERVAÇÃO:** a solução de trabalho de tampão de lavagem diluído é estável durante 2 semanas a 2-25°C, num recipiente selado.

**5.0 ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE APÓS A PRIMEIRA ABERTURA**

- Conserve os componentes do kit a 2-8°C e não os utilize após a data de expiração do prazo de validade indicada.
- Após a utilização, deve selar novamente a microplaca, colocar e apertar devidamente as tampas dos frascos e conservar o kit a 2-8°C.
- Os kits abertos devem ser usados dentro do prazo de validade indicado no rótulo.

**6.0 MATERIAIS E EQUIPAMENTO NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS**

- **Agitador de placa de microtítulos:** A vibração deve ser de intensidade média a vigorosa. Vibração longitudinal – aproximadamente 200 trepidações/minuto, oscilações 700-900/minuto.
- **Dispositivo de lavagem da placa de microtítulos:** Lavador de placa automático capaz de realizar 1 e 6 ciclos de lavagem, ou dispositivo de lavagem de placa de microtítulos semi-manual ligado a bomba de aspiração ou aspiração por jacto de água e um filtro de líquidos para reter o líquido aspirado. O sistema de lavagem manual de tiras Nunc

Immuno-8 é recomendado se não estiver a ser utilizado um dispositivo de lavagem automático de placas de microtítulos.

- **Espectrofotómetro de placa de microtítulos:** com um comprimento de onda de 620 nm e/ou 405 nm para determinação ultra-sensível (ver 9.2 itens B-J) e um intervalo de DO de 0 a 3.0.
- **Micropipetas de precisão:** com pontas de plástico descartáveis para distribuição de microlitros. É útil, mas não essencial, a utilização de uma pipeta de 8 canais ou pipeta distribuidora com pontas de plástico descartáveis para distribuição de 100 µL . Pipetas para distribuição de mililitros.
- **Água destilada ou desionizada:** Para preparação da Solução de Lavagem:
- **Outros:** reservatórios de reagentes para pipetas de multicanais, toalhas de papel e temporizador.

**7.0 ADVERTÊNCIAS OU PRECAUÇÕES**

**7.1 PRECAUÇÕES DE SEGURANÇA**

- Todos os reagentes deste kit destinam-se apenas a um uso diagnóstico "in vitro".
- Este teste apenas deverá ser utilizado por pessoal laboratorial experiente, devendo o manuseamento estar em conformidade com as boas práticas de laboratório.
- Os operadores deverão utilizar luvas e vestuário de protecção quando manusearem soros de pacientes ou produtos à base de soro.
- Evitar o contacto com reagentes que contenham peróxido de hidrogénio, ácido clorídrico e conservantes que podem ser tóxicos, se ingeridos. Não utilizar a boca na pipetagem. Evite o contacto de reagentes ou amostras de pacientes com a pele ou as membranas mucosas. Em caso de contacto, lave imediatamente a zona afectada com grandes quantidades de água. Evite os salpicos ou a criação de aerossóis. O material de vidro reutilizável deve ser devidamente lavado e enxaguado de modo a eliminar todos os detergentes.
- Os materiais utilizados na preparação de reagentes de origem humana foram testados e dados como negativos no que concerne à presença de anticorpos contra o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV 1 e 2), bem como no que diz respeito ao Antígeno de Superfície da Hepatite B (HBsAg) e HCV. Todo o material foi testado com métodos aprovados pela FDA. Dado que nenhuma metodologia de teste pode assegurar por completo a ausência do HIV, HBsAg ou de outros agentes infecciosos, recomenda-se que os produtos à base de soro humano sejam manuseados com as mesmas precauções habitualmente requeridas para as amostras de pacientes.
- Seguir os regulamentos locais, estaduais e nacionais no que respeita a eliminação de todos os resíduos. Para eliminar os reagentes que contêm azida, efectue as descargas com grandes quantidades de água. Elimine-os com a devida cautela, pois a azida de sódio pode formar compostos explosivos após um contacto prolongado com o cobre ou o chumbo das canalizações.

**7.2 PRECAUÇÕES TÉCNICAS**

**A. Utilização correcta dos reagentes**

- Os dados de desempenho aqui apresentados foram obtidos mediante a utilização de reagentes específicos indicados no folheto da embalagem. Não utilize reagentes de outros fabricantes nos kits.
- Não utilize reagentes de outros kits EIAgen com este kit. Não misture reagentes de lotes diferentes.
- Não dilua nem adultere os reagentes do kit, a menos que o protocolo do kit assim o exija.
- O Substrato TMB é muito sensível a contaminação. O substrato TMB HRP deve ser incolor ou ligeiramente azulado. Uma cor azul indica que o reagente foi contaminado e deve ser eliminado. Para a estabilidade óptima do Substrato TMB, passe a quantidade necessária do frasco para um recipiente cuidadosamente limpo ou, preferencialmente, para um tabuleiro de plástico descartável, para evitar a contaminação do reagente. Certifique-se de que está a utilizar pontas de plástico descartável para pipetas (ou pontas de pipeta distribuidora).

**B. Procedimento de pipetagem correcto**

- Certifique-se de que está a utilizar pontas de pipetas de plástico descartável limpas e uma técnica de pipetagem adequada, quando manusear as amostras e os reagentes. Evite fenómenos de "carry-over" segurando a ponta da pipeta ligeiramente acima do topo do poço e evite tocar na tira de plástico ou na superfície do líquido. Uma técnica de pipetagem adequada é de particular importância quando manusear o substrato TMB HRP.

**C. Procedimento de lavagem correcto**

- Efectue a pré-lavagem das tiras antes do ensaio ser necessário.
  - A lavagem das microplacas é extremamente importante. Poços mal lavados originam resultados erróneos.
- PROCEDIMENTO DE LAVAGEM:** É essencial um procedimento de lavagem cuidadoso das tiras. Certifique-se de que cada um dos poços é completamente cheio até a cima e que a aspiração dos poços entre os ciclos de lavagem e após os mesmos é completa e que os poços são secos. Se houver líquido ainda nos poços, inverta a placa por cima de papel absorvente e dê ligeiras pancadas.

**Lavador de placa automático:** Siga as instruções do fabricante no que respeita a manutenção do aparelho e efectue os ciclos de lavagem requeridos antes e após cada etapa de incubação. O dispositivo de lavagem/aspiração não deve ser deixado com Solução de Lavagem no seu interior durante longos períodos, dado que, as agulhas podem ficar obstruídas, efectuando a distribuição e a sucção do líquido de forma deficiente.

#### D. Cumprimento do procedimento e das especificações do ensaio

- O protocolo do teste deve ser rigorosamente seguido. Respeite as indicações relativas ao tempo de incubação, à temperatura e aos procedimentos de lavagem. São fases fundamentais. Não deixe secar os poços entre as incubações. Consulte também a secção 9.0\_PROCEDIMENTO DO ENSAIO.
- Inclua os controlos negativos e positivos em cada teste para monitorizar a estabilidade do reagente e o correcto desempenho do ensaio. Os valores de D.O. obtidos para os calibradores e os valores da concentração dos controlos devem ser sempre comparados com os valores indicados na ficha do Controlo de Qualidade. Consulte também as secções 10.1\_VALIDADE DO ENSAIO e 10.2\_CONTROLO DE QUALIDADE.
- Não utilize o kit para determinar valores que estejam fora do intervalo indicado nas Instruções de Utilização. Consulte também a secção 10.5\_INTERVALO DE MEDIÇÕES.

#### 8.0 COLHEITA E CONSERVAÇÃO DAS AMOSTRAS

O kit destina-se a ser usado com soro. Efectue a colheita do sangue por venipunctura e separe o soro de acordo com os procedimentos habituais. As amostras podem ser armazenadas a 2-8°C durante 24 horas. Para períodos mais longos conserve as amostras a -20°C ou abaixo. As amostras não devem ser conservadas num congelador auto-descongelável e não devem ser descongeladas e congeladas novamente antes da análise. Ponha as amostras congeladas a descongelar lentamente, de preferência a 2-8°C durante a noite e, em seguida, coloque-as à temperatura ambiente antes da análise.

#### 9.0 PROCEDIMENTO DO ENSAIO

##### 9.1 PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

- Deixe que todos os reagentes atinjam a temperatura ambiente (20-25°C). O ensaio só deve ser realizado com temperaturas entre 20-25°C para obter resultados exactos.
- Prepare a solução de trabalho de tampão de lavagem de acordo com o parágrafo 4.8
- Prepare a solução de trabalho de conjugado de acordo com o parágrafo 4.2;
- Selecione um número suficiente de micropoços para o teste. Transfira a quantidade necessária de tiras de placas de microtítulos para um suporte de tiras. (Coloque imediatamente as restantes tiras dentro da embalagem de alumínio que contém dessecante e sele-a com cuidado). Antes de iniciar a pipetagem dos calibradores e das amostras de doentes é aconselhável marcar as tiras para poder identificar mais claramente as amostras durante e após o ensaio.
- Efectue cada determinação em duplicado quer para os calibradores quer para as amostras de doentes. Deve ser realizada uma curva de calibração com cada um dos ensaios.

**NOTA:** O calibrador 1 é usado quando se pretende uma medição ultra-sensível. Consulte o parágrafo 9.2, itens B e H para obter instruções detalhadas.

##### 9.2 PASSOS DA PIPETAGEM E INCUBAÇÃO

- A. **Lave** todas as tiras uma vez com solução de trabalho de Tampão de Lavagem: Não lave mais tiras do que as que podem ser manuseadas nos 30 minutos seguintes.
- B. **Pipete**, em duplicado, 25 µL dos calibradores (CAL 0, 2, 3, 4, 5), Controlos (C 1, C 2) e amostras do doente para dentro dos poços das tiras;  
**NOTA** Para determinação ultra-sensível da PSA no intervalo baixo (0-10 µg/L), o CAL 1 (1 µg/L) deve ser incluído na curva de calibração. Deste modo, é necessário excluir os dois calibradores mais elevados CAL 4 (30 µg/L) e CAL 5 (60 µg/L).
- C. **Adicione** 100 µL de solução de trabalho de conjugado a cada poço usando uma pipeta de precisão de 100 µL (ou uma pipeta de precisão de 100 µL de 8 canais). Evite fenómenos de "carry-over" segurando a ponta da pipeta ligeiramente acima do topo do poço e evite tocar na tira de plástico ou na superfície do líquido.
- D. **Incube** a placa durante 1 hora (± 10 minutos) à temperatura ambiente (20-25°C), mantendo a placa em vibração constante usando um agitador de placas de microtítulos.
- E. **Aspire** a solução de incubação e lave cada uma das tiras 6 vezes com a solução de trabalho de Tampão de Lavagem, utilizando o procedimento de lavagem descrito na secção 7.2.C.

- F. **Adicione** 100 µL de Substrato TMB HRP a cada poço usando a mesma técnica de pipetagem que foi usada no item C. O substrato TMB deve ser adicionado aos poços o mais rapidamente possível e o tempo decorrido entre a adição ao primeiro e ao último poço não deve exceder 5 minutos.
- G. **Incube** durante 30 minutos (± 5 minutos) à temperatura ambiente com vibração constante. Evite a exposição à luz solar directa.
- H. Leia imediatamente a adsorção a 620 nm num espectrofotómetro de placas de microtítulos.

**Opção 1:** Se o laboratório não tiver acesso a um espectrofotómetro de placas de microtítulos capaz de efectuar a leitura a 620 nm, a D.O. pode ser determinada da seguinte forma: Adicione 100 µL de solução de paragem. Misture e leia a D.O. a 405 nm num espectrofotómetro de placas de microtítulo no espaço de 15 minutos após a adição da Solução de Paragem.

**Opção 2** para determinação ultra-sensível da PSA no intervalo baixo de 0-10 µg/L (ver NOTA no item B), as medições da D.O. devem ser efectuadas de acordo com a Opção 1, mas a leitura a 450 nm.

#### 10.0 CÁLCULO DE RESULTADOS

##### 10.1 VALIDADE DO ENSAIO

Os controlos 1 e 2 podem ser usados para a validação das séries de ensaios. Os intervalos de valores esperados são indicados nos rótulos dos frascos. Se forem obtidos valores que estejam fora do intervalo especificado, deve ser efectuada uma verificação completa dos reagentes e do desempenho do leitor e a análise deve ser repetida.

##### 10.2 CONTROLO DE QUALIDADE

Cada um dos laboratórios pode preparar, paralelamente, os seus próprios aglomerados de soro com níveis diferentes, que podem ser usados como controlos internos, de modo a assegurar a precisão do ensaio.

Se os resultados estiverem fora do limite esperado, repita o ensaio, utilizando controlos preparados de fresco. Se os resultados continuarem a situar-se fora do limite específico, e após uma verificação do equipamento, do cumprimento do protocolo e dos procedimentos laboratoriais, contacte o fornecedor para obter assistência. Não relate os resultados dos pacientes se os resultados dos controlos estiverem fora dos limites aceitáveis.

##### 10.3 REDUÇÃO DE DADOS: MÉTODO AUTOMÁTICO

Se for utilizado um espectrofotómetro de placas de microtítulos com um programa de cálculo de dados próprio, consulte o manual do leitor de placas e crie um programa usando a concentração indicada nos rótulos de cada calibrador.

Para o cálculo automático dos resultados da PSA Total, recomenda-se qualquer um dos seguintes métodos:

- Método *Cubic spline*: O calibrador deve ser incluído na curva com o valor 0 µg/L.
- Método curva *Spline smoothed*: O calibrador 0 deve ser usado como placa do branco.
- Interpolação com avaliação *ponto a ponto*. O calibrador deve ser incluído na curva com o valor 0 µg/L.
- Método *quadratic curve*: O calibrador deve ser incluído na curva com o valor 0 µg/L.

**NOTA:** A regressão linear ou o método *4-parametric* não devem ser utilizados.

##### 10.4 REDUÇÃO DE DADOS: MÉTODO MANUAL

Para avaliação manual, é construída uma curva de calibração desenhando os valores D.O. obtidos para cada calibrador da PSA, contra a correspondente concentração da PSA (em µg/L), ver figura abaixo. As concentrações da PSA desconhecidas podem, então, ser lidas a partir da curva de calibração usando o valor médio da D.O. de cada amostra de doente.

##### 10.5 INTERVALO DE MEDIÇÃO

O kit ElAgen PSA Equi mede concentrações que se encontrem entre 0,1 e 60 µg/L. Se for de esperar concentrações da PSA acima do intervalo de medição, recomenda-se a diluição das amostras com soro humano normal de homem antes da análise.

**NOTA:** O soro usado para diluição deve ser medido, de modo a determinar a concentração da PSA endógena.

Se as amostras, numa análise inicial, obtiverem níveis de PSA superiores a 60 µg/L, estas devem ser diluídas na proporção de 1/10 com soro humano normal de homem e re-analisadas, para se obter a concentração exacta de PSA.

A concentração de PSA da amostra não diluída é calculada como:

$$\text{Diluição } 1/10 = 10 \times ([PSA]_{\text{Amostra diluída}} - 0,9 \times [PSA]_{\text{Soro normal de homem}})$$

### 11.0 VALORES ESPERADOS

Nos homens saudáveis os valores esperados para a PSA devem ser inferiores a 4 µg/L. No entanto, verificou-se que ocorre variações relacionadas com a idade (6,8). Recomenda-se que cada laboratório estabeleça o seu próprio intervalo normal, tendo em consideração factores ambientais locais como a dieta, o clima, as condições de vida, a selecção do doente, etc.

### 12.0 LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

O nível de PSA não deve ser interpretada como evidência absoluta da presença ou ausência de doenças malignas. Os resultados deste teste devem ser interpretados apenas em conjunto com outras análises e procedimentos efectuados para o diagnóstico da doença e tratamento dos doentes. O teste da PSA não deve substituir qualquer exame clínico convencional.

Os calibradores do kit EIAGEN PSA Equi não devem ser usados em estudos de recuperação da PSA. Para os estudos de recuperação, recomenda-se a utilização de uma amostra de doente muito elevada.

Os anticorpos anti-reagentes (anticorpo anti-rato humano (HAMA) ou anticorpos heterofílicos) presentes na amostra do doente podem interferir, ocasionalmente, com o ensaio, embora o tampão contenha agentes bloqueadores específicos.

### 13.0 CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

#### 13.1 PRECISÃO

A precisão total foi determinada de acordo com a norma EP5-A (9) do NCCLS, usando quatro níveis de aglomerado de soro humano congelado, contendo PSA adicionada e seis combinações de reagentes EIAGEN PSA Equi diferentes. Cada uma das amostras foi pipetada aleatoriamente (n=2/análise) e analisada duas vezes por dia durante 20 dias.

Amostra	Réplicas	Média µg/L	Intra-ensaio DP µg/L	Intra-ensaio CV %	Entre dias DP µg/L	Entre dias CV %
PSA 1	80	1.42	0.04	2.7	0.03	2.2
PSA 2	80	5.92	0.13	2.2	0.06	1.0
PSA 3	80	14.2	0.35	2.5	0.12	0.8
PSA 4	80	39.2	0.60	1.5	0.60	1.5

#### 13.2 LIMITE DE DETECÇÃO

O limite de detecção do kit EIAGEN PSA equi é < 0.1 µg/L, definido como a concentração correspondente à média dos valores da D.O. do calibrador 0 mais dois desvios padrão, de acordo com a fórmula:

$$(2 \times DP \text{ CAL } 0) / (D.O. \text{ CAL } 2 - D.O. \text{ CAL } 0) \times 2 \mu\text{g/L}$$

#### 13.3 RECUPERAÇÃO

As amostras séricas fortalecidas foram preparadas através da adição de alíquotas de amostras com concentrações de PSA muito elevadas a amostras de soro normal de homem. A recuperação do antígeno estava dentro de ± 10% dos valores esperados. NOTA: Os estudos de recuperação não devem ser realizados com os calibradores do kit.

#### 13.4 EFEITO DE GANCHO

Não se observou qualquer efeito de gancho com amostras até 23000 µg/L. **NOTA:** Em amostras com concentrações muito elevadas a cor do substrato passará de azul para esverdeado (e, eventualmente, amarelo no caso de amostras extremamente elevadas). Tal levará a uma D.O. falsamente baixa a 620 nm, e em casos extremos a D.O. pode encontrar-se dentro do intervalo da curva de calibração e ser vista como um gancho.

#### 13.5 LINEARIDADE

As amostras dos doentes foram diluídas com soro humano normal de homem e, posteriormente, analisadas. Os valores obtidos estavam dentro de ± 10% dos valores esperados:

#### 13.6 ESPECIFICIDADE

O KIT EIAGEN PSA Equi tem por base dois anticorpos monoclonais de rato - PSA10 e PSA66 -, direccionados contra dois epítopos distintos, ambos expostos no complexo PSA-ACT e na PSA livre. Esta combinação de anticorpo fornece uma resposta equimolar à PSA livre e ao complexo PSA-ACT (7). A norma EP7-P (10) do NCCLS foi seguida, para evitar possíveis fontes de interferência. Testaram-se as seguintes substâncias e concentrações, tendo-se verificado que estas não interferiam com o teste.

	Concentração sem interferência significativa (± 10%)
Lipemia (Intralipid®)	10 mg/ml
Bilirrubina, não conjugada	0,6 mg/ml
Hemoglobina	5 mg/ml

#### 14.0 AUTOMATIZAÇÃO

A Adaltis está disponível para fornecer, mediante pedido, os protocolos de aplicação relativos à automatização adequada (Personal Lab and Nexgen) nos analisadores de microplacas Adaltis.

### 15.0 SUGESTÕES PARA RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS

O cumprimento do procedimento e das especificações do ensaio, bem como uma utilização correcta dos reagentes e uma pipetagem adequada, ajudará a evitar os seguintes erros.

ERRO	POSSÍVEIS CAUSAS / SUGESTÕES
DO muito diferente (± 50%) da DO indicada no CQ	<ul style="list-style-type: none"> <li>- dispensação incorrecta do volume de reagentes (sugestão: verifique a correspondência entre o volume dispensado pela pipeta e o volume necessário ao ensaio; calibre novamente as pipetas)</li> <li>- temperatura incorrecta ou tempo de incubação incorrecto (sugestão: tenha mais cuidado com a manutenção da incubadora; anote o horário de início da incubação)</li> <li>- erro na lavagem ou na leitura do espectrofotómetro (sugestão: verifique o funcionamento ou as definições dos respectivos aparelhos)</li> <li>- contaminação do Substrato (sugestão: utilize apenas recipientes de plástico descartáveis e limpos)</li> </ul>
Baixos resultados reprodutíveis	<ul style="list-style-type: none"> <li>- dispensação irregular do volume das amostras ou reagentes (sugestão: verifique a precisão das pipetas e a correspondência entre o volume dispensado pela pipeta e o volume necessário ao ensaio; calibre novamente as pipetas)</li> <li>- erro na lavagem ou na leitura (sugestão: verifique o funcionamento ou as definições dos respectivos aparelhos)</li> <li>- contaminação do Substrato (sugestão: utilize apenas recipientes de plástico descartáveis e limpos)</li> <li>- poluição ou degradação dos reagentes (sugestão: utilize pontas adequadas, recipientes de plástico descartáveis e limpos para os reagentes e água destilada ou água equivalente de alta qualidade)</li> </ul>
Nenhuma reacção colorimétrica após a adição do substrato	<ul style="list-style-type: none"> <li>- alguns reagentes não foram pipetados</li> <li>- forte contaminação do conjugado ou do Substrato</li> <li>- erros na execução do procedimento do ensaio (ex.: pipetagem accidental dos reagentes numa sequência incorrecta ou a partir do frasco errado, etc.)</li> </ul>
Reacção demasiado baixa (D.O.s demasiado baixas)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- diluição incorrecta do conjugado</li> <li>- tempo de incubação demasiado curto, temperatura da incubação demasiado baixa</li> </ul>
Reacção demasiado alta (D.O.s demasiado altas)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- diluição incorrecta do conjugado</li> <li>- tempo de incubação demasiado longo, temperatura de incubação demasiado alta</li> <li>- baixa qualidade da água para o tampão de lavagem (baixo grau de desionização)</li> <li>- lavagem insuficiente (conjugados removidos de forma inapropriada)</li> </ul>
aspectos inexplicáveis	<ul style="list-style-type: none"> <li>- contaminação das pipetas, pontas ou recipientes</li> <li>- lavagem irregular e insuficiente (conjugados removidos de forma inapropriada)</li> </ul>
CV% intra-ensaio demasiado alto	<ul style="list-style-type: none"> <li>- os reagentes e/ou tiras não alcançaram a temperatura ambiente antes da utilização</li> <li>- O sistema de lavagem da placa não está a lavar devidamente (sugestão: limpe a cabeça do sistema de lavagem)</li> </ul>
CV% entre ensaios demasiado alto	<ul style="list-style-type: none"> <li>- condições de incubação não constantes (tempo, temperatura)</li> <li>- controlos e amostras não dispensados ao mesmo tempo (com os mesmos intervalos) (verificar a ordem da pipetagem)</li> <li>- variação relacionada com as pessoas intervenientes</li> </ul>

### 16.0 BIBLIOGRAFIA

1. Wang MC, Valenzuela LA, Murphy GP, Chu TM (1979). Purification of a human prostate specific antigen. Invest Urol 17: 159-163.
2. Lilja H. (1985). A kallikrein-like serine protease in prostatic fluid cleaves the predominant seminal vesicle protein. J Clin Invest 76: 1899-1903.
3. Oesterling JE (1991). Prostate specific antigen: A critical assessment of the most useful tumor marker for adenocarcinoma of the prostate. J Urology 145: 907-923.
4. Lilja H., Christensson A., Dahlén U., Matikainen M-T, Nilsson O., Pettersson K., Lövgren T. (1991). Prostate-specific antigen in serum occurs predominantly in complex with a1-antichymotrypsin. Clin Chem 37: 1618-1625.
5. Christensson A., Björk T., Nilsson O., Dahlén U., Matikainen M-T., Cockett ATK, Abrahamsson PA, Lilja (1993). Serum prostate specific antigen complexed to a1-antichymotrypsin as an indicator of prostate cancer. J Urology 150: 100-105.
6. Oesterling JE., Cooner WH., Jacobsen SJ., Guess HA., Lieber MM. (1993). The influence of patient age on the serum prostate. Specific antigen concentration: An important clinical observation. Urol Clin North Am 20: 671-80, 1993a.
7. Nilsson O., Peter A. Andersson I., Nilsson K., Grundström B., and Karlsson B. (1997) Antigenic determinants of prostate-specific antigen (PSA) and development of assays specific for different forms PSA. Br J Cancer 75(6): 789-797.
8. P Price C., Allard J., Davies G., Dawney A., J Duffy M., France M., Mandarino G., Milford Ward A., Patel B., Sibley P. and Sturgeon C. Pre-and post-analytical factors that may influence

use of serum prostate specific antigen and its isoforms in a screening programme for prostate cancer. *Ann Clin Biochem* 2001; 38: 188–216.

9. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices. Approved Guideline EP5-A (1999).
10. National Committee for Clinical Laboratory Standards, National Evaluation Protocols for Interference Testing, Evaluation protocol Number 7, Vol. 6, No 13, August (1986)