



## Instructions for Use

# PSA Total ELISA

IVD

CE<sub>0197</sub>

REF EIA-3719

Σ 96



**DRG Instruments GmbH**, Germany  
Frauenbergstraße 18, 35039 Marburg  
Phone: +49 (0)6421-1700 0, Fax: +49 (0)6421-1700 50  
Website: [www.drg-diagnostics.de](http://www.drg-diagnostics.de)  
E-mail: [drg@drg-diagnostics.de](mailto:drg@drg-diagnostics.de)

Distributed by:



**DRG International, Inc.**, USA  
841 Mountain Ave., Springfield, NJ 07081  
Phone: (973) 564-7555, Fax: (973) 564-7556  
Website: [www.drg-international.com](http://www.drg-international.com)  
E-mail: [corp@drg-international.com](mailto:corp@drg-international.com)

**Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit.  
Verwenden Sie nur die jeweils gültige, im Testkit enthaltene, Gebrauchsanweisung.  
Si prega di usare la versione valida delle istruzioni per l'uso a disposizione con il kit.  
Por favor, use sólo la versión válida de las instrucciones de uso que se suministran con el kit.  
Utilisez seulement la version valide des Instructions d'utilisation fournies avec le kit.**

**Table of Contents / Inhaltsverzeichnis / Tabella die Contenuti / Tabla de Contenidos / Table des matières**

|    |   |    |    |  |    |
|----|---|----|----|--|----|
| 1  | INTENDED USE.....                         | 2  | 1  | FINALIDAD PREVISTA .....                   | 28 |
| 2  | PRINCIPLE OF THE TEST .....               | 2  | 2  | FUNDAMENTO DEL ENSAYO .....                | 28 |
| 3  | WARNINGS AND PRECAUTIONS .....            | 3  | 3  | PRECAUCIONES .....                         | 28 |
| 4  | REAGENTS.....                             | 4  | 4  | COMPONENTES DEL KIT .....                  | 29 |
| 5  | SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION ..... | 5  | 5  | MUESTRAS .....                             | 30 |
| 6  | ASSAY PROCEDURE.....                      | 5  | 6  | PROCEDIMIENTO DE ENSAYO .....              | 30 |
| 7  | EXPECTED NORMAL VALUES .....              | 7  | 7  | VALORES ESPERADOS .....                    | 32 |
| 8  | QUALITY CONTROL.....                      | 7  | 8  | CONTROL DE CALIDAD.....                    | 32 |
| 9  | PERFORMANCE CHARACTERISTICS .....         | 8  | 9  | CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO .....           | 33 |
| 10 | LIMITATIONS OF USE.....                   | 9  | 10 | LIMITACIONES DE USO.....                   | 33 |
| 11 | LEGAL ASPECTS .....                       | 10 | 11 | ASPECTOS LEGALES .....                     | 34 |
|    |   |    |    |  |    |
| 1  | ZWECKBESTIMMUNG .....                     | 11 | 1  | UTILISATION PRÉVUE.....                    | 35 |
| 2  | TESTPRINZIP .....                         | 11 | 2  | PRINCIPE DU TEST .....                     | 35 |
| 3  | VORSICHTSMAßNAHMEN .....                  | 12 | 3  | AVERTISSEMENTS ET PRECAUTIONS .....        | 35 |
| 4  | BESTANDTEILE DES KITS .....               | 13 | 4  | RÉACTIFS .....                             | 36 |
| 5  | PROBENVORBEREITUNG .....                  | 14 | 5  | PRÉLÈVEMENT ET PRÉPARATION DES SPÉCIMENS.. | 37 |
| 6  | TESTDURCHFÜHRUNG .....                    | 14 | 6  | RÉALISATION DU TEST.....                   | 37 |
| 7  | ERWARTETE WERTE .....                     | 16 | 7  | VALEURS NORMALES ATTENDUES.....            | 39 |
| 8  | QUALITÄTSKONTROLLE.....                   | 16 | 8  | CONTROLE DE QUALITE .....                  | 39 |
| 9  | ASSAY-CHARAKTERISTIKA.....                | 17 | 9  | CARACTERISTIQUES DES PERFORMANCES .....    | 40 |
| 10 | GRENZEN DES TESTS.....                    | 17 | 10 | LIMITES D'UTILISATION .....                | 40 |
| 11 | RECHTLICHE GRUNDLAGEN .....               | 19 | 11 | ASPECTS JURIDIQUES .....                   | 41 |
|    |   |    |    |  |    |
| 1  | DESTINAZIONE D'USO.....                   | 20 | 12 | REFERENCES / LITERATURE.....               | 42 |
| 2  | PRINCIPIO DEL TEST .....                  | 20 |    |  |    |
| 3  | PRECAUZIONI .....                         | 20 |    |  |    |
| 4  | COMPONENTI DEL KIT.....                   | 21 |    |  |    |
| 5  | CAMPIONI.....                             | 22 |    |  |    |
| 6  | ATTUAZIONE DEL TEST.....                  | 22 |    |  |    |
| 7  | VALORI NORMALI .....                      | 24 |    |  |    |
| 8  | CONTROLLO QUALITÀ.....                    | 24 |    |  |    |
| 9  | CARATTERISTICHE DEL TEST.....             | 25 |    |  |    |
| 10 | LIMITAZIONE DEL TEST.....                 | 25 |    |  |    |
| 11 | ASPETTI LEGALI .....                      | 27 |    |  |    |
|    |   |    |    | SYMBOLS USED .....                         | 43 |

## 1 INTENDED USE

The **DRG PSA Total ELISA** is an enzyme immunoassay for the quantitative *in vitro* diagnostic measurement of **total Prostate-specific Antigen concentration (t-PSA)** in serum or plasma (EDTA, lithium heparin or citrate plasma).

The determination of PSA levels is used to estimate the risk of prostate carcinoma in men in conjunction with digital rectal examination (DRE) or to monitor the effectiveness of prostate carcinoma treatment in patients.

### 1.1 Summary and Explanation

Prostate-specific antigen (PSA), also known as gamma-seminoprotein or kallikrein-3 (KLK3), is a glycoprotein enzyme of the kallikrein-related peptidase family. PSA is secreted by the epithelial cells of the prostate gland in very high concentrations to the ejaculate, where it liquefies semen in the seminal coagulum and dissolves cervical mucus, allowing the entry of sperm into the uterus (1,2). PSA circulates in blood in much lower concentrations. The main form of immunoreactive PSA is bound by alpha-1 antichymotrypsin (PSA-ACT), representing approximately 70-80% of the total PSA in the circulation, while the free (uncomplexed) PSA (fPSA; enzymatically inactive) represents 20-30% in serum (3,4). Furthermore, PSA bound to alpha-2 macroglobulin exists in less than 0.1% (undetectable by commercial tests). In male serum, the normal PSA concentration range is < 4 ng/mL while elevated concentrations of PSA are found in many carcinomas (5). However, increased PSA levels are not only found in patients with prostate cancer, but also in those with a diagnosis of benign prostatic hyperplasia (BPH), acute, subclinical or chronic prostatitis and urinary retention. Analysis of PSA levels in combination with digital rectal examination (DRE) further increase the chance of early detection of prostate cancer. In addition to total PSA, the most useful diagnostic index for distinguishing benign hypertrophy from prostate cancer is the free to total PSA ratio. In order to achieve even better specificity in early detection of prostate cancer, the following indexes may be determined: age-specific PSA, PSA density, acceleration of PSA, and PSA density of the transition zone (6-11).

The determination of PSA serum levels is not only important for the screening of patients for prostate cancer, but also for monitoring patients who have been treated for this disease. Here regular PSA measurements are an important tool to examine the potential and actual effectiveness of surgery or other therapies. An increase of PSA in patients after radical prostatectomy or radiotherapy may allow an earlier discovery of residual or recurrent carcinoma (12-14).

The American Cancer Society recommends to offer PSA blood test and the digital rectal examination annually, beginning at age 50, to men who are at average risk of prostate cancer and who have a life expectancy of at least 10 years. Men at high risk of developing prostate cancer (African Americans or men with a close relative diagnosed with prostate cancer before age 65) should be tested beginning at age 45 (15,16).

## 2 PRINCIPLE OF THE TEST

The DRG PSA Total ELISA is a solid phase enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) based on the **sandwich principle**.

The microtiter wells are coated with a monoclonal (mouse) antibody directed towards a unique antigenic site of the PSA molecule.

During incubation, the PSA molecules in the added sample bind to the immobilized antibody. The added enzyme conjugate, which contains an anti-PSA antibody conjugated to horseradish peroxidase, binds to the PSA forming a sandwich complex.

After a washing step to remove all unbound substances, the solid phase is incubated with the substrate solution. The colorimetric reaction is stopped by addition of stop solution, and optical density (OD) of the resulting yellow product is measured. The intensity of colour is proportional to the concentration of the analyte in the sample.

A standard curve is constructed by plotting OD values against concentrations of standards, and concentrations of unknown samples are determined using this standard curve.

**3 WARNINGS AND PRECAUTIONS**

1. This kit is for in vitro diagnostic use only. For professional use only.
2. All reagents of this test kit which contain human serum or plasma have been tested and confirmed negative for HIV I/II, HBsAg and HCV by FDA approved procedures. All reagents, however, should be treated as potential biohazards in use and for disposal.
3. Before starting the assay, read the instructions completely and carefully. Use the valid version of instructions for use provided with the kit. Be sure that everything is understood.
4. The microplate contains snap-off strips. Unused wells must be stored at 2 °C to 8 °C in the sealed foil pouch and used in the frame provided.
5. Pipetting of samples and reagents must be done as quickly as possible and in the same sequence for each step.
6. Use reservoirs only for single reagents. This especially applies to the substrate reservoirs. Using a reservoir for dispensing a substrate solution that had previously been used for the conjugate solution may turn solution coloured. Do not pour reagents back into vials as reagent contamination may occur.
7. Mix the contents of the microplate wells thoroughly to ensure good test results. Do not reuse microwells.
8. Do not let wells dry during assay; add reagents immediately after completing the rinsing steps.
9. Allow the reagents to reach room temperature (20 °C to 26 °C) before starting the test. Temperature will affect the optical density readings of the assay. However, values for the patient samples will not be affected.
10. Never pipet by mouth and avoid contact of reagents and specimens with skin and mucous membranes.
11. Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics in areas where specimens or kit reagents are handled.
12. Wear disposable latex gloves when handling specimens and reagents. Microbial contamination of reagents or specimens may give false results.
13. Handling should be done in accordance with the procedures defined by an appropriate national biohazard safety guideline or regulation.
14. Do not use reagents beyond expiry date as shown on the kit labels.
15. All indicated volumes have to be performed according to the protocol. Optimal test results are only obtained when using calibrated pipettes and microtiter plate readers.
16. Do not mix or use components from kits with different lot numbers. It is advised not to exchange wells of different plates even of the same lot. The kits may have been shipped or stored under different conditions and the binding characteristics of the plates may result slightly different.
17. Avoid contact with Stop Solution containing 0.5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. It may cause skin irritation and burns.
18. Some reagents contain Proclin 300, BND and/or MIT as preservatives. In case of contact with eyes or skin, flush immediately with water.
19. TMB substrate has an irritant effect on skin and mucosa. In case of possible contact, wash eyes with an abundant volume of water and skin with soap and abundant water. Wash contaminated objects before reusing them. If inhaled, take the person to open air.
20. Chemicals and prepared or used reagents have to be treated as hazardous waste according to the national biohazard safety guideline or regulation.
21. For information on hazardous substances included in the kit please refer to Safety Data Sheets. Safety Data Sheets for this product are available upon request directly from DRG.

## 4 REAGENTS

### 4.1 Reagents provided

1. **Microtiterwells**, 12 x 8 (break apart) strips, 96 wells;  
Wells coated with anti-PSA antibody (monoclonal).
2. **Zero Standard**, 1 vial, 10.0 mL, ready to use.  
(Sample Diluent)  
Contains non-mercury preservative.
3. **Standard (Standard 1 - 5)**, 5 vials, 0.5 mL each, ready to use;  
Concentrations: 1.56 – 3.12 – 6.25 – 12.5 – 25.0 ng/mL  
*The standards are calibrated against the following reference material: WHO International Standard Prostate Specific Antigen NIBSC code: 96/670*  
Contain non-mercury preservative.
4. **Control Low & High**, 2 vials, 0.5 mL each, ready to use;  
For control values and ranges please refer to vial label or Certificate of Analysis.  
Contain non-mercury preservative.
5. **Enzyme Conjugate**, 1 vial, 12 mL, ready to use;  
Anti-PSA antibody conjugated with horseradish peroxidase;  
Contains non-mercury preservative.
6. **Substrate Solution**, 1 vial, 12 mL, ready to use;  
Tetramethylbenzidine (TMB).
7. **Stop Solution**, 1 vial, 14 mL, ready to use;  
Contains 0.5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,  
Avoid contact with the stop solution. It may cause skin irritations and burns.

### 4.2 Materials required but not provided

- A calibrated microtiter plate reader (450 nm, with reference wavelength at 620 nm to 630 nm)
- Calibrated variable precision micropipettes
- Absorbent paper
- Distilled water
- Timer
- Graph paper or software for data reduction

### 4.3 Storage Conditions

When stored at 2 °C to 8 °C unopened reagents will retain reactivity until expiration date. Do not use reagents beyond this date.

Opened reagents must be stored at 2 °C to 8 °C. Microtiter wells must be stored at 2 °C to 8 °C. Once the foil bag has been opened, care should be taken to close it tightly again.

Opened kits retain activity for 8 weeks if stored as described above.

### 4.4 Reagent Preparation

Bring all reagents and required number of strips to room temperature (20 °C to 26 °C) prior to use.

### 4.5 Disposal of the Kit

The disposal of the kit and all used materials/reagents must be performed according to the national regulations. Special information for this product is given in the Safety Data Sheet, section 13.

### 4.6 Damaged Test Kits

In case of any damage to the test kit or components, DRG must be informed in writing, at the latest one week after receiving the kit. Damaged single components should not be used for a test run. They have to be stored until a final solution has been found. After this, they should be disposed of according to the official regulations.

## 5 SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Serum or plasma (EDTA, lithium heparin or citrate plasma) can be used in this assay.

*Note:* Samples containing sodium azide should not be used in the assay.

In general, it should be avoided to use haemolytic, icteric, or lipaemic specimens. For further information refer to chapter “*Interfering Substances*”.

### Important notes before blood drawing for PSA determination:

As different factors could influence the PSA level in blood, doctors should ensure that the patient has avoided the following conditions before taking the blood sample.

#### The following conditions may lead to an increase of PSA levels

- Manipulation of the prostate during medical examinations like digital rectal examination (DRE), transrectal prostatic ultrasound, etc.
- Prostatitis
- Biking
- Sexual intercourse (ejaculation)
- Liver dysfunction

#### The following conditions may lead to a decrease of PSA levels

- Intake of 5-alpha-reductase-inhibitors, antiandrogens, or GnRH analoga

### 5.1 Specimen Collection

#### Serum:

Collect blood by venipuncture (e.g. Sarstedt Monovette for serum), allow to clot, and separate serum by centrifugation at room temperature. Do not centrifuge before complete clotting has occurred. Patients receiving anticoagulant therapy may require increased clotting time.

#### Plasma:

Whole blood should be collected into centrifuge tubes containing anticoagulant (e.g. Sarstedt Monovette with the appropriate plasma preparation) and centrifuged immediately after collection.

### 5.2 Specimen Storage and Preparation

Specimens should be capped and may be stored for up to 7 days at 2 °C to 8 °C prior to assaying.

Specimens stored for a longer time (up to 12 months) should be frozen only once at -20 °C prior to assay. Thawed samples should be inverted several times prior to testing.

### 5.3 Specimen Dilution

If in an initial assay, a specimen is found to contain more analyte than the highest standard, the specimen can be diluted with *Zero Standard* and re-assayed as described in “*Assay Procedure*”.

For the calculation of the concentrations this dilution factor has to be taken into account.

#### Example:

- a) dilution 1:10: 10 µL sample + 90 µL *Zero Standard* (mix thoroughly)
- b) dilution 1:100: 10 µL dilution a) 1:10 + 90 µL *Zero Standard* (mix thoroughly).

## 6 ASSAY PROCEDURE

### 6.1 General Remarks

- All reagents and specimens must be allowed to come to room temperature before use. All reagents must be mixed without foaming.
- Once the test has been started, all steps should be completed without interruption.
- Use new disposal plastic pipette tips for each standard, control or sample in order to avoid cross contamination.
- Optical density is a function of the incubation time and temperature. Before starting the assay, it is recommended that all reagents are ready, caps removed, all needed wells secured in holder, etc. This will ensure equal elapsed time for each pipetting step without interruption.
- As a general rule the enzymatic reaction is linearly proportional to time and temperature.

## 6.2 Test Procedure

Each run must include a standard curve.

**Note:** *It is highly recommended to perform all measurements as duplicates.*

1. Secure the desired number of Microtiter wells in the frame holder.
2. Dispense **25 µL** of each **Standard, Control** and **sample** with new disposable tips into appropriate wells.
3. Incubate for **5 minutes** at room temperature.
4. Dispense **100 µL Enzyme Conjugate** into each well.  
Thoroughly mix for 10 seconds. It is important to have a complete mixing in this step.
5. Incubate for **60 minutes** at room temperature.
6. Rinse the wells **5 times** with **400 µL** distilled water per well, if a plate washer is used.  
- OR -  
Briskly shake out the contents of the wells.  
Rinse the wells **5 times** with **300 µL** distilled water per well for manual washing. Strike the wells sharply on absorbent paper to remove residual droplets.  
**Important note:**  
The sensitivity and precision of this assay is markedly influenced by the correct performance of the washing procedure!
7. Add **100 µL** of **Substrate Solution** to each well.
8. Incubate for **20 minutes** at room temperature.
9. Stop the enzymatic reaction by adding **100 µL** of **Stop Solution** to each well.
10. Determine the optical density of the solution in each well at **450 nm (reading) and at 620 nm to 630 nm (background subtraction, recommended)** with a microtiter plate reader.  
It is recommended that the wells be read **within 10 minutes** after adding the *Stop Solution*.

## 6.3 Calculation of Results

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

### 6.3.1 Example of Typical Standard Curve

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

| Standard                       | Optical Density (450 nm) |
|--------------------------------|--------------------------|
| <i>Zero Standard</i> (0 ng/mL) | 0.05                     |
| <i>Standard 1</i> (1.56 ng/mL) | 0.24                     |
| <i>Standard 2</i> (3.12 ng/mL) | 0.39                     |
| <i>Standard 3</i> (6.25 ng/mL) | 0.74                     |
| <i>Standard 4</i> (12.5 ng/mL) | 1.27                     |
| <i>Standard 5</i> (25.0 ng/mL) | 2.01                     |

## 7 EXPECTED NORMAL VALUES

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

In a study conducted with men, using the DRG PSA Total ELISA the following data were observed:

| Population                     | n  | Mean (ng/mL) | Median (ng/mL) | 2.5 <sup>th</sup> - 97.5 <sup>th</sup> Percentile (ng/mL) | Range (min. - max.) (ng/mL) |
|--------------------------------|----|--------------|----------------|---|-----------------------------|
| Healthy males                  | 51 | 1.20         | 0.86           | 0 – 4.85  | 0 – 5.35                    |
| Suspicious males (> 4,0 ng/mL) | 50 | 6.56         | 5.51           | 2.93 – 14.82  | 1.33 – 16.94                |

The generally recommended threshold for follow-up examinations is:

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

Healthy men generally have a PSA concentration lower than 4.0 ng/mL.

If the PSA concentration is equal or higher than 4.0 ng/mL, follow-up examinations are highly recommended.

This PSA concentration indicates an elevated risk for prostate cancer but might also be caused by benign prostatic hyperplasia (BPH).

Please note that the 4 ng/mL threshold is only a guideline value.

In the literature it is discussed that modifications according to age and ethnological background might be useful e.g. that for younger men the threshold should be lower than for older men.

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

As elevated PSA levels might also be caused by non-cancerous conditions follow-up examinations might try to increase the diagnostic specificity of total PSA values.

In the literature PSA density, PSA velocity and the ratio of free PSA to total PSA (f-PSA/t-PSA) are discussed to improve discrimination between cancerous and non-cancerous conditions and might be used to reduce unnecessary prostate biopsies.

But only a prostate biopsy can finally show if a prostate carcinoma is present or not.

**Note: PSA values can only be used to estimate the cancer risk.**

**They should always be interpreted in conjunction with other clinical findings and should not be used as a sole basis for prostate cancer diagnosis.**

The results alone should not be the only reason for any therapeutic consequences. The results should be correlated to other clinical observations and diagnostic tests.

## 8 QUALITY CONTROL

Good laboratory practice requires that controls be run with each calibration curve. A statistically significant number of controls should be assayed to establish mean values and acceptable ranges to assure proper performance.

It is recommended to use control samples according to state and federal regulations. The use of control samples is advised to assure the day-to-day validity of results. Use controls at both normal and pathological levels.

The controls and the corresponding results of the QC-Laboratory are stated in the QC certificate added to the kit. The values and ranges stated on the QC sheet always refer to the current kit lot and should be used for direct comparison of the results.

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

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

In this case, please check the following technical areas: Pipetting and timing devices; photometer, expiration dates of reagents, storage and incubation conditions, aspiration and washing methods.

After checking the above-mentioned items without finding any error contact your distributor or DRG directly.



## 9 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

### 9.1 Assay Dynamic Range

The range of the assay is between 0.2 ng/mL - 25.0 ng/mL.

### 9.2 Specificity of Antibodies (Cross-Reactivity)

The following substances were tested for cross-reactivity of the assay. **No** interference with the assay was found for:

| Substance   | Amount added |
|-------------|--------------|
| AFP         | 10 µg/mL     |
| CEA         | 10 µg/mL     |
| HCG         | 10 µg/mL     |
| Lactalbumin | 10 µg/mL     |

**Additional data** for specificity of antibodies were obtained from verification study of the DRG:HYBRiD-XL PSA (HYE-5730). This assay uses the same antibodies and reagents as EIA-3719 but was adapted to the fully automated system DRG:HYBRiD-XL. For method comparison studies, please refer to chapter 9.7.

The following substance was tested for cross-reactivity. **No** interference with the assay was found for:

| Substance                      | Amount added |
|--------------------------------|--------------|
| Plasmin-α2-Antiplasmin complex | 5 µg/mL      |

### 9.3 Sensitivity

The analytical sensitivity of the DRG ELISA was calculated by adding 2 standard deviations to the mean of 20 replicate analyses of the *Zero Standard* and was found to be 0,054 ng/mL.

The Limit of Blank (LoB) is 0.045 ng/mL.

The Limit of Detection (LoD) is 0.216 ng/mL.

The Limit of Quantification (LoQ) is 1.172 ng/mL.

### 9.4 Reproducibility

#### 9.4.1 Intra-Assay

The within-assay variability was determined by measuring each sample 24 or 32 times per run:

| Sample | n  | Mean (ng/mL) | CV (%) |
|--------|----|--------------|--------|
| 1      | 24 | 12.5         | 6.0    |
| 2      | 24 | 3.4          | 3.9    |
| 3      | 32 | 0.8          | 8.8    |

#### 9.4.2 Inter-Assay

The between-assay variability was determined by measuring each sample with 3 different lots:

| Sample | n  | n Lots | Mean (ng/mL) | CV (%) |
|--------|----|--------|--------------|--------|
| 1      | 75 | 3      | 12.3         | 6.7    |
| 2      | 75 | 3      | 3.3          | 8.0    |

#### 9.4.3 Inter-Lot

The inter-assay (between-lots) variation was determined by measuring each sample 6 times with 3 different kit lots:

| Sample | n  | Mean (ng/mL) | CV (%) |
|--------|----|--------------|--------|
| 1      | 18 | 13.0         | 3.4    |
| 2      | 18 | 3.5          | 8.8    |
| 3      | 18 | 12.4         | 4.1    |
| 4      | 18 | 3.4          | 4.1    |

## 9.5 Recovery

Samples have been spiked by adding PSA solutions with known concentrations.

The recovery (%) was calculated by multiplying the ratio of measured and expected values with 100.

| Sample | Expected conc. (ng/mL) | Measured conc. (ng/mL) | Recovery (%) |
|--------|------------------------|------------------------|--------------|
| 1      | 6.4                    | 6.4                    | 99.8         |
| 2      | 4.6                    | 4.7                    | 97.6         |
| 3      | 10.1                   | 10.9                   | 92.6         |

## 9.6 Linearity

Samples were measured undiluted and in serial dilutions with standard 0. The recovery (%) was calculated by multiplying the ratio of expected and measured values with 100.

| Sample                | 1     | 2     | 3     | 4     |
|-----------------------|-------|-------|-------|-------|
| Concentration (ng/mL) | 8.84  | 9.92  | 14.52 | 16.69 |
| Average Recovery (%)  | 106.9 | 111.2 | 111.0 | 103.1 |
| Range of Recovery (%) | from  | 98.2  | 107.8 | 108.5 |
|                       | to    | 114.0 | 113.5 | 113.0 |

## 9.7 Comparison Studies

A comparison of the DRG PSA Total ELISA (EIA-3719) (y) and the reference method Access Hybritech PSA (x) using clinical samples gave the following correlation:

$$y = 1.108x - 0.054, \quad R^2 = 0.952, \quad n = 57$$

A comparison of the DRG PSA Total ELISA (EIA-3719) (y) and the reference method DRG:HYBRiD-XL PSA (HYE-5370) (x) using clinical samples gave the following correlation:

$$y = 1.172 + 0.583x, \quad R^2 = 0.992, \quad n = 57$$

A comparison of the DRG:HYBRiD-XL PSA (HYE-5370) (y) and the reference method Roche cobas ECLIA (x) using clinical samples gave the following correlation:

$$y = 0.955x + 0.434, \quad R^2 = 0.990, \quad n = 62$$

## 10 LIMITATIONS OF USE

Reliable and reproducible results will be obtained when the assay procedure is performed with a complete understanding of the package insert instruction and with adherence to good laboratory practice.

Any improper handling of samples or modification of this test might influence the results.

### 10.1 Interfering Substances

Haemoglobin (up to 0.1 mg/mL), Bilirubin (up to 0.2 mg/mL) and Triglyceride (up to 15 mg/mL) have no influence on the assay results.

### 10.2 Drug Interferences

The following cytostatic drugs were tested. **No** interference with the assay was found for:

| Drug               | Concentration tested (µg/mL) |
|--------------------|------------------------------|
| Carboplatin        | 700.0                        |
| Cisplatin          | 200.0                        |
| Calcium Folate     | 2.3                          |
| Cyclophosphamide   | 1000.0                       |
| 5-Fluorouracil     | 500.0                        |
| Doxorubicin HCl    | 72.0                         |
| Dexamethasone      | 11.0                         |
| Diethylstilbestrol | 2.0                          |
| Flutamide          | 10.0                         |
| Methotrexate       | 50.0                         |

Furthermore, the following hypertension drugs were tested. **No** interference with the assay was found for:

| Drug               | Concentration tested ( $\mu\text{g/mL}$ ) |
|--------------------|---|
| Simvastatin        | 0.1                                       |
| Irbesartan         | 1.5                                       |
| Sildenafil Citrate | 5.0                                       |
| Furosemide         | 200.0                                     |

In addition, the following antimicrobial agent was tested.

| Compound              | Concentration tested (%) |
|-----------------------|--------------------------|
| Benzalkonium Chloride | 0.5                      |

The antimicrobial agent Benzalkonium Chloride (0.5%) shows no interference with the assay.

**Additional data** were obtained from verification study of the HYBRiD PSA (HYE-5730). This assay uses the same reagents as EIA-3719 but was adapted to the fully automated system DRG:HYBRiD-XL. For method comparison studies, please refer to chapter 9.7.

The following cytostatic drug were tested. **No** interference with the assay was found for:

| Drug       | Concentration tested ( $\mu\text{g/mL}$ ) |
|------------|---|
| Paclitaxel | 5.5                                       |

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

### 10.3 High-Dose-Hook Effect

Hook effect was not observed in this test up to a concentration of 2000 ng/mL of PSA.

## 11 LEGAL ASPECTS

### 11.1 Reliability of Results

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

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

### 11.2 Therapeutic Consequences

Therapeutic consequences should never be based on laboratory results alone even if all test results are in agreement with the items as stated under point 11.1. Any laboratory result is only a part of the total clinical picture of a patient.

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

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

### 11.3 Liability

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

Claims submitted due to customer misinterpretation of laboratory results subject to point 11.2 are also invalid. Regardless, in the event of any claim, the manufacturer's liability is not to exceed the value of the test kit. Any damage caused to the test kit during transportation is not subject to the liability of the manufacturer.

## 1 ZWECKBESTIMMUNG

Der **DRG PSA Total ELISA** wird zur quantitativen Bestimmung der **Gesamt-Konzentration des Prostata-spezifischem Antigens (t-PSA)** in Serum oder Plasma (EDTA-, Lithium-Heparin- oder Zitratplasma) eingesetzt.

**Nur für *In-vitro* Diagnostik.**

Die Bestimmung von t-PSA wird zusammen mit digitalen rektalen Untersuchungen (DRU) dazu verwendet, das Risiko einer Prostatakreberkrankung einzuschätzen oder den Erfolg einer Prostatakrebsbehandlung von Patienten zu überprüfen.

## 2 TESTPRINZIP

Der DRG **PSA Total ELISA** ist ein Festphasen-Enzymimmunoassay, der auf der **Sandwichtechnik** basiert.

Die Wells der Mikrotiterplatten sind mit einem monoklonalen Maus-Antikörper beschichtet, der gegen eine definierte Antikörper-Bindungsstelle des PSA-Moleküls gerichtet ist.

Während der Inkubation bindet das PSA-Molekül in der zugegebenen Probe an den immobilisierten Antikörper. Die Konjugatlösung, die zugegeben wird und einen an Meerrettichperoxidase konjugierten PSA-Antikörper enthält, bindet an das PSA unter Bildung eines Sandwich-Komplexes.

Nach einem Waschschrift, um alle ungebundenen Substanzen zu entfernen, wird die feste Phase mit der Substratlösung inkubiert. Die Farbreaktion wird durch die Zugabe der Stopplösung beendet und die optische Dichte (OD) des resultierenden gelben Produktes gemessen. Die Intensität der Farbe ist proportional zur Konzentration des Analyten in der Probe.

Durch Auftragen der OD-Werte gegen die Konzentrationen der Standards wird eine Standardkurve erstellt, und die Konzentrationen der unbekanntenen Proben werden anhand dieser Standardkurve bestimmt.

### 3 VORSICHTSMAßNAHMEN

1. Dieser Kit ist nur zum *in vitro* diagnostischen Gebrauch geeignet. Nur für den professionellen Gebrauch.
2. Alle Reagenzien dieses Testkits, die humanes Serum oder Plasma enthalten, wurden durch von der FDA zugelassene Verfahren auf HIV I/II, HBsAg und HCV getestet und als negativ bestätigt. Alle Reagenzien sollten jedoch im Gebrauch und bei der Entsorgung als potentielle biologische Gefahrenstoffe behandelt werden.
3. Vor Beginn des Tests ist die Gebrauchsanweisung vollständig und sorgfältig zu lesen. Verwenden Sie nur die gültige, im Testkit enthaltene, Gebrauchsanweisung. Stellen Sie sicher, dass alles verstanden wurde.
4. Die Mikrotiterplatte besteht aus einzeln herausnehmbaren und abbrechbaren Streifen. Ungenutzte Vertiefungen müssen bei 2 °C bis 8 °C im verschlossenen Folienbeutel gelagert und im mitgelieferten Rahmen verwendet werden.
5. Das Pipettieren der Proben und Reagenzien muss so schnell wie möglich und für jeden Schritt in der gleichen Reihenfolge erfolgen.
6. Behältnisse jeweils nur für ein einziges Reagenz verwenden. Dies gilt insbesondere für die Substrat-Behälter. Die Verwendung eines Behälters zum Pipettieren der Substratlösung, der zuvor für die Konjugatlösung verwendet wurde, kann zu einer Verfärbung der Lösung führen. Gießen Sie keine Reagenzien zurück in die originalen Fläschchen, da es zu einer Kontamination der Reagenzien kommen kann.
7. Mischen Sie den Inhalt der Mikrotiterplatten-Vertiefungen gründlich, um gute Testergebnisse zu gewährleisten. Mikrotiterplatten-Vertiefungen nicht wiederverwenden.
8. Kavitäten während des Assays nicht trocknen lassen; Reagenzien unmittelbar nach Ende des Waschschritts hinzufügen.
9. Lassen Sie die Reagenzien vor Testbeginn Raumtemperatur (20 °C bis 26 °C) erreichen. Die Temperatur wirkt sich auf die Messungen der optischen Dichte des Assays aus. Die Werte für die Patientenproben werden jedoch nicht beeinflusst.
10. Niemals mit dem Mund pipettieren und den Kontakt von Reagenzien und Proben mit Haut und Schleimhäuten vermeiden.
11. In Bereichen, in denen Proben oder Kit-Reagenzien verwendet werden, darf nicht geraucht, gegessen, getrunken oder Kosmetika aufgetragen werden.
12. Beim Umgang mit Proben und Reagenzien Einweg-Latexhandschuhe tragen. Eine mikrobielle Kontamination von Reagenzien oder Proben kann zu falschen Ergebnissen führen.
13. Die Handhabung sollte in Übereinstimmung mit den Verfahren erfolgen, die in einer entsprechenden nationalen Richtlinie oder Vorschrift zur Biogefährdung definiert sind.
14. Reagenzien nicht über das auf den Kit-Etiketten angegebene Verfallsdatum hinaus verwenden.
15. Alle im Kit-Protokoll angegebenen Volumina müssen genau eingehalten werden. Optimale Ergebnisse können nur durch Verwendung kalibrierter Pipetten und Mikrotiterplatten-Lesegeräte erreicht werden.
16. Komponenten aus Kits mit unterschiedlichen Chargennummern dürfen nicht gemischt oder zusammen verwendet werden. Es wird empfohlen, keine Wells von verschiedenen Platten zusammen zu verwenden, auch nicht, wenn es sich um die gleiche Charge handelt. Die Kits können unter unterschiedlichen Bedingungen versandt oder gelagert worden sein, so dass die Bindungscharakteristik der Platten leicht unterschiedlich ausfällt.
17. Kontakt mit der Stopplösung (*Stop Solution*) sollte vermieden werden, da sie 0,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> enthält. Schwefelsäure kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen.
18. Einige Reagenzien enthalten ProClin 300, BND und/oder MIT als Konservierungsmittel. Bei Kontakt mit Augen oder Haut sofort mit Wasser spülen.
19. TMB-Substrat hat eine reizende Wirkung auf Haut und Schleimhäute. Bei möglichem Kontakt Augen mit reichlich Wasser und Haut mit Seife und reichlich Wasser spülen. Kontaminierte Gegenstände vor der Wiederverwendung waschen. Falls eingeatmet, die Person an die frische Luft bringen.
20. Die Reagenzien des Kits sind als gesundheitsgefährdende Abfälle zu betrachten und gemäß den nationalen Vorschriften zu entsorgen
21. Informationen zu den im Kit enthaltenen gefährlichen Substanzen entnehmen Sie bitte dem Sicherheitsdatenblatt. Sicherheitsdatenblätter für dieses Produkt sind auf Anfrage direkt von der Firma DRG Instruments GmbH erhältlich.

## 4 BESTANDTEILE DES KITS

### 4.1 Kitinhalt

1. **Microtiterwells**, 96 Wells, 12 x 8 Wells (einzeln brechbar);  
Mit anti-PSA-Antikörper (monoklonal) beschichtet.
2. **Zero Standard**, 1 Fläschchen, 10, mL, gebrauchsfertig.  
(Sample Diluent);  
Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.
3. **Standard (Standard 1 - 5)**, 5 Fläschchen, je 0,5 mL, gebrauchsfertig;  
Konzentrationen: 1,56 – 3,12 – 6,25 – 12,5 – 25,0 ng/mL  
*Die Standards sind gegen das folgende Referenzmaterial kalibriert: WHO International Standard Prostate Specific Antigen NIBSC code: 96/670;*  
Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.
4. **Control Low & High** (Kontrolle), 2 Fläschchen, je 0,5 mL, gebrauchsfertig;  
Kontrollwerte und -bereiche entnehmen Sie bitte dem Fläschchenetikett oder dem „Certificate of Analysis“.  
Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.
5. **Enzyme Conjugate** (Enzymkonjugat), 1 Fläschchen, 12 mL, gebrauchsfertig;  
Anti-PSA-Antikörper mit Meerrettichperoxidase konjugiert;  
Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.
6. **Substrate Solution** (Substratlösung), 1 Fläschchen, 12 mL, gebrauchsfertig;  
Substratlösung TMB.
7. **Stop Solution** (Stopplösung), 1 Fläschchen, 14 mL, gebrauchsfertig;  
enthält 0,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,  
Kontakt mit der Stopplösung vermeiden! Kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen.

### 4.2 Erforderliche aber nicht enthaltene Geräte und Materialien

- Kalibriertes Mikrotiterplattenlesegerät (450 nm, mit Referenzwellenlänge bei 620 nm bis 630 nm)
- Kalibrierte variable Präzisions-Mikropipetten
- Saugfähiges Papier
- Destilliertes Wasser
- Laborwecker
- Millimeterpapier oder Software zur Datenauswertung

### 4.3 Lagerung und Haltbarkeit des Kits

Die ungeöffneten Reagenzien behalten bei Lagerung um 2 °C bis 8 °C ihre Reaktivität bis zum Verfallsdatum. Nach dem Verfallsdatum die Reagenzien nicht mehr verwenden.

Nach dem Öffnen sollten alle Reagenzien bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden.

Die Mikrotiterwells sollten bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden. Der einmal geöffnete Folienbeutel sollte stets sehr sorgfältig wieder verschlossen werden. Unter den beschriebenen Lagerbedingungen behalten geöffnete Kits 8 Wochen ihre Reaktivität.

### 4.4 Vorbereitung der Reagenzien

Alle Reagenzien sowie die benötigte Anzahl von Wells sollen vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur (20 °C bis 26 °C) gebracht werden.

### 4.5 Entsorgung des Kits

Die Entsorgung des Kits und aller verwendeten Materialien / Reagenzien muss gemäß den nationalen gesetzlichen Vorschriften erfolgen. Spezielle Informationen für dieses Produkt finden Sie im Sicherheitsdatenblatt, Abschnitt 13.

### 4.6 Beschädigte Testkits

Im Falle einer Beschädigung des Testkits oder der Komponenten muss die Firma DRG in schriftlicher Form spätestens eine Woche nach Erhalt des Kits informiert werden. Beschädigte Einzelkomponenten dürfen nicht für den Testlauf verwendet werden. Sie müssen aufbewahrt werden, bis eine endgültige Lösung gefunden wurde. Danach sollten Sie gemäß den offiziellen Richtlinien entsorgt werden.

## 5 PROBENVORBEREITUNG

Serum oder Plasma (EDTA-, Lithium-Heparin- oder Zitratplasma) kann in diesem Test als Probenmaterial eingesetzt werden.

*Achtung:* Proben, die Natriumazid enthalten, sollten nicht verwendet werden.

Generell sollte die Verwendung von hämolytischen, ikterischen oder lipämischen Proben vermieden werden. Weitere Informationen finden Sie im Kapitel „*Interferenzen*“.

### Wichtige Hinweise zur Beachtung vor der Blutentnahme für die PSA-Bestimmung

Verschieden Faktoren können den PSA-Spiegel im Blut beeinflussen. Vor der Entnahme sollte der Arzt sich vergewissern, dass der Patient die folgenden Bedingungen vermieden hat.

Bedingungen, die zu einer Erhöhung der PSA-Konzentration führen können:

- Manipulative Untersuchung der Prostata, z.B. Digitale Rektale Untersuchungen (DRU), transrektale Ultraschalluntersuchungen, etc.
- Prostatitis
- Radfahren
- Geschlechtsverkehr (Ejakulation)
- Fehlfunktionen der Leber

Bedingungen, die zu einer Absenkung der PSA-Konzentration führen können:

- Einnahme von 5-alpha-Reductase-Inhibitoren, Antiandrogenen oder GnRH-Analoga

### 5.1 Probenentnahme

#### Serum:

Blut durch Venenpunktion entnehmen (z.B. mit Sarstedt Monovette für Serum), gerinnen lassen und das Serum durch Zentrifugation bei Raumtemperatur abtrennen. Vor der Zentrifugation muss die Gerinnung vollständig abgeschlossen sein. Bei Patienten, die Antikoagulantien erhalten, kann die Gerinnungszeit länger dauern.

#### Plasma:

Die Blutentnahme erfolgt mit Röhrchen, die ein Antikoagulant enthalten (z.B.: Sarstedt Monovette – mit entsprechender Plasma-Präparierung). Das Plasma wird als Überstand nach einer Zentrifugation gewonnen.

### 5.2 Probenaufbewahrung

Proben sollten stets gut verschlossen sein und können vor Testbeginn bis zu 7 Tage bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden. Für eine längere Aufbewahrung (bis zu 12 Monaten) sollten die Proben eingefroren bei -20 °C bis zum Testbeginn gelagert werden. Nur einmal einfrieren. Aufgetaute Proben sollten vor Testbeginn vorsichtig durchmischt werden, ohne Schaumbildung.

### 5.3 Probenverdünnung

Wenn in einem ersten Testdurchlauf bei einer Probe eine Konzentration höher als der höchste Standard gefunden wird, kann diese Probe mit *Zero Standard* weiter verdünnt und nochmals bestimmt werden. Die Verdünnung muss jedoch bei der Berechnung der Konzentration beachtet werden.

#### Beispiel:

- Verdünnung 1:10: 10 µL Probe + 90 µL *Zero Standard* gründlich mischen)
- Verdünnung 1:100: 10 µL Verdünnung a) 1:10 + 90 µL *Zero Standard* (gründlich mischen).

## 6 TESTDURCHFÜHRUNG

### 6.1 Allgemeine Hinweise

- Alle Reagenzien und Proben müssen vor Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht und gut durchmischt werden. Dabei sollte Schaumbildung vermieden werden.
- Wenn die Testdurchführung einmal begonnen wurde, muss sie ohne Unterbrechung zu Ende geführt werden.
- Für jeden Standard, jede Kontrolle oder Probe eine neue Plastikspitze verwenden, um Verschleppungen zu vermeiden.
- Die Optische Dichte ist abhängig von Inkubationszeit und Temperatur. Deshalb ist es notwendig, vor Beginn der Testdurchführung alle Reagenzien in einen arbeitsbereiten Zustand zu bringen, die Deckel der Fläschchen zu öffnen, alle benötigten Wells in den Halter zu setzen. Nur eine solche Vorbereitung garantiert gleiche Zeiten für jeden Pipettiervorgang ohne Pausen.
- Als generelle Regel gilt, dass die enzymatische Reaktion linear proportional zu Zeit und Temperatur ist.

## 6.2 Testdurchführung

Jeder Lauf muss eine Standardkurve beinhalten.

**Hinweis:** Es wird dringend empfohlen alle Messungen in Doppelbestimmung durchzuführen.

1. Die benötigte Anzahl Wells in der Halterung befestigen.
2. **Je 25 µL Standard, Control und Proben** mit neuen Plastikspitzen in die entsprechenden Wells geben.
3. **5 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren.
4. **100 µL Enzyme Conjugate** in jedes Well geben.  
Für 10 Sekunden gut schütteln. Es ist sehr wichtig, in diesem Schritt eine komplette Durchmischung zu erreichen.
5. **60 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren.
6. Wells **5-mal** mit **400 µL** destilliertem Wasser waschen, falls ein Waschautomat verwendet wird.  
- ODER -  
Den Inhalt der Wells kräftig ausschütteln.  
Wells **5-mal** mit **300 µL** destilliertem Wasser waschen bei manueller Durchführung.  
Verbleibende Flüssigkeit durch Ausklopfen der Wells auf saugfähigem Papier entfernen.  
**Achtung:** Die Sensitivität und Präzision dieses Assays wird erheblich beeinflusst von der korrekten Durchführung des Waschschrittes!
7. **100 µL Substrate Solution** in jedes Well geben.
8. **20 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren.
9. Die enzymatische Reaktion durch Zugabe von **100 µL Stop Solution** in jedes Well abstoppen.
10. Die Optische Dichte (OD) bei **450 nm (Messung) und 620 nm bis 630 nm (Abzug des Hintergrundes, empfohlen)** mit einem Mikrotiterplattenleser innerhalb von **10 Minuten** nach Zugabe der *Stop Solution* bestimmen.

## 6.3 Ergebnisermittlung

1. Die durchschnittlichen Werte der Optischen Dichte (OD) für jedes Set von Standards, Controls und Patientenproben bestimmen.
2. Eine Standardkurve ermitteln durch Auftragen der mittleren Optischen Dichte jedes Standards gegen die Konzentration, wobei der OD-Wert auf der vertikalen (Y) Achse und die Konzentration auf der horizontalen (X) Achse eingetragen wird.
3. Unter Verwendung der mittleren OD wird für jede Probe die entsprechende Konzentration aus der Standardkurve ermittelt.
4. Automatische Methode: Die in der Gebrauchsanweisung angegebenen Werte wurden automatisch mit Hilfe der 4-Parameter-Gleichung bestimmt. (4-Parameter-Rodbard oder 4-Parameter-Marquardt sind die bevorzugten Methoden.) Andere Auswertungsfunktionen können leicht abweichende Werte ergeben.
5. Die Konzentration der Proben kann direkt von der Standardkurve abgelesen werden. Proben, die eine höhere Konzentration als die des höchsten Standards enthalten, müssen verdünnt werden. Dieser Verdünnungsfaktor muss bei der Berechnung der Konzentration beachtet werden.

### 6.3.1 Beispiel für eine Standardkurve

Nachfolgend wird ein typisches Beispiel für eine Standardkurve mit dem DRG ELISA gezeigt. Diese Werte sollten **nicht** zur Berechnung von Patientendaten verwendet werden.

| Standard                       | Optische Dichte (450 nm) |
|--------------------------------|--------------------------|
| <i>Zero Standard</i> (0 ng/mL) | 0,05                     |
| <i>Standard 1</i> (1,56 ng/mL) | 0,24                     |
| <i>Standard 2</i> (3,12 ng/mL) | 0,39                     |
| <i>Standard 3</i> (6,25 ng/mL) | 0,74                     |
| <i>Standard 4</i> (12,5 ng/mL) | 1,27                     |
| <i>Standard 5</i> (25,0 ng/mL) | 2,01                     |



## 7 ERWARTETE WERTE

Es wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen normalen und abnormalen Werte ermittelt.

In einer Studie mit dem DRG PSA Total ELISA wurden die Proben von Männern untersucht. Dabei ergaben sich folgende Werte:

| Population                       | n  | Mittelwert (ng/mL) | Median (ng/mL) | 2,5. - 97,5. Perzentile (ng/mL) | Bereich (min. - max.) (ng/mL) |
|----------------------------------|----|--------------------|----------------|---------------------------------|-------------------------------|
| Gesunde Männer                   | 51 | 1,20               | 0,86           | 0 – 4,85                        | 0 – 5,35                      |
| Verdächtige Männer (> 4,0 ng/mL) | 50 | 6,56               | 5,51           | 2,93 – 14,82                    | 1,33 – 16,94                  |

Der generell empfohlene Schwellenwert ab dem Folgeuntersuchungen eingeleitet werden sollten liegt bei:

**PSA-Cut-off: 4,0 ng/mL**

Bei gesunden Männern ist die PSA-Konzentration niedriger als 4,0 ng/mL.

Ist die PSA-Konzentration gleich oder höher als 4 ng/mL, werden Folgeuntersuchungen dringlich empfohlen. Derartige PSA-Konzentrationen zeigen ein erhöhtes Risiko für Prostatakrebs an, können aber auch durch benigne Prostatahyperplasie (BPH) verursacht werden.

Bitte beachten Sie, dass der 4 ng/mL-Schwellenwert nur ein Richtwert ist.

In der Literatur wird diskutiert, ob er in Abhängigkeit des Lebensalters und des ethnologischen Hintergrunds modifiziert werden sollte, z.B. ob der Grenzwert für junge Männer niedriger angesiedelt werden sollte als für alte Männer.

Bitte beachten Sie, dass einige Prostatatumoren keine sichtbar erhöhten PSA-Spiegel verursachen.

PSA-Messungen sollten deshalb die digitale rektale Untersuchung (DRU) nicht ersetzen, sondern sollten ergänzend zur DRU durchgeführt werden.

Da PSA-Konzentrationen auch durch gutartige Krankheitsbilder erhöht sein können, sollte in Folgeuntersuchungen versucht werden, die diagnostische Spezifität der Gesamt-PSA-Messung zu erhöhen.

In der Literatur werden die PSA-Dichte, der PSA-Anstieg innerhalb eines Zeitraums sowie das Verhältnis von freiem PSA zu Gesamt-PSA (f-PSA/t-PSA) diskutiert, um eine Diskriminierung zwischen gut- und bösartigen Erkrankungen zu ermöglichen und ggf. unnötige Prostatabiopsien zu vermeiden.

Allerdings kann nur eine Prostatabiopsie eine endgültige Sicherheit geben, ob ein Prostatakarzinom vorliegt oder nicht.

**Hinweis: PSA-Werte unterstützen lediglich die Abschätzung eines Prostatakrebsrisikos.**

**Sie müssen stets in Verbindung mit anderen klinischen Untersuchungsergebnissen betrachtet werden und sollten nicht als alleinige Grundlage für eine Prostatakrebsdiagnose herangezogen werden**

Die mit diesem Testkit erzielten Ergebnisse sollten niemals als alleinige Grundlage für therapeutische Konsequenzen dienen. Die Ergebnisse müssen zusammen mit anderen klinischen Befunden und diagnostischen Tests des Patienten interpretiert werden.

## 8 QUALITÄTSKONTROLLE

Es wird empfohlen, die Kontrollproben gemäß den nationalen gesetzlichen Bestimmungen einzusetzen. Durch die Verwendung von Kontrollproben wird eine Tag-zu-Tag Überprüfung der Ergebnisse erzielt. Es sollten Kontrollen sowohl mit normalem als auch pathologischem Level eingesetzt werden.

Die Kontrollen mit den entsprechenden Ergebnissen des QC-Labors sind im QC-Zertifikat, das dem Kit beiliegt, aufgeführt. Die im QC-Blatt angegebenen Werte und Bereiche beziehen sich stets auf die aktuelle Kitcharge und sollten zum direkten Vergleich der Ergebnisse verwendet werden.

Es wird ebenfalls empfohlen, an nationalen oder internationalen Qualitätssicherungs-Programmen teilzunehmen, um die Genauigkeit der Ergebnisse zu sichern.

Es sollten geeignete statistische Methoden zur Analyse von Kontroll-Werten und Trends angewendet werden. Wenn die Ergebnisse des Assays nicht mit den angegebenen Akzeptanzbereichen des Kontrollmaterials übereinstimmen, sollten die Patientenergebnisse als ungültig eingestuft werden.

In diesem Fall überprüfen Sie bitte die folgenden Bereiche: Pipetten und Zeitnehmer, Photometer, Verfallsdatum der Reagenzien, Lagerungs- und Inkubationsbedingungen, Absaug- und Waschmethode.

Sollten Sie nach Überprüfung der vorgenannten Bereiche keinen Fehler erkannt haben, setzen Sie sich bitte mit Ihrem Lieferanten oder direkt mit der Firma DRG in Verbindung.

## 9 ASSAY-CHARAKTERISTIKA

### 9.1 Messbereich

Der Messbereich des Testes liegt zwischen 0,2 ng/mL - 25,0 ng/mL.

### 9.2 Spezifität der Antikörper (Kreuzreaktivität)

Die folgenden Substanzen wurden auf Kreuzreaktivitäten mit dem Assay getestet. Es wurden **keine** Interferenzen mit dem Test gefunden für:

| Substanz    | Zugegebene Konz. |
|-------------|------------------|
| AFP         | 10 µg/mL         |
| CEA         | 10 µg/mL         |
| HCG         | 10 µg/mL         |
| Lactalbumin | 10 µg/mL         |

**Zusätzliche Daten** zur Spezifität der Antikörper wurden im Rahmen einer Verifikationsstudie des DRG:HYBRiD-XL PSA (HYE-5730) ermittelt. Dieser Assay verwendet die gleichen Antikörper und Reagenzien wie EIA-3719, wurde jedoch an das vollautomatische System DRG:HYBRiD-XL angepasst. Methodenvergleichsstudien finden Sie in Kapitel 9.7 der englischen Gebrauchsanweisung.

Die folgende Substanz wurde auf Kreuzreaktivität getestet. Es wurde **keine** Interferenz mit dem Test gefunden für:

| Substanz                                | Zugegebene Konz. |
|---|------------------|
| Plasmin- $\alpha$ 2-Antiplasmin-Komplex | 5000 ng/mL       |

### 9.3 Sensitivität

Die analytische Sensitivität, definiert als Mittelwert, zuzüglich der zweifachen Standardabweichung, des *Zero Standard* (n = 20), beträgt 0,054 ng/mL.

Der „Limit of Blank“ (LoB) ist 0,045 ng/mL.

Die Nachweisgrenze (LoD) ist 0,216 ng/mL.

Die Quantifizierungsgrenze (LoQ) ist 1,172 ng/mL.

Die Daten zu:

### 9.4 Reproduzierbarkeit (Präzision)

### 9.5 Wiederfindung

### 9.6 Linearität

### 9.7 Methodenvergleich

entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Version der Gebrauchsanweisung.

## 10 GRENZEN DES TESTS

Zuverlässige und reproduzierbare Ergebnisse werden erzielt, wenn das Testverfahren mit vollständigem Verständnis der Anweisungen in der Gebrauchsanleitung und unter Befolgung der GLP (Good Laboratory Practice)-Richtlinien durchgeführt wird.

Jede unsachgemäße Behandlung von Proben oder Modifikation dieses Tests können die Ergebnisse beeinflussen.

### 10.1 Interferenzen

Hämoglobin (bis zu 0,1 mg/mL), Bilirubin (bis zu 0,2 mg/mL) und Triglyceride (bis zu 15 mg/mL) haben keinen Einfluss auf das Testergebnis.

## 10.2 Beeinflussung durch Medikamente

Die folgenden Zytostatika wurden getestet. Es wurden **keine** Interferenzen mit dem Test gefunden für:

| Medikament         | Getestete Konzentration (µg/mL) |
|--------------------|---------------------------------|
| Carboplatin        | 700,0                           |
| Cisplatin          | 200,0                           |
| Kalziumfolinat     | 2,3                             |
| Cyclophosphamid    | 1000,0                          |
| 5-Fluorouracil     | 500,0                           |
| Doxorubicin HCl    | 72,0                            |
| Dexamethason       | 11,0                            |
| Diethylstilbestrol | 2,0                             |
| Flutamid           | 10,0                            |
| Methotrexat        | 50,0                            |

Außerdem wurden die folgenden Medikamente gegen Bluthochdruck getestet. Es wurden **keine** Interferenzen mit dem Test gefunden für:

| Medikament         | Getestete Konzentration (µg/mL) |
|--------------------|---------------------------------|
| Simvastatin        | 0,1                             |
| Irbesartan         | 1,5                             |
| Sildenafil Citrate | 5,0                             |
| Furosemid          | 200,0                           |

Zusätzlich wurde das folgende Antimikrobiotikum getestet.

| Substanz            | Getestete Konzentration (%) |
|---------------------|-----------------------------|
| Benzalkoniumchlorid | 0,5                         |

**Das Antimikrobiotikum Benzalkoniumchlorid (0,5%) zeigt keine Interferenz mit diesem Test.**

**Zusätzliche Daten** wurden im Rahmen einer Verifikationsstudie des DRG:HYBRiD-XL PSA (HYE-5730) ermittelt. Dieser Assay verwendet die gleichen Reagenzien wie EIA-3719, wurde jedoch an das vollautomatische System DRG:HYBRiD-XL angepasst. Methodenvergleichsstudien finden Sie in Kapitel 9.7 der englischen Gebrauchsanweisung.

Das folgende Zytostatikum wurde getestet. Es wurden **keine** Interferenzen mit dem Test gefunden für:

| Medikament | Getestete Konzentration (µg/mL) |
|------------|---------------------------------|
| Paclitaxel | 5,5                             |

Bislang sind uns keine weiteren Substanzen (Medikamente) bekannt geworden, die einen Einfluss auf die Bestimmung von PSA in einer Probe haben.

## 10.3 High-Dose-Hook Effekt

Ein Hook-Effekt tritt in diesem Test bis zu einer Konzentration von 2000 ng/mL PSA nicht auf

## **11 RECHTLICHE GRUNDLAGEN**

### **11.1 Zuverlässigkeit der Ergebnisse**

Der Test muss exakt gemäß der Testanleitung des Herstellers abgearbeitet werden. Darüber hinaus muss der Benutzer sich strikt an die Regeln der GLP (Good Laboratory Practice) oder andere eventuell anzuwendende Regeln oder nationale gesetzliche Vorgaben halten. Dies betrifft besonders den Gebrauch der Kontrollreagenzien. Es ist sehr wichtig, bei der Testdurchführung stets eine ausreichende Anzahl Kontrollen zur Überprüfung der Genauigkeit und Präzision mitlaufen zu lassen.

Die Testergebnisse sind nur gültig, wenn alle Kontrollen in den vorgegebenen Bereichen liegen, und wenn alle anderen Testparameter die vorgegebenen Spezifikationen für diesen Assay erfüllen. Wenn Sie bezüglich eines Ergebnisses Zweifel oder Bedenken haben, setzen Sie sich bitte mit der Firma DRG in Verbindung.

### **11.2 Therapeutische Konsequenzen**

Therapeutische Konsequenzen sollten keinesfalls nur aufgrund von Laborergebnissen erfolgen, selbst dann nicht, wenn alle Testergebnisse mit den in 11.1 genannten Voraussetzungen übereinstimmen. Jedes Laborergebnis ist nur ein Teil des klinischen Gesamtbildes eines Patienten.

Nur in Fällen, in denen die Laborergebnisse in akzeptabler Übereinstimmung mit dem allgemeinen klinischen Bild des Patienten stehen, sollten therapeutische Konsequenzen eingeleitet werden.

Das Testergebnis allein sollte niemals als alleinige Grundlage für die Einleitung therapeutischer Konsequenzen dienen.

### **11.3 Haftung**

Jegliche Veränderungen des Testkits und/oder Austausch oder Vermischung von Komponenten unterschiedlicher Chargen von einem Testkit zu einem anderen, können die gewünschten Ergebnisse und die Gültigkeit des gesamten Tests negativ beeinflussen. Solche Veränderungen und/oder Austausch haben den Ausschluss jeglicher Ersatzansprüche zur Folge.

Reklamationen, die aufgrund von Falschinterpretation von Laborergebnissen durch den Kunden gemäß Punkt 11.2 erfolgen, sind ebenfalls abzuweisen. Im Falle jeglicher Reklamation ist die Haftung des Herstellers maximal auf den Wert des Testkits beschränkt. Jegliche Schäden, die während des Transports am Kit entstanden sind, unterliegen nicht der Haftung des Herstellers.

## 1 DESTINAZIONE D'USO

Il test immuno-enzimatico **DRG PSA Total ELISA** contiene materiale per la determinazione quantitativa di **antigene prostatico specifico (PSA totale, t-PSA)** nel siero o nel plasma (EDTA, eparina di litio o plasma di citrato).

**Questo test kit è adatto soltanto per l'uso diagnostico.**

## 2 PRINCIPIO DEL TEST

Il test kit DRG PSA Total ELISA è un test immunologico in fase solida con enzimi ancorati su un substrato (ELISA) basato sul **principio sandwich**.

I micropozzetti sono ricoperti con un anticorpo monoclonale diretto contro un unico sito antigenico su una molecola di PSA.

Durante l'incubazione, le molecole di PSA nel campione aggiunto si legano all'anticorpo immobilizzato. Il coniugato enzimatico aggiunto, che contiene un anticorpo anti-PSA coniugato alla perossidasi di rafano, si lega al PSA formando un complesso sandwich.

Dopo una fase di lavaggio per rimuovere tutte le sostanze non legate, la fase solida viene incubata con la soluzione di substrato. La reazione colorimetrica viene bruscamente interrotta con l'aggiunta di soluzione di arresto e viene misurata la densità ottica (DO) del prodotto giallo risultante. L'intensità del colore è proporzionale alla concentrazione dell'analita nel campione.

Una curva standard viene costruita tracciando i valori di DO rispetto alle concentrazioni di standard, e le concentrazioni di campioni sconosciuti vengono determinate usando questa curva standard.

## 3 PRECAUZIONI

- Questo kit è adatto soltanto per l'uso diagnostico in vitro. Solo per l'uso professionale.
- Si prega di usare la versione valida dell'inserito del pacco a disposizione con il kit.
- Informazioni su sostanze pericolose contenute nel kit sono riportate nel regolamento di sicurezza.
- Tutti i componenti del kit che contengono siero o plasma umano sono controllati e confermati negativi per la presenza di HIV I/II, HbsAg e HCV con metodi conformi alle norme FDA. Ciononostante tutti i componenti dovrebbero essere trattati come potenziali sostanze nocive nella manutenzione e nello smaltimento.
- Il contatto con la *Stop Solution* dovrebbe essere evitato perché contiene 0,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. L'acido solforico può provocare irritazioni cutanee e ustioni.
- Non pipettare con la bocca ed evitare il contatto con componenti del kit con la pelle o con le mucose.
- Nelle aree in cui il test viene utilizzato non fumare, mangiare, bere o fare uso di prodotti cosmetici.
- Nella manutenzione dei campioni o reagenti del kit portare guanti di latex monouso. La contaminazione dei reagenti o dei campioni con microbi può dare risultati falsi.
- L'utilizzo dovrebbe avvenire secondo regole che seguono le rispettive norme di sicurezza nazionali sulle sostanze nocive.
- Non utilizzare i reagenti dopo la scadenza indicata sul kit.
- Ogni indicazione sulla quantità indicata del protocollo del kit deve essere accuratamente seguito. Risultati ottimali possono essere ottenuti soltanto con l'uso di pipette calibrate e spettrofotometro calibrato.
- Componenti del kit con numeri di lotto diversi non devono essere combinati. È consigliabile di non utilizzare pozzetti di piastre diversi, anche se si tratta dello stesso lotto. I kit potrebbero essere stati magazzinati o spediti a condizioni diverse, cosicché le caratteristiche di legame potrebbero divergere leggermente.
- I componenti chimici e reagenti preparati o già utilizzati devono essere trattati e smaltiti secondo le norme di sicurezza nazionali sulle sostanze nocive.
- I regolamenti di sicurezza di questo prodotto possono essere richiesti direttamente dalla ditta DRG Instruments GmbH.

## 4 COMPONENTI DEL KIT

### 4.1 Contenuto del kit

1. **Microtiterwells** (Micropozzetti), 12 x 8 file (separatamente staccabili), 96 pozzetti;  
Pozzetti ricoperti con l'anti-PSA anticorpo (monoclonale)
2. **Zero Standard** (*Standard zero*), 1 flacone, 10.0 mL, pronto all'uso.  
(Diluente dei campioni)  
Contiene conservante senza mercurio.
3. **Standard (Standard 1 - 5)**, 5 flaconi, 0,5 mL ognuno, pronto all'uso;  
Concentrazione: 1,56 – 3,12 – 6,25 – 12,5 – 25,0 ng/mL  
*Gli standard sono standardizzati contro il seguente materiale di riferimento: WHO International Standard Prostate Specific Antigen NIBSC code: 96/670.*  
Contiene conservante senza mercurio.
4. **Control Low & High** (Controllo), 2 flaconi, 0,5 mL ognuno, pronto all'uso;  
Per i valori e gli intervalli di controllo si prega di fare riferimento all'etichetta della fiala o al certificato di analisi.  
Contiene conservante senza mercurio.
5. **Enzyme Conjugate** (Tracciante enzimatico), 1 flacone, 12 mL, pronto all'uso;  
Anti-PSA anticorpo coniugato alla perossidasi di rafano;  
Contiene conservante senza mercurio.
6. **Substrate Solution** (Soluzione di substrato), 1 flacone, 12 mL, pronto all'uso;  
TMB (benzidine tetrametilico).
7. **Stop Solution** (Soluzione d'arresto), 1 flacone, 14 mL, pronto all'uso;  
Contiene 0,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.  
Evitare il contatto con la soluzione d'arresto. Può causare irritazioni cutanee e ustioni.

### 4.2 Materiali richiesti ma non contenuti nel kit

- Lettore di piastre di microtitolazione calibrato (450 nm, con lunghezza d'onda di riferimento a 620 nm a 630 nm)
- Micropipette calibrate di precisione a volume variabile
- Carta assorbente
- Acqua distillata
- Timer
- Carta millimetrata o software per il calcolo dei dati

### 4.3 Magazzinaggio e stabilità del kit

A 2 °C a 8 °C i reagenti non aperti rimangono reattivi fino alla data di scadenza indicata. Non usare reagenti oltre questa data.

Tutti i reagenti aperti devono essere magazzinati a 2 °C a 8 °C. I micropozzetti devono essere magazzinati a 2 °C a 8 °C. Una volta aperti i pacchi, questi devono essere richiusi accuratamente.

Test kits aperti rimangono attivi per 8 settimane se magazzinati alle condizioni sopra descritte.

### 4.4 Preparazione dei reagenti

Prima dell'uso portare tutti i reagenti e il numero necessario di pozzetti a temperatura ambiente (20 °C a 26 °C).

### 4.5 Smaltimento del kit

La discarica del kit e di tutti i materiali/reagenti usati devono avvenire secondo i regolamenti nazionali. Informazioni aggiuntive per questo prodotto si trovano nella scheda di dati di sicurezza, sezione 13.

### 4.6 Test kits danneggiati

In caso di alcun danno al test kit o ai suoi componenti, DRG deve essere informato per iscritto, al Massimo una settimana dopo la ricezione del kit. Componenti singoli danneggiati non devono essere usati per un saggio. Questi devono essere conservati fino ad aver trovato una soluzione finale. Dopo, questi componenti devono essere scaricati secondo i regolamenti ufficiali.

## 5 CAMPIONI

Siero o plasma (EDTA, litio eparina o plasma citrato) può essere usato per questo test.

*Attenzione:* Se i campioni contengono sodio azide non devono essere utilizzati per questo test.

In generale si dovrebbe evitare l'uso di campioni emolitici, itterici o lipemici. Per ulteriori informazioni consultare il capitolo "Sostanze interferenti".

### Note importanti prima del prelievo di sangue per la determinazione della PSA:

Poiché diversi fattori possono influenzare il livello di PSA nel sangue, i medici devono assicurarsi che il paziente abbia evitato le seguenti condizioni prima di prelevare il campione di sangue.

I seguenti fattori possono comportare un aumento dei livelli di PSA:

- Manipolazione della prostata durante visite mediche come l'esame rettale digitale (DRE), l'ecografia prostatica transrettale, ecc.
- Prostatite
- Attività su bicicletta
- Rapporto sessuale (eiaculazione)
- Disfunzione epatica

I seguenti fattori possono portare a una riduzione dei livelli di PSA

- Assunzione di inibitori per la 5-alfa-reduttasi, antiandrogeni, o GnRH-analoghi

### 5.1 Collezione dei campioni

#### Siero:

Collezionare sangue tramite puntura venale (p.es. Sarstedt Monovette per siero), far coagulare e separare il siero centrifugando a temperatura ambiente.

Non centrifugare prima che la coagulazione sia completata. Campioni di pazienti con una terapia anticoagulante possono richiedere più tempo per la coagulazione.

#### Plasma:

Il sangue dovrebbe essere collezionato in tubetti da centrifuga contenenti un anticoagulante (p. es. Sarstedt Monovette con un'adeguata preparazione per il plasma) e centrifugando immediatamente dopo la puntura.

### 5.2 Magazzinaggio dei campioni

I campioni dovrebbero essere magazzinati ben chiusi fino a 7 giorni a 2 °C a 8 °C.

Campioni magazzinati per un periodo più lungo (fino a 12 mesi) dovrebbero essere congelati solo una volta a -20 °C prima dell'analisi. Congelare soltanto una volta. Invertire campioni scongelati alcune volte prima dell'uso.

### 5.3 Diluizione dei campioni

Se in un campione di siero viene trovata una concentrazione oltre lo standard più alto, questo campione può essere diluito con *Zero Standard* e nuovamente determinato.

Della diluizione deve essere però tenuto conto.

#### Esempio:

- a) diluizione 1:10: 10 µL campione + 90 µL *Zero Standard* (agitare bene)
- b) diluizione 1:100: 10 µL della diluizione a) + 90 µL *Zero Standard* (agitare bene)

## 6 ATTUAZIONE DEL TEST

### 6.1 Indicazioni generali

- Tutti i reagenti e i campioni devono essere portati a temperatura ambiente e ben mescolati prima dell'uso. Evitare la formazione di schiume.
- Una volta iniziato il procedimento del test, questo deve essere portato alla fine senza interruzione.
- Per ogni componente, standard, controllo o campione è necessario utilizzare una nuova punta monouso per evitare reazioni incrociate.
- La densità ottica dipende dal tempo d'incubazione e dalla temperatura. Perciò si rende necessario di preparare tutti i reagenti, di aprire i tappi dei flaconi e di appostare tutti i pozzetti nelle appropriate posizioni. Soltanto una tale preparazione garantisce gli stessi tempi per ogni processo di pipettamento.
- Come regola generale vale che la reazione enzimatica si svolge linearmente proporzionale con il tempo e con la temperatura.

## 6.2 Eseguito del test

Ogni analisi deve includere una curva standard.

**Nota:** è altamente consigliato di eseguire tutte le misurazioni in duplicato.

1. Fissare i pozzetti necessari sul supporto.
2. Pipettare **25 µL** ciascuno di **Standard, Control e campioni** nei pozzetti appropriati, cambiando ogni volta la punta monouso.
3. Incubare per **5 minuti** a temperatura ambiente.
4. Pipettare **100 µL Enzyme Conjugate** in ogni pozzetto. Agitare bene per 10 secondi. È molto importante raggiungere un completo mescolamento.
5. Incubare per **60 minuti** a temperatura ambiente.
6. Lavare i pozzetti **5 volte** con **400 µL** acqua distillata in ogni pozzetto, se si utilizza una piastra di lavaggio.  
- OPPURE -  
Rovesciare la piastra per vuotare i pozzetti.  
Lavare i pozzetti **5 volte** con **300 µL** acqua distillata in ogni pozzetto per il lavaggio manuale.  
Rimuovere le gocce d'acqua rimanenti rivoltando la piastra su carta assorbente.  
**Importante:**  
La sensibilità e la precisazione di questo kit sono fortemente influenzate dal corretto eseguito del lavaggio!
7. Aggiungere **100 µL** della **Substrate Solution** ad ogni pozzetto.
8. Incubare per **20 minuti** a temperatura ambiente.
9. Fermare la reazione enzimatica aggiungendo **100 µL** della **Stop Solution** ad ogni pozzetto.
10. Determinare la densità ottica (DO) della soluzione in ogni pozzetto **a 450 nm (lettura) e a 620 nm a 630 nm (sottrazione dello sfondo, raccomandata)** con un lettore di piastre di microtitolazione.  
Si raccomanda di leggere i pozzetti entro **10 minuti** dall'aggiunta della **Stop Solution**.

## 6.3 Rilevamento dei risultati

1. Determinare i valori medi della densità ottica (DO) per ogni set di standard, controlli e campioni.
2. Costruire una curva standard: riportare i valori medi della densità ottica (DO) di ogni standard contro la rispettiva concentrazione dove i valori delle DO si devono trovare sull'asse verticale (Y) e le concentrazioni sull'asse orizzontale (X).
3. Utilizzando il valore medio delle DO per ogni campione si determina la rispettiva concentrazione dalla curva standard.
4. Metodo automatico: I valori riportati in queste istruzioni per l'uso sono stati determinati tramite l'equazione a 4-parametri. (I metodi preferiti sono 4-Parameter Rodbard oppure 4-Parameter Marquardt.) Altri funzioni usati per l'elaborazione dei dati possono dare risultati leggermente differenti.
5. La concentrazione dei campioni può essere determinata direttamente dalla curva standard. Campioni con una concentrazione più elevata dello standard più concentrato devono essere diluiti. Di questo fattore di diluizione deve essere tenuto conto per il calcolo della concentrazione.

### 6.3.1 Esempio di una curva standard tipica

I seguenti dati sono a scopo dimostrativo soltanto e **non possono** sostituire i dati generati dall'eseguito del test.

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



## 7 VALORI NORMALI

È consigliabile che ogni laboratorio determini i propri valori normali e anormali.

In uno studio condotto su campioni di uomini, usando il DRG PSA Total ELISA, i seguenti valori sono stati trovati:

| Popolazione                 | n  | Media (ng/mL) | Mediano (ng/mL) | 2,5. - 97,5. percentile (ng/mL) | Intervallo (min. - max.) (ng/mL) |
|-----------------------------|----|---------------|-----------------|---------------------------------|----------------------------------|
| Uomini sani                 | 51 | 1,20          | 0,86            | 0 – 4,85                        | 0 – 5,35                         |
| Uomini sospetti (> 4 ng/mL) | 50 | 6,56          | 5,51            | 2,93 – 14,82                    | 1,33 – 16,94                     |

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

**Valore di cut-off: 4,0 ng/mL**

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

Se la concentrazione di PSA è pari o superiore a 4,0 ng/mL sono altamente raccomandati esami di follow-up.

Questa concentrazione di PSA indica un rischio elevato di cancro alla prostata, ma potrebbe anche essere causato da iperplasia prostatica benigna (BPH).

Si prega di notare che la soglia di 4 ng/mL è solo un valore indicativo.

In letteratura è riportato che le modifiche dovute a età e background etnologico potrebbero essere utili: ad esempio per uomini più giovani il limite dovrebbe essere inferiore a quello degli uomini anziani.

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

Poiché elevati livelli di PSA potrebbero anche essere causati da condizioni non cancerose, seguire gli esami potrebbe aumentare la specificità diagnostica dei valori di PSA totale.

In letteratura vengono indagate la densità della PSA, la velocità della PSA e la percentuale di PSA libera (f-PSA) per PSA totale (t-PSA) per migliorare la discriminazione tra le condizioni cancerose e non-cancerose, e ciò potrebbe essere utilizzato per ridurre biopsie prostatiche non necessarie.

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

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

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

Come per tutti i test diagnostici, una diagnosi clinica definitiva **non** dovrebbe basarsi sui risultati di un singolo dosaggio.

Una diagnosi clinica dovrebbe essere formulata dal medico in seguito ad un'attenta valutazione di tutti gli aspetti clinici assieme ai dati di laboratorio.

## 8 CONTROLLO QUALITÀ

È consigliabile utilizzare i campioni controllo secondo le norme di legge. Attraverso l'utilizzo dei campioni controllo si può raggiungere una verifica dei risultati giorno per giorno. Dovrebbero essere adoperati campioni controllo sia con un livello normale sia con uno patologico.

Le referenze con i rispettivi risultati del laboratorio QC sono elencati nel QC certificato, che è allegato al kit. I valori riportati nel QC certificato si riferiscono al lotto del kit attuale e dovrebbero essere utilizzati per un raffronto dei risultati.

È altresì consigliabile di partecipare a programmi di sicurezza sulla qualità nazionali o internazionali, per assicurarsi dell'esattezza dei risultati.

Appropriati metodi statistici per l'analisi dei valori controllo e delle rappresentazioni grafici dovrebbero essere adoperati. Nel caso che i risultati del test non combaciano con il campo di accettazione indicato dal materiale di controllo, i risultati dei pazienti devono essere considerati invalidi. In questo caso si prega di controllare i seguenti fattori d'errore: pipette, cronometri, fotometro, data di scadenza dei reagenti, condizione di magazzinaggio e d'incubazione, metodi di aspirazione e di lavaggio. Se dopo il controllo dei suddetti fattori non è rilevabile alcun errore, si prega di contattare il fornitore o direttamente la ditta DRG.

## 9 CARATTERISTICHE DEL TEST

### 9.1 Assay Dynamic Range

Le concentrazioni determinabili con questo test stanno tra 0,2 ng/mL - 25,0 ng/mL.

### 9.2 Specificità degli anticorpi (Reazione crociata)

Le seguenti sostanze sono state testate per la reattività crociata nel saggio. Non sono state trovate interferenze con il dosaggio per:

| Sostanza      | Conc. aggiunta |
|---------------|----------------|
| AFP           | 10 µg/mL       |
| CEA           | 10 µg/mL       |
| HCG           | 10 µg/mL       |
| Lattoalbumina | 10 µg/mL       |

**Ulteriori dati** sulla specificità degli anticorpi sono stati ottenuti dallo studio di verifica del DRG: HYBRiD-XL PSA (HYE-5730). Questo test utilizza gli stessi anticorpi e reagenti del kit EIA-3719 ma è stato adattato al sistema completamente automatizzato DRG: HYBRiD-XL. Per gli studi di "Comparazione metodica", consultare il capitolo 9.7 delle Istruzioni per l'uso in Inglese.

La seguente sostanza è stata testata per la cross-reattività. Non sono state trovate interferenze con il dosaggio per:

| Sostanza                                    | Conc. aggiunta |
|---|----------------|
| Complessi Plasmina- $\alpha$ 2-Antiplasmina | 5 µg/mL        |

### 9.3 Sensitività analitica

La sensitività analitica è stata calcolata dai valori medi, più due volte la deviazione standard, di venti (20) repliche dello *Zero Standard* ed erano 0,054 ng/mL.

Il limite del bianco (LoB) è 0,045 ng/mL.

Il limite di rilevabilità (LoD) è 0,216 ng/mL.

Il limite di quantificazione (LoQ) è 1,172 ng/mL.

Dati dettagliati su

### 9.4 Precisione

### 9.5 Recupero

### 9.6 Linearità

### 9.7 Comparazione metodica

si prega di consultare le dettagliate istruzioni per l'uso in inglese.

## 10 LIMITAZIONE DEL TEST

Risultati affidabili e riproducibili saranno ottenuti quando il procedimento del test è seguito con una comprensione completa delle istruzioni all'uso e seguendo una buona pratica di laboratorio (GLP).

Ogni manutenzione impropria dei campioni o modificazione al saggio può influenzare i risultati.

### 10.1 Sostanze interferenti

Emoglobina (fino a 0,1 mg/mL), bilirubina (fino a 0,2 mg/mL) e trigliceridi (fino a 15 mg/mL) non influenzano i risultati di questo test.

## 10.2 Droghe interferenti

Sono stati testati i seguenti farmaci citostatici. Non sono state rilevate interferenze con il dosaggio per:

| Farmaco            | Concentrazione testata (µg/mL) |
|--------------------|--------------------------------|
| Carboplatino       | 700,0                          |
| Cisplatino         | 200,0                          |
| Folinate di calcio | 2,3                            |
| Ciclofosfamida     | 1000,0                         |
| 5-fluorouracile    | 500,0                          |
| Doxorubicina *HCl  | 72,0                           |
| Desametasone       | 11,0                           |
| Dietilstilbestrolo | 2,0                            |
| Flutamide          | 10,0                           |
| Metotrexato        | 50,0                           |

Sono stati testati i seguenti farmaci per l'ipertensione. **Non** sono state rilevate interferenze con il dosaggio per:

| Farmaco            | Concentrazione testata (µg/mL) |
|--------------------|--------------------------------|
| Simvastatina       | 0,1                            |
| Irbesartan         | 1,5                            |
| Sildenafil citrato | 5,0                            |
| Furosemide         | 200,0                          |

In aggiunta, sono stati testati i seguenti agenti antimicrobici.

| Agente                 | Concentrazione testata (%) |
|------------------------|----------------------------|
| Cloruro di benzalconio | 0,5                        |

L'agente antimicrobico cloruro di benzalconio (0,5%) **non** mostra alcuna interferenza con il test.

**Ulteriori dati** sono stati ottenuti dallo studio di verifica del DRG: HYBRiD-XL PSA (HYE-5730). Questo test utilizza gli stessi reagenti del kit EIA-3719 ma è stato adattato al sistema completamente automatizzato DRG: HYBRiD-XL. Per gli studi di "method comparison", consultare il capitolo 9.7 delle Istruzioni per l'uso in Inglese.

Sono stati testati i seguenti farmaci citostatici. **Non** sono state rilevate interferenze con il dosaggio per:

| Farmaco    | Concentrazione testata (µg/mL) |
|------------|--------------------------------|
| Paclitaxel | 5,5                            |

Alla presente data non sono note altre sostanze (farmaci) che influenzano la misurazione del PSA nei campioni.

## 10.3 Effetto Hook (Gancio) ad alto dosaggio

Nessun effetto Hook (gancio) è stato osservato in questo prodotto fino a 2000 ng/mL di PSA.

## **11 ASPETTI LEGALI**

### **11.1 Affidabilità dei risultati**

Il test deve essere eseguito esattamente secondo il protocollo dato dal produttore. Inoltre l'utente deve seguire le regole del GLP (Good Laboratory Practice) o eventualmente altre regole comportamentali o disposizioni legali. Questo vale soprattutto per l'uso delle referenze. È molto importante utilizzare un numero appropriato di referenze in parallelo ai campioni test per poter controllare l'esattezza e la precisione del test.

I risultati del test sono validi soltanto se tutte le referenze cadono nei margini prestabiliti e se tutti gli altri parametri del test soddisfano la specificazione per questo test. Se esistono dubbi o domande su questi risultati, si prega di contattare la ditta DRG.

### **11.2 Conseguenze terapeutiche**

Soltanto sulla base dei risultati dei laboratori non dovrebbero essere intraprese delle conseguenze terapeutiche di alcun tipo, anche se i risultati del test sono d'accordo con gli aspetti articolati nel punto 11.1. Ogni risultato di laboratorio è soltanto una parte di un quadro clinico completo di un paziente.

Soltanto in casi in cui i risultati di un test del laboratorio si accordano con il quadro clinico dell'ammalato, si possono intraprendere delle conseguenze terapeutiche.

Il risultato del test da solo non è base sufficiente per lo stabilimento di una terapia.

### **11.3 Responsabilità legali**

Ogni cambiamento del protocollo del test e/o lo scambio o il mescolamento di componenti provenienti da cariche diverse possono influenzare negativamente i risultati e compromettere la validità del test. Questi cambiamenti e/o scambi annullano ogni diritto al risarcimento.

Si respingano inoltre tutti i richiami risultanti da interpretazioni sbagliate da parte dell'utente secondo il paragrafo 11.2. Nel caso di reclamazione, la garanzia del produttore è limitato al valore massimo del test kit. Ogni danno provocato durante il trasporto del kit non sottostà alla responsabilità del produttore.

## 1 FINALIDAD PREVISTA

El **Kit de inmunoensayo enzimático DRG PSA Total ELISA** proporciona los materiales necesarios para la determinación cuantitativa del **antígeno prostático específico total (t-PSA)** en suero o plasma (EDTA, heparina de litio o plasma citrado).

Este ensayo está diseñado solo para **diagnóstico *in vitro***.

La determinación de los niveles del PSA, junto con el tacto rectal, se utiliza para calcular el riesgo que tienen los hombres de padecer cáncer de próstata o para supervisar la eficacia del tratamiento del cáncer de próstata en los pacientes.

## 2 FUNDAMENTO DEL ENSAYO

El Kit DRG PSA Total ELISA es un ensayo en fase sólida de inmuoadsorción unido a enzimas (ELISA), basado en el **principio del sándwich**.

Los pocillos de las placas están recubiertos con un anticuerpo monoclonal dirigido contra un único foci antigénico de la molécula de PSA.

Durante la incubación, las moléculas de PSA en la muestra añadida se unen al anticuerpo inmovilizado. El conjugado enzimático agregado, que contiene un anticuerpo anti-PSA marcados con peroxidasa de rábano, se une al PSA formando un complejo sándwich.

Después de un paso de lavado para eliminar todas las sustancias no ligadas, la fase sólida se incuba con la solución de sustrato. La reacción colorimétrica se detiene mediante la adición de la solución de parada, y se mide la densidad óptica (OD) del producto amarillo resultante. La intensidad del color es proporcional a la concentración del analito en la muestra.

Se construye una curva estándar trazando los valores de DO frente a las concentraciones de los estándares, y las concentraciones de las muestras desconocidas se determinan utilizando esta curva estándar.

## 3 PRECAUCIONES

- Este kit es solamente para diagnóstico *in vitro*. Solo para uso profesional.
- Por favor, se usa solo la versión válida de la metodología técnica incluido aquí en el kit.
- Para obtener información de las sustancias peligrosas incluidas en el kit por favor mirar las hojas de los datos de seguridad del material.
- Todos los reactivos en este kit de ensayo que contienen suero o plasma humano se han ensayado y confirmado ser negativos para HIV I/II, HBsAg y HCV mediante procedimientos aprobados por la FDA. Sin embargo, todos los reactivos deben ser tratados tanto en su uso como dispensación como potencialmente biopeligrosos.
- Evitar contacto con *Stop Solution* que contiene H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 M. Puede provocar irritación y quemaduras en la piel.
- Nunca pipetear con la boca y evitar el contacto de los reactivos y las muestras con la piel y con membranas mucosas.
- No fumar, comer, beber o usar cosméticos en áreas donde las muestras o los reactivos del kit están siendo usados.
- Usar guantes de látex cuando se utilicen las muestras y los reactivos. La contaminación microbiana de los reactivos o las muestras puede dar resultados erróneos.
- El manejo debe realizarse de acuerdo a los procedimientos definidos por las guías o regulación nacionales de seguridad de sustancias biopeligrosas.
- No utilizar los reactivos después de su fecha de caducidad que aparece en las etiquetas del kit.
- Todos los volúmenes indicados han de ser realizados de acuerdo con el protocolo. Los resultados óptimos del ensayo se obtienen solo cuando se utilizan pipetas y lectores de microplacas calibrados.
- No mezclar o usar componentes de kits con distinto número de lote. Se recomienda no intercambiar pocillos de distintas placas incluso si son del mismo lote. Los kits pueden haber sido enviados o almacenados bajo diferentes condiciones y las características de unión de las placas pueden resultar diferentes.
- Los compuestos químicos y los reactivos preparados o utilizados han de tratarse como residuos peligrosos de acuerdo con las guías o regulación nacionales de seguridad de sustancias biopeligrosas.
- Las hojas de los datos de seguridad de este producto están disponibles bajo pedido directamente a DRG Instruments GmbH.

## 4 COMPONENTES DEL KIT

### 4.1 Componentes del Kit

1. **Microtiterwells** (Placas multipocillo), 12 x 8 tiras separables, 96 pocillos; Pocillos recubiertos con anticuerpo anti-PSA (monoclonal).
2. **Zero Standard** (Estándar cero), 1 vial, 10,0 mL, listo para usar. (Solución para dilución de la muestra)  
Contiene conservante sin mercurio.
3. **Standard (Standard 1 - 5)**, (Estándar), 5 viales, 0,5 mL cada, listos para usar; Concentraciones: 1,56 – 3,12 – 6,25 – 12,5 – 25,0 ng/mL  
*Los estándares están calibrado contra el siguiente material de referencia: WHO International Standard Prostate Specific Antigen NIBSC code: 96/670*  
Contiene conservante sin mercurio.
4. **Control Low & High** (Control), 2 viales, 0,5 mL cada, listos para usar; Para los valores y rangos de control, por favor consulte la etiqueta del frasco o el Certificado de Análisis.  
Contiene conservante sin mercurio.
5. **Enzyme Conjugate** (Conjugado enzimático), 1 vial, 12 mL, listo para usar; Anticuerpo anti-PSA conjugado con la peroxidasa de rábano;  
Contiene conservante sin mercurio.
6. **Substrate Solution** (Solución de sustrato), 1 vial, 12 mL, listo para usar; Tetrametilbencidina (TMB).
7. **Stop Solution** (Solución de parada), 1 vial, 14 mL, listo para usar; Contiene 0.5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.  
Evitar el contacto con la Solución de parada. Puede causar irritación y quemaduras en al piel.

### 4.2 Equipamiento y material requerido pero no provisto

- Lector de microplacas calibrado (450 nm, con longitud de onda de referencia a 620 nm a 630 nm)
- Micropipetas de precisión variable calibradas
- Papel absorbente
- Agua destilada
- Temporizador
- Papel cuadriculado o software para el cálculo de datos

### 4.3 Almacenamiento y estabilidad del kit

Cuando se almacena a 2 °C a 8 °C, los reactivos sin abrir mantienen su reactividad hasta la fecha de caducidad. No utilizar los reactivos más allá de esta fecha.

Los reactivos abiertos han de almacenarse a 2 °C a 8 °C. Las placas multipocillo han de almacenarse a 2 °C a 8 °C. Una vez se ha abierto la bolsa hay que tener cuidado y cerrarla de nuevo.

Los kits abiertos conservan su actividad durante 8 semanas si se almacenan como se ha descrito arriba.

### 4.4 Preparación de los Reactivos

Dejar que todos los reactivos y el número requerido de tiras alcancen la temperatura ambiente (20 °C a 26 °C) antes de usarse.

### 4.5 Eliminación del Kit

El desecho del kit y de los materiales/reactivos usados ha de realizarse conforme a la regulación nacional en vigor. Información adicional sobre este producto se ofrece en las hojas de datos de seguridad (Safety Data Sheet), sección 13).

### 4.6 Kits de ensayo dañados

En caso de cualquier daño severo en el kit o en sus componentes, DRG ha de ser informada por escrito una semana después de recibir el kit como fecha límite. Componentes individuales que hayan sufrido daños importantes no deberían usarse para realizar el test. Han de ser almacenados hasta que se haya encontrado una solución final al problema. Después de encontrarse una solución, pueden ser desechados en concordancia con las reglas oficiales en vigor.

## 5 MUESTRAS

En este ensayo pueden usarse suero o plasma (EDTA, heparina de litio o plasma de citrato).

*Tener en cuenta:* No deben usarse muestras que contengan acida sódica.

En general, se debe evitar el uso de muestras hemolíticas, ictericas o lipémicas. Para más información consulte el capítulo "*Sustancias que pueden interferir*".

### Notas importantes antes de la extracción de sangre para la determinación del PSA:

Determinados factores pueden influir en el nivel del PSA en la sangre, por ello, los médicos deben cerciorarse de que los pacientes han evitado las siguientes situaciones antes de recoger la muestra de sangre.

Las siguientes condiciones pueden causar una elevación de los niveles del PSA:

- Manipulación de la próstata durante exámenes médicos como tacto rectal, ecografía transrectal de la próstata, etc.
- Prostatitis
- Hacer ciclismo
- Mantener relaciones sexuales (con eyaculación)
- Insuficiencia hepática

Las siguientes condiciones pueden causar una disminución de los niveles del PSA:

- Ingesta de inhibidores de la 5-alfa reductasa, antiandrógenos o análogos de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH)

### 5.1 Toma de muestras

#### Suero:

Recoger la sangre por punción en la vena (ej. Sarstedt Monovette para el suero), permitir coagulación, y separar el suero por centrifugación a temperatura ambiente. No centrifugar antes de la coagulación completa. Las muestras de pacientes que reciben terapia anticoagulante requieren más tiempo para coagular.

#### Plasma:

Toda la sangre ha de recogerse en tubos de centrifuga que contengan anticoagulante (Ej. Sarstedt Monovette con una preparación adecuada para el plasma) y centrifugar inmediatamente tras la recogida.

### 5.2 Almacenamiento de las muestras

Las muestras deben ser tapadas y pueden ser almacenadas hasta 7 días a 2 °C a 8 °C antes del ensayo.

Las muestras almacenadas por un período de tiempo mas largo (hasta 12 meses) han de congelarse sólo una vez a -20 °C antes del ensayo. Las muestras descongeladas deben invertirse varias veces antes del ensayo.

### 5.3 Dilución de las muestras

Si en un ensayo inicial, se encuentra una muestra que presenta valores mayores que el estándar mas concentrado, ha de diluirse con *Zero Standard* y volver a ensayarse como se describe en el Procedimiento de Ensayo.

Para el cálculo de las concentraciones habrá que tener en cuenta el factor de dilución.

#### Ejemplo:

- a) dilución 1:10: 10 µL muestra + 90 µL *Zero Standard* (mezclar totalmente)
- b) dilución 1:100: 10 µL dilución a) 1:10 + 90 µL *Zero Standard* (mezclar totalmente).

## 6 PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

### 6.1 Consideraciones generales

- Todos los reactivos y muestras han de estar a temperatura ambiente antes de su uso. Todos los reactivos deben mezclarse sin formar espuma.
- Una vez se ha comenzado el ensayo deben completarse todos los pasos sin interrupción.
- Utilizar puntas de pipeta de plástico nuevas para cada estándar, control o muestra para evitar combinaciones cruzadas.
- La densidad óptica es función del tiempo de incubación y la temperatura. Antes de comenzar el ensayo, se recomienda que todos los reactivos estén preparados, tapas removidas, todos los pocillos que se necesiten asegurados en recipiente, etc. Esto asegurará un tiempo similar para cada paso de pipeteo sin que haya interrupciones.
- Como regla general, la reacción enzimática es linealmente proporcional al tiempo y a la temperatura.

## 6.2 Procedimiento de ensayo

Cada uno debe incluir una curva de estándares.

**Nota:** es muy recomendable realizar todas las determinaciones por duplicado.

1. Asegurar el número deseado de pocillos en el recipiente.
2. Dispensar **25 µL** de cada **Standard, Control** y **muestras** con puntas nuevas en los pocillos adecuados.
3. Incubar durante **5 minutos** a temperatura ambiente.
4. Dispensar **100 µL** de **Enzyme Conjugate** a cada pocillo.  
Mezclar totalmente durante 10 segundos. Es importante mezclar completamente en este paso.
5. Incubar durante **60 minutos** a temperatura ambiente.
6. Lavar los pocillos **5 veces** con **400 µL** agua destilada por pocillo, si se utiliza un lavador de placas.  
- O -  
Sacudir enérgicamente el contenido de los pocillos.  
Lavar los pocillos **5 veces** con **300 µL** agua destilada por pocillo para el lavado manual.  
Realizar un golpe seco de los pocillos contra el papel absorbente para eliminar las gotas residuales.  
**Nota importante:**  
La sensibilidad y la precisión de este ensayo se ve marcadamente influenciada por la realización correcta del proceso de lavado!
7. Adicionar **100 µL** de **Substrate Solution** a cada pocillo.
8. Incubar durante **20 minutos** a temperatura ambiente.
9. Parar la reacción enzimática mediante la adición de **100 µL** de **Stop Solution** a cada pocillo.
10. Determinar la densidad óptica (DO) de la solución en cada pocillo a **450 nm (lectura)** y a **620 nm a 630 nm (se recomienda la sustracción de fondo)** con un lector de microplacas. Se recomienda que los pocillos se lean dentro de los **10 minutos** siguientes a la adición de la solución de parada (*Stop Solution*).

## 6.3 Cálculo de los Resultados

1. Calcular los valores de densidad óptica (DO) promedio para cada conjunto de estándares, controles y muestras de pacientes.
2. Construir una curva estándar mediante la representación de la densidad óptica media obtenida para cada estándar frente a su concentración con el valor de DO en el eje vertical (Y) y la concentración en el eje horizontal (X).
3. Usando el valor de la DO media de cada muestra determinar la concentración correspondiente a partir de la curva estándar.
4. Método automatizado: Los resultados en las instrucciones de uso se han calculado automáticamente usando una curva de regresión 4-Parámetros. (4-Parámetros Rodbard o 4-Parámetros Marquardt son los métodos preferidos.) Otras funciones de regresión darán lugar a resultados sensiblemente diferentes.
5. La concentración de las muestras puede leerse directamente de la curva de estándares. Las muestras con concentraciones superiores al mayor estándar han de diluirse. Para el cálculo de las concentraciones hay que tener en cuenta el factor de dilución.

### 6.3.1 Ejemplo de una Curva Estándar Típica

Los siguientes datos son solamente para la explicación y **no** pueden ser utilizados en lugar de los datos generados en el momento del ensayo.

| Estándar                | Densidad óptica (450 nm) |
|-------------------------|--------------------------|
| Zero Standard (0 ng/mL) | 0,05                     |
| Standard 1 (1,56 ng/mL) | 0,24                     |
| Standard 2 (3,12 ng/mL) | 0,39                     |
| Standard 3 (6,25 ng/mL) | 0,74                     |
| Standard 4 (12,5 ng/mL) | 1,27                     |
| Standard 5 (25,0 ng/mL) | 2,01                     |



## 7 VALORES ESPERADOS

Se recomienda encarecidamente que cada laboratorio determine sus valores normales e inusuales.

En un estudio realizado con muestras de hombres, usando el DRG PSA Total ELISA, se obtuvieron los siguientes valores:

| Población                       | n  | Media (ng/mL) | Mediana (ng/mL) | Percentil 2,5 - 97,5 (ng/mL) | Rango (min. - max.) (ng/mL) |
|---------------------------------|----|---------------|-----------------|------------------------------|-----------------------------|
| Hombres sanos                   | 51 | 1,20          | 0,86            | 0 – 4,85                     | 0 – 5,35                    |
| Hombres sospechosos (> 4 ng/mL) | 50 | 6,56          | 5,51            | 2,93 – 14,82                 | 1,33 – 16,94                |

El umbral generalmente recomendado para los exámenes de seguimiento es:

**Valor límite PSA: 4,0 ng/mL**

Los hombres sanos normalmente presentan una concentración del PSA inferior a 4,0 ng/mL.

Si la concentración del PSA es igual o superior a 4,0 ng/mL, es muy recomendable realizar exámenes de seguimiento. Esta concentración de PSA indica que existe un elevado riesgo de padecer cáncer de próstata, pero también puede estar causado por la hiperplasia benigna de próstata (HBP).

Debe tenerse en cuenta que el umbral de 4 ng/mL es solamente un valor de referencia.

En las publicaciones se indica que las modificaciones según la edad y el origen étnico pueden servir de ayuda, por ejemplo, el umbral para los hombres más jóvenes debe ser inferior que para los hombres de edad avanzada.

Es importante tener en cuenta que algunos tumores de la próstata no causan niveles elevados de PSA, por lo que las determinaciones del PSA nunca deben sustituir al DRE, sino que sólo deben utilizarse junto con el examen rectal digital (DRE).

Dado que los niveles elevados del PSA pueden también estar causados por enfermedades no cancerosas, los exámenes de seguimiento podrían aumentar la especificidad diagnóstica de los valores del PSA total.

En las publicaciones se tratan conceptos como la densidad del PSA, la velocidad del PSA y la relación del f PSA con el t-PSA para mejorar la discriminación entre las enfermedades cancerosas y no cancerosas, y pueden utilizarse para reducir el número de biopsias de próstata innecesarias.

No obstante, la biopsia de próstata es el único método que puede finalmente demostrar la presencia del cáncer de próstata.

**Nota: los valores del PSA solo pueden utilizarse para estimar el riesgo de padecer cáncer.**

**Siempre deben interpretarse junto con otros resultados clínicos y no deben utilizarse como la única base para el diagnóstico del cáncer de próstata.**

Los resultados obtenidos no deberían ser el único motivo para una intervención terapéutica. Los resultados han de correlacionarse con otras observaciones clínicas y tests de diagnóstico.

## 8 CONTROL DE CALIDAD

Se recomienda usar muestras control de acuerdo con las leyes estatales y federales. El uso de muestras control se recomienda para asegurar la validez diaria de los resultados. Usar controles tanto a niveles normal como patológico.

Los controles y los correspondientes resultados del Laboratorio de control de calidad están fijados en el certificado de control de calidad que acompañan al kit. Los valores y los rangos fijados en la hoja del control de calidad se refieren siempre al kit actual y deben usarse para la comparación directa de los resultados.

Es recomendable también hacer uso de programas de Aseguramiento de la Calidad nacionales o internacionales para asegurar la exactitud de los resultados.

Utilizar métodos estadísticos apropiados para el análisis de los valores y tendencia de los controles. Si los resultados del ensayo no se ajustan a los rangos aceptables establecidos en los controles, los resultados obtenidos de los pacientes han de considerarse inválidos.

En este caso, por favor comprobar las siguientes áreas técnicas: Pipeteo y tiempo empleado, fotómetro, fecha de caducidad de los reactivos, condiciones de almacenamiento e incubación, métodos de aspiración y lavado.

Después de comprobar los asuntos arriba mencionado sin encontrar ningún error, contactar con su distribuidor o con DRG directamente.

## 9 CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

### 9.1 Rango dinámico del ensayo

El rango del ensayo se encuentra entre 0,2 ng/mL - 25,0 ng/mL.

### 9.2 Especificidad de los Anticuerpos (Reactividad Cruzada)

Las siguientes sustancias se midieron para determinar la reactividad cruzada en el ensayo. No se encontraron interferencias con el ensayo para:

| Sustancia     | Cantidad añadida |
|---------------|------------------|
| AFP           | 10 µg/mL         |
| CEA           | 10 µg/mL         |
| HCG           | 10 µg/mL         |
| Lactoalbúmina | 10 µg/mL         |

Para **más información**, por favor consulte la versión detallada en inglés de las Instrucciones de Uso.

### 9.3 Sensibilidad Analítica

La sensibilidad analítica se calculó a partir de la media mas dos veces la desviación estándar de veinte (20) réplicas del *Zero Standard* y resultó ser 0,054 ng/mL.

El límite del blanco (LoB) es 0,045 ng/mL.

El Límite de Detección (LoD) es 0,216 ng/mL.

El Límite de Cuantificación (LoQ) es 1,172 ng/mL.

Para información sobre

### 9.4 Precisión

### 9.5 Recuperación

### 9.6 Linealidad

### 9.7 Comparativa de métodos

por favor consulte la versión detallada en inglés de las Instrucciones de Uso.

## 10 LIMITACIONES DE USO

Únicamente se obtendrán resultados fiables y reproducibles, cuando el procedimiento del ensayo se realice entendiendo las instrucciones de uso correctamente y desarrollando buenas prácticas de laboratorio.

Cualquier manejo impropio de las muestras o modificación del test puede influenciar los resultados.

### 10.1 Sustancias que pueden interferir

Hemoglobina (hasta 0,1 mg/mL), Bilirrubina (hasta 0,2 mg/mL) y Triglicéridos (hasta 15 mg/mL) no influyen los resultados del ensayo.

### 10.2 Interferencias con drogas

Se probaron los siguientes fármacos citostáticos. **No** se encontraron interferencias con el ensayo para:

| Droga              | Concentración probada (µg/mL) |
|--------------------|-------------------------------|
| Carboplatino       | 700,0                         |
| Cisplatino         | 200,0                         |
| Folinato de calcio | 2,3                           |
| Ciclofosfamida     | 1000,0                        |
| 5-Fluorouracilo    | 500,0                         |
| Doxorrubicina* HCl | 72,0                          |
| Dexametasona       | 11,0                          |
| Dietilestibestrol  | 2,0                           |
| Flutamida          | 10,0                          |
| Metotrexato        | 50,0                          |

Además, se probaron los siguientes fármacos para la hipertensión. **No** se encontraron interferencias con el ensayo para:

| <b>Droga</b>           | <b>Concentración probada (µg/mL)</b> |
|------------------------|--------------------------------------|
| Simvastatina           | 0,1                                  |
| Irbesartán             | 1,5                                  |
| Citrato de sildenafilo | 5,0                                  |
| Furosemida             | 200,0                                |

Además, se probó el siguiente agente antimicrobiano.

| <b>Compuesto</b>       | <b>Concentración probada (%)</b> |
|------------------------|----------------------------------|
| Cloruro de benzalconio | 0,5                              |

El agente antimicrobiano Cloruro de Benzalconio (0,5%) no muestra ninguna interferencia con el ensayo.

*Para **más información**, por favor consulte la versión detallada en inglés de las Instrucciones de Uso.*

Hasta ahora no se han encontrado sustancias (drogas) conocidas por nosotros, que tengan influencia en la medida de PSA en una muestra.

### **10.3 Efecto de Alta Concentración (Gancho)**

No se ha observado efecto gancho en este ensayo hasta 2000 ng/mL de PSA.

## **11 ASPECTOS LEGALES**

### **11.1 Fiabilidad de los Resultados**

El ensayo debe realizarse exactamente de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Mas aún, el usuario debe ajustarse estrictamente a las reglas BPL (Buenas Prácticas de Laboratorio) o a otros estándares y/o leyes nacionales aplicables. Esto es especialmente relevante para el uso de reactivos control. Es importante incluir siempre, dentro del procedimiento de ensayo, un número suficiente de controles para validar la exactitud y la precisión del ensayo.

Los resultados del ensayo son válidos sólo si todos los controles se encuentran dentro de los rangos especificados y si todos los otros parámetros del ensayo se encuentran dentro de las especificaciones dadas para el ensayo. En caso de alguna duda o inquietud, por favor, contactar con DRG.

### **11.2 Consecuencias Terapéuticas**

Las consecuencias terapéuticas nunca deben basarse sólo en los resultados de laboratorio incluso si todos los resultados del ensayo están de acuerdo con los asuntos fijados en el punto 11.1. Cualquier resultado de laboratorio es solamente una parte del cuadro clínico de un paciente.

Solamente en los casos donde los resultados de laboratorio están en acuerdo con todo el cuadro clínico de un paciente, se pueden derivar consecuencias terapéuticas.

Nunca deben derivarse consecuencias terapéuticas a partir de solamente el resultado obtenido en el ensayo

### **11.3 Responsabilidad**

Cualquier modificación del kit y/o cambio o mezcla de cualquier componente procedentes de kits de lotes diferentes puede afectar negativamente a los resultados esperados y en la validez de todo el test. Esas modificaciones y/o cambios invalidan cualquier reclamación de reposición.

Las reclamaciones emitidas debidas a una mala interpretación de los resultados de laboratorio por parte del comprador referidos al punto 11.2 son también inválidas. A pesar de todo, en el caso de cualquier reclamación, la responsabilidad del fabricante no excede el valor del kit. Cualquier daño provocado al kit durante su transporte no está sujeto a la responsabilidad del fabricante.

## 1 UTILISATION PRÉVUE

Le kit de dosage immuno-enzymatique **DRG PSA Total ELISA** propose le matériel requis pour la mesure quantitative de **totale d'antigène spécifique de la prostate (t-PSA)** dans le sérum ou le plasma (plasma EDTA, héparine de lithium ou citrate).

Ce kit est à utiliser uniquement dans le cadre de tests diagnostiques *in vitro*.

La détermination des niveaux de PSA est utilisée pour évaluer le risque de carcinome de la prostate chez les hommes conjointement avec un toucher rectal (TR) ou pour surveiller l'efficacité d'un traitement du carcinome de la prostate sur les patients.

## 2 PRINCIPE DU TEST

Le kit DRG PSA Total ELISA est un test immuno-enzymatique en phase solide (ELISA) basé sur le **principe du sandwich**.

Les puits de microtitration sont recouverts d'un anticorps monoclonal dirigé contre un site antigénique unique de la molécule de PSA.

Pendant l'incubation, les molécules de PSA de l'échantillon ajouté se lient à l'anticorps immobilisé.

Le conjugué enzymatique, qui est ajouté, contenant un anticorps de PSA conjugué à la peroxydase de raifort (HRP), se lie au PSA en formant un complexe sandwich

Après une étape de lavage pour éliminer toutes les substances non liées, la phase solide est incubée avec la solution de substrat. La réaction colorimétrique est arrêtée par l'ajout d'une solution d'arrêt, et la densité optique (DO) du produit jaune résultant est mesurée. L'intensité de la couleur est proportionnelle à la concentration de l'analyte dans l'échantillon.

Une courbe standard est construite en traçant les valeurs de DO par rapport aux concentrations des étalons, et les concentrations des échantillons inconnus sont déterminées à l'aide de cette courbe standard.

## 3 AVERTISSEMENTS ET PRECAUTIONS

- Ce kit est uniquement destiné aux tests diagnostiques *in vitro*. Pour un usage professionnel seulement.
- Utilisez uniquement la version valide d'instructions d'utilisation qui est incluse dans le kit.
- Les informations concernant la toxicité des réactifs contenus dans ce kit sont présentées dans la fiche de sécurité (« Safety Data Sheets »).
- Tous les réactifs de ce kit contenant du sérum ou du plasma humain ont été testés avec des résultats négatifs pour le VIH I/II, le HBsAg et le HCV selon les normes FDA en vigueur. Néanmoins, lors de leur utilisation, tous les réactifs de ce kit doivent être manipulés avec précaution.
- Eviter les contacts avec la *Stop Solution*, celle-ci contient 0,5 M de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Cela pourrait engendrer irritations ou brûlures de la peau.
- Ne jamais pipeter avec la bouche, et éviter tout contact de la peau ou des muqueuses avec les réactifs ou les échantillons.
- Ne pas fumer, manger, boire ou utiliser des produits cosmétiques dans les zones où les échantillons ou le kit ont été maniés.
- Porter des gants d'examen lors de l'utilisation des échantillons ou des réactifs. Une contamination microbienne des échantillons ou des réactifs pourrait fausser les résultats.
- L'utilisation de ce kit devra être en accord avec les normes ou recommandations nationales de sécurité en vigueur concernant les produits à risque biologique.
- Ne pas utiliser les réactifs au-delà de la date d'expiration inscrite sur l'emballage.
- Tous les volumes indiqués doivent être scrupuleusement respectés, comme indiqué dans le protocole expérimental. Seule l'utilisation de pipettes calibrées ou d'un spectrophotomètre lecteur de microplaques calibré garantit l'obtention de résultats optimaux à ce test.
- Ne pas mélanger ou utiliser des réactifs contenus dans des kits de lots différents. Il est conseillé de ne pas échanger les puits de différentes plaques, même si celles-ci proviennent du même lot. Les kits peuvent avoir été transportés ou stockés différemment, et les caractéristiques de liaison de chaque plaque pourraient ainsi être modifiées.
- L'élimination des solutions chimiques et des réactifs contenus dans ce kit, utilisés ou non, doit être en accord avec la réglementation nationale en vigueur concernant l'élimination des déchets à risque biologique.
- La fiche de sécurité concernant ce produit peut être obtenue en contactant directement DRG Instruments GmbH.

## 4 RÉACTIFS

### 4.1 Réactifs fournis

1. **Microtiterwells** (*Microplaques*), 12 x 8 (à détacher) barrettes, plaques de 96 puits; Les puits sont recouverts avec un anticorps anti-PSA (monoclonal).
2. **Zero Standard** (Zero Standard), 1 flacon, 10.0 mL, prêts à l'emploi. (Solution pour dilution de l'échantillon)  
Contient un agent de conservation sans mercure.
3. **Standard (Standard 1 - 5)**, 5 flacons, 0,5 mL chacun, prêts à l'emploi; Concentrations: 1,56 – 3,12 – 6,25 – 12,5 – 25,0 ng/mL  
*Les standards sont étalonnés par rapport au matériel de référence suivante: WHO International Standard Prostate Specific Antigen NIBSC code: 96/670*  
Contient un agent de conservation sans mercure.
4. **Control Low & High** (Contrôle), 2 flacons, 0,5 mL chacun, prêts à l'emploi; Pour les valeurs de contrôle et les limites, se référer à l'étiquette du flacon ou au certificat d'analyse.  
Contient un agent de conservation sans mercure.
5. **Enzyme Conjugate** (Conjugué enzymatique), 1 flacon, 12 mL, prêt à l'emploi; Anticorps anti-PSA conjugué à la HRP;  
Contient un agent de conservation sans mercure.
6. **Substrate Solution** (Solution substrat), 1 flacon, 12 mL, prêt à l'emploi; Tétraméthylbenzidine (TMB).
7. **Stop Solution** (Solution d'arrêt), 1 flacon, 14 mL, prêt à l'emploi; Contient 0,5 M de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.  
Eviter les contacts avec la solution stop. Cela pourrait engendrer des irritations ou brûlures de la peau.

### 4.2 Equipement et matériel requis, mais non fournis

- Un spectrophotomètre lecteur de microplaques calibré (450 nm, avec longueur d'onde de référence à 620 nm à 630 nm)
- Des micro-pipettes de précision variables et calibrées
- Du papier absorbant
- De l'eau distillée
- Un minuteur
- Papier graphique ou logiciel pour la réduction des données

### 4.3 Stockage et stabilité du kit

Les réactifs contenus dans des flacons non-ouverts, stockés à 2 °C à 8 °C, seront stables jusqu'à la date d'expiration inscrite sur l'étiquette. Ne pas utiliser les réactifs au-delà de cette date.

Les réactifs contenus dans des flacons ouverts doivent être stockés à 2 °C à 8 °C. Les microplaques doivent être stockées à 2 °C à 8 °C. Une fois le sachet en aluminium ouvert, attention à bien refermer le flacon.

Les kits ouverts conservent leur activité durant 8 semaines s'ils sont stockés comme précédemment mentionné.

### 4.4 Préparation des réactifs

Amener tous les réactifs et le nombre de barrettes nécessaires au test à température ambiante (20 °C à 26 °C) avant utilisation.

### 4.5 Elimination du kit

L'élimination du kit et de tout le matériel/tous les réactifs doit être conforme aux réglementations nationales. Des informations spécifiques au produit sont indiquées dans la fiche de données de sécurité, rubrique 13.

### 4.6 Kits endommagés

En cas de dommage du kit de tests ou de ses composants, DRG doit en être informé par écrit, au plus tard une semaine après réception du kit. Les composants endommagés ne doivent pas être utilisés pour le test. Ils doivent être stockés jusqu'à ce qu'une solution adaptée ait été trouvée. Après cela, ils doivent être éliminés conformément à la réglementation en vigueur.

## 5 PRÉLÈVEMENT ET PRÉPARATION DES SPÉCIMENS

Il est possible d'utiliser du sérum ou du plasma (plasma EDTA, héparine de lithium ou citrate) pour ce dosage.

*Remarque:* Les échantillons contenant de l'azide de sodium ne doivent pas être utilisés pour ce test.

En général, il faut éviter d'utiliser des échantillons hémolytiques, ictériques ou lipémiques. Pour plus d'informations, se reporter au chapitre "*Substances interférentes*".

### Remarques importantes à prendre en compte avant la prise de sang pour la détermination de niveaux de PSA

Étant donné que différents facteurs peuvent influencer les niveaux de PSA dans le sang, les médecins doivent s'assurer que le patient a bien évité les circonstances suivantes avant le prélèvement d'échantillon sanguin.

Les circonstances suivantes peuvent augmenter les niveaux de PSA :

- Manipulation de la prostate au cours d'examens médicaux, comme le toucher rectal (TR), échographie prostatique transrectale, etc.
- Prostatite
- Cyclisme
- Activité sexuelle (éjaculation)
- Troubles hépatiques

Les circonstances suivantes peuvent diminuer les niveaux de PSA :

- Prise d'inhibiteurs de la 5-alpha réductase, d'anti-androgènes ou d'analogues de la gonadolibérine

### 5.1 Prélèvement des spécimens

#### Sérum:

Prélever le sang par ponction veineuse (ex. Sarstedt Monovette pour sérum), laisser coaguler, puis séparer le sérum par centrifugation à température ambiante. Ne pas centrifuger avant que la coagulation ne soit terminée. Les patients sous traitement anti-coagulant peuvent demander un temps de coagulation plus important.

#### Plasma:

Le sang total doit être prélevé dans des tubes de centrifugation contenant un anti-coagulant (Sarstedt Monovette avec une préparation appropriée de plasma) et centrifugé immédiatement après le prélèvement.

### 5.2 Stockage et préparation des spécimens

Les tubes contenant les échantillons doivent être fermés et peuvent être stockés jusqu'à 7 jours à 2 °C à 8 °C avant d'être testés.

Les échantillons stockés pour un temps prolongé (jusqu'à 12 mois) doivent être congelés à -20 °C avant d'être testés. Les échantillons décongelés doivent être retournés plusieurs fois avant le test.

### 5.3 Dilution de l'échantillon

Si, lors d'un test préliminaire, la concentration de l'échantillon se révèle être supérieure à celle du standard le plus concentré, alors l'échantillon doit être dilué avec le *Zero Standard* et testé de nouveau, comme décrit dans Réalisation du test.

Pour le calcul des concentrations, ce facteur de dilution doit être pris en considération.

#### Exemple:

- a) dilution 1:10: 10 µL de l'échantillon + 90 µL *Zero Standard* (bien mélanger).
- b) dilution 1:100: 10 µL dilution a) 1:10 + 90 µL *Zero Standard* (bien mélanger).

## 6 RÉALISATION DU TEST

### 6.1 Remarques générales

- Tous les réactifs et échantillons doivent être amenés à température ambiante avant utilisation. Tous les réactifs doivent être mélangés, sans formation de mousse.
- Une fois la procédure engagée, toutes les étapes doivent être réalisées sans interruption.
- Utiliser un nouvel embout de pipette pour chaque standard, contrôle ou échantillon, ceci afin d'éviter toute contamination.
- La densité optique est fonction du temps d'incubation et de la température. Avant de commencer le test, il est recommandé de préparer tous les réactifs, bouchons ouverts, de préparer les puits des microplaques, etc. Cela garantira un intervalle de temps équivalent entre chaque étape, sans interruption.
- En règle générale, la réaction enzymatique est linéairement proportionnelle au temps et à la température.

## 6.2 Réalisation du dosage

Chaque test doit inclure une courbe étalon.

**Note :** *Il est fortement recommandé d'effectuer toutes les mesures en double.*

1. Disposer le nombre de puits de micro-titration désiré dans le support.
2. Déposer **25 µL** de chaque **Standard, Control** et les **échantillons**, avec de nouveaux cônes de pipette, dans les puits appropriés.
3. Incuber pendant **5 minutes** à température ambiante.
4. Déposer **100 µL d'Enzyme Conjugate** dans chaque puits.  
Bien mélanger pendant 10 secondes. Il est important d'obtenir un mélange parfait lors de cette étape.
5. Incuber pendant **60 minutes** à température ambiante.
6. Rincer les puits **5 fois** avec **400 µL** de l'eau distillée par puits, si un laveur de microplaques est utilisé.  
- OU -  
Décanter le contenu des puits.  
Rincer les puits **5 fois** avec **300 µL** de l'eau distillée par puits pour un lavage manuel.  
Tapoter les puits sur du papier absorbant afin d'éliminer les gouttelettes résiduelles.  
**Remarque importante:**  
La sensibilité et la précision de ce test sont fortement dépendantes de la bonne réalisation des étapes de lavage!
7. Ajouter **100 µL** de **Substrate Solution** à chaque puits.
8. Incuber pendant **20 minutes** à température ambiante.
9. Stopper la réaction enzymatique en ajoutant **100 µL** de **Stop Solution** à chaque puits.
10. Déterminer la densité optique (DO) de la solution dans chaque puits à **450 nm (lecture) et à 620 nm à 630 nm (soustraction de fond, recommandée)** à l'aide d'un spectrophotomètre lecteur de microplaques.  
Il est recommandé de lire les puits dans les **10 minutes** qui suivent l'ajout de la solution d'arrêt (*Stop Solution*).

## 6.3 Calcul des résultats

1. Calculer les valeurs moyennes des densités optiques (DO) pour chaque série de standards, contrôles et échantillons.
2. Etablir la courbe étalon en reportant la densité optique moyenne de chaque valeur standard en fonction de sa concentration, en posant la densité optique en axe des ordonnées et la concentration en axe des abscisses.
3. L'utilisation de la densité optique moyenne pour chaque échantillon détermine la concentration correspondante à partir de la courbe étalon.
4. Méthode automatique: Les résultats dans les instructions d'utilisation ont été calculés de façon automatique en utilisant une courbe de régression 4-Paramètres. (4-paramètres Rodbard ou 4-paramètres Marquardt sont les méthodes favorites.) D'autres fonctions logistiques peuvent donner des résultats légèrement différents.
5. La concentration des échantillons peut être lue directement à partir de cette courbe étalon. Les échantillons avec une concentration supérieure à celle du standard le plus concentré doivent être dilués de nouveau ou rapportés comme étant > 25,0 ng/mL. Pour le calcul des concentrations, ce facteur de dilution doit être pris en considération.

### 6.3.1 Exemple d'une courbe standard typique

Les résultats suivants sont ici présentés à titre d'exemple et **ne peuvent** être utilisés au moment de l'essai.

| Standard                | Densité optique (450 nm) |
|-------------------------|--------------------------|
| Zero Standard (0 ng/mL) | 0,05                     |
| Standard 1 (1,56 ng/mL) | 0,24                     |
| Standard 2 (3,12 ng/mL) | 0,39                     |
| Standard 3 (6,25 ng/mL) | 0,74                     |
| Standard 4 (12,5 ng/mL) | 1,27                     |
| Standard 5 (25,0 ng/mL) | 2,01                     |

## 7 VALEURS NORMALES ATTENDUES

Il est fortement recommandé à chaque laboratoire de déterminer ses propres valeurs normales et pathologiques.

Dans une étude menée sur des échantillons d'hommes, à l'aide du test PSA Total ELISA de DRG, les valeurs suivantes ont été observées :

| Population                  | n  | Valeur moyenne (ng/mL) | Médiane (ng/mL) | 2,5. - 97,5. Percentile (ng/mL) | Portée (min. - max.) (ng/mL) |
|-----------------------------|----|------------------------|-----------------|---------------------------------|------------------------------|
| Hommes sains                | 51 | 1,20                   | 0,86            | 0 – 4,85                        | 0 – 5,35                     |
| Hommes suspects (> 4 ng/mL) | 50 | 6,56                   | 5,51            | 2,93 – 14,82                    | 1,33 – 16,94                 |

Le seuil généralement recommandé pour l'examen de suivi est le suivant :

### Valeur seuil de PSA : 4,0 ng/mL

Chez les hommes en bonne santé, la concentration de PSA est généralement inférieure à 4,0 ng/mL.

Si la concentration de PSA est supérieure ou égale à 4,0 ng/mL, il est fortement recommandé de procéder à des examens de suivi.

Une telle concentration de PSA indique un risque élevé de cancer de la prostate, mais peut également être due à une hyperplasie bénigne de la prostate (HBP).

Veillez noter que le seuil de 4 ng/mL n'est qu'une valeur de référence recommandée.

La documentation spécialisée mentionne que des modifications en lien avec l'âge ou l'origine ethnique peuvent être utiles, par exemple, un seuil inférieur pour les hommes plus jeunes par rapport aux hommes plus âgés.

Il est important de rappeler que certaines tumeurs de la prostate n'entraînent pas de niveaux de PSA élevés. Les mesures de PSA ne doivent donc jamais remplacer un toucher rectal. Elles ne doivent être utilisées que conjointement avec un toucher rectal (TR).

Étant donné que des niveaux de PSA élevés peuvent également être dus à des maladies non cancéreuses, des examens de suivi peuvent renforcer la spécificité de diagnostic des valeurs totales de PSA.

La littérature spécialisée mentionne la densité de PSA, la vélocité de PSA et le taux de PSA libre par rapport au total de PSA (f PSA/t-PSA) afin d'améliorer la discrimination entre les maladies cancéreuses et non cancéreuses. Ces données peuvent être utilisées pour réduire le nombre de biopsies prostatiques inutiles.

Néanmoins, seule une biopsie prostatique peut attester de la présence ou de l'absence d'un carcinome de la prostate.

**Remarque: les valeurs de PSA ne doivent être utilisées qu'à des fins d'évaluation du risque de cancer.**

**Elles doivent toujours être interprétées conjointement avec d'autres résultats cliniques et ne doivent en aucun cas être utilisées seules pour le diagnostic du cancer de la prostate.**

Les résultats ne doivent pas être utilisés seuls pour déterminer les décisions thérapeutiques. Ils doivent être corrélés avec d'autres observations cliniques et tests diagnostiques.

## 8 CONTROLE DE QUALITE

Il est recommandé d'utiliser les échantillons contrôles selon les réglementations nationales en vigueur. L'utilisation des échantillons contrôles est recommandée afin de s'assurer jour après jour de la validité des résultats. Utiliser les contrôles de valeurs normales et pathologiques.

Les contrôles et les résultats correspondants issus du laboratoire QC sont mentionnés dans le certificat QC fourni avec le kit. Les valeurs et les limites mentionnées sur la fiche QC font toujours référence au lot de kit courant et doivent être utilisées pour une comparaison directe avec les résultats.

Il est également recommandé d'utiliser les programmes d'évaluation de qualité nationaux ou internationaux, afin de s'assurer de l'exactitude des résultats.

Utiliser les méthodes d'analyses statistiques appropriées pour l'analyse des valeurs contrôles et des tendances. Si les résultats ne correspondent pas aux limites établies des contrôles, les résultats concernant ces patients doivent être considérés comme non valides.

Dans ce cas, tester les zones techniques suivantes : mécanisme de pipettage et temps; spectrophotomètre, dates d'expiration des réactifs, conditions de stockage et d'incubation, méthodes d'aspiration et de lavage.

Après avoir tester les points mentionnés, si aucune erreur n'est détectée, contacter votre distributeur ou directement la DRG.



## 9 CARACTERISTIQUES DES PERFORMANCES

### 9.1 Zone de mesure

Les limites du dosage sont comprises entre 0,2 ng/mL - 25,0 ng/mL.

### 9.2 Spécificité des anticorps (réactivité croisée)

La réactivité croisée des substances suivantes a été mesurée dans le test. Aucune interférence avec le dosage n'a été observée pour:

| Substance    | Conc. ajoutée |
|--------------|---------------|
| AFP          | 10 µg/mL      |
| CEA          | 10 µg/mL      |
| HCG          | 10 µg/mL      |
| Lactalbumine | 10 µg/mL      |

Pour des **données supplémentaires**, consulter la version anglaise détaillée du mode d'emploi.

### 9.3 Sensibilité de l'analyse

La sensibilité de l'analyse a été calculée en ajoutant 2 écarts-types de la moyenne de l'analyse de 20 réplicats du *Zero Standard* et a été mesurée à 0,054 ng/mL.

La limite du blanc (LoB) est de 0,045 ng/mL.

La limite de détection (LoD) est de 0,216 ng/mL.

La limite de quantification (LoQ) est de 1,172 ng/mL.

Pour obtenir des données concernant

#### 9.4 Précision

#### 9.5 Récupération

#### 9.6 Linéarité

#### 9.7 Comparaison des méthodes

consulter la version anglaise détaillée du mode d'emploi.

## 10 LIMITES D'UTILISATION

Des résultats fiables et reproductibles seront obtenus lorsque la procédure de test est effectuée avec une compréhension complète de la notice et en respectant les bonnes pratiques de laboratoire.

Toute utilisation impropre des échantillons ou toute modification du test peut influencer les résultats.

### 10.1 Substances interférentes

L'hémoglobine (jusqu'à 0,1 mg/mL), la bilirubine (jusqu'à 0,2 mg/mL) et les triglycérides (jusqu'à 15 mg/mL) n'ont aucune influence sur les résultats du dosage.

### 10.2 Drogues interférentes

Les médicaments cytostatiques suivants ont également été testés. Aucune interférence avec le dosage n'a été observée pour:

| Médicament          | Concentration testée (µg/mL) |
|---------------------|------------------------------|
| Carboplatine        | 700,0                        |
| Cisplatine          | 200,0                        |
| Folinate de calcium | 2,3                          |
| Cyclophosphamide    | 1000,0                       |
| 5-Fluorouracile     | 500,0                        |
| Doxorubicine HCl    | 72,0                         |
| Dexaméthasone       | 11,0                         |
| Diéthylstilbestrol  | 2,0                          |
| Flutamide           | 10,0                         |
| Méthotrexate        | 50,0                         |

En outre, les médicaments suivants contre l'hypertension ont été testés. Aucune interférence avec le dosage n'a été observée pour :

| Médicament            | Concentration testée (µg/mL) |
|-----------------------|------------------------------|
| Simvastatine          | 0.1                          |
| Irbesartan            | 1.5                          |
| Citrate de Sildénafil | 5.0                          |
| Furosémide            | 200.0                        |

En outre, l'agent antimicrobien suivant a été testé.

| Composé                  | Concentration testée (%) |
|--------------------------|--------------------------|
| Chlorure de benzalkonium | 0.5                      |

L'agent antimicrobien Chlorure de benzalkonium (0,5 %) ne présente aucune interférence avec le test.

Pour des **données supplémentaires**, consulter la version anglaise détaillée du mode d'emploi.

Jusqu'à présent, aucune autre substance (médicament) n'a d'influence connue sur la mesure de PSA dans un échantillon.

### 10.3 Effet de Hook

Aucun effet de Hook n'a été observé pour ce test jusqu'à une concentration de 2000 ng/mL de PSA.

## 11 ASPECTS JURIDIQUES

### 11.1 Fiabilité des résultats

Ce test doit être exactement utilisé selon les instructions d'utilisation du fabricant. De plus, les utilisateurs doivent strictement respecter les règles de la bonne pratique de laboratoire, ou autres lois nationales. Cela est spécialement le cas pour l'utilisation des réactifs contrôles. Pour chaque test, il est important d'inclure un nombre suffisant de contrôles, afin de pouvoir valider l'exactitude et la précision du test.

Les résultats du test sont valides si et seulement si tous les contrôles sont compris dans les gammes de mesure mentionnées et si tous les autres paramètres du test sont également compris dans les instructions de ce test. En cas de doute ou d'inquiétude, contacter la DRG.

### 11.2 Conséquences thérapeutiques

Les suites thérapeutiques ne devront jamais être basées sur les résultats de laboratoire seuls, même si les tous les résultats du test sont en accord avec les points mentionnés dans le paragraphe 11.1. Tout résultat n'est qu'une partie du tableau clinique complet d'un patient.

Les suites thérapeutiques peuvent découler des résultats de laboratoire si et seulement si ceux-ci sont en accord avec l'ensemble du tableau clinique du patient.

Le résultat du test en lui-même ne doit en aucun cas être le seul déterminant des suites thérapeutiques à suivre.

### 11.3 Responsabilité

Toute modification du kit et / ou échange ou mélange d'un des composants de différents lots, d'un kit à un autre, pourrait affecter de façon négative les résultats attendus et la validité du test dans son ensemble. De telles modifications ou échanges invalident toute réclamation pour remplacement.













Toutes les réclamations soumises, relatives au paragraphe 11.2, et dues à une mauvaise interprétation des résultats de laboratoire de la part du client sont également invalides. Néanmoins, en cas de réclamation, la responsabilité du fabricant n'est pas de dépasser les limites de la valeur du kit. Tout dommage causé au kit lors de son transport n'est pas du ressort de la responsabilité du fabricant.

---

**12 REFERENCES / LITERATURE**

1. Milford Ward A. et al. Prostate specific antigen: biology, biochemistry and available commercial assays. *Ann Clin Biochem* (2001), 38: 633-651.
2. Balk SP, Ko YJ, and Bubley GJ. Biology of prostate-specific antigen. *J Clin Oncol* (2003) 21: 383–91.
3. Baumgart, Y et al. Characterization of novel monoclonal antibodies for prostate-specific antigen (PSA) with potency to recognize PSA bound to alpha 2-macroglobulin. (2005) *Clin Chem* 51: 84–92.
4. Prcic A, Begic E, and Hiros M. Actual Contribution of Free to Total PSA Ratio in Prostate Diseases Differentiation. *Med Arch* (2016) 70: 288-292.
5. Thompson IM et al. Prevalence of prostate cancer among men with a prostate-specific antigen level < or =4.0 ng per milliliter. *N Engl J Med* (2004) 350: 2239-2246.
6. Fritsche HA and Babaian RJ. Analytical performance goals for measuring prostate-specific antigen. *Clin Chem* (1993) 39: 1529-1529.
7. Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaft (AWMF): Leitlinien der Deutschen Urologen: PSA-Bestimmung in der Prostatakarzinomdiagnostik (2003).
8. Thomas L (2008) *Labor und Diagnose*, TH-Books Verlagsgesellschaft 1342-1351.
9. Price CP et al. Pre-and post-analytical factors that may influence use of serum prostate specific antigen and its isoforms in a screening program for prostate cancer. *Ann Clin Biochem* (2001), 38: 188-216.
10. Lange P et al. The value of serum prostate-specific antigen determinations before and after radical prostatectomy. *J Urol* (1989) 141: 873-9.
11. Akdas et al. The role of free prostate specific antigen in the diagnosis of prostate cancer. *British J Urol* (1997) 79: 920-923.
12. Schroeder FH et al. Prostate-cancer mortality at 11 years of follow-up. *N Engl J Med* (2012) 366: 981-990.
13. Moyer VA on behalf of the U.S. Preventive Services Task Force. Screening for prostate cancer: U.S. Preventive Services Task Force recommendation statement. *Annals of Internal Medicine* (2012) 157: 59-65.
14. Li B. Prostate Cancer Targeted Therapy. In: Schwab M. *Encyclopedia of Cancer*, 3rd edition. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, (2012) 3065.
15. Sturgeon CM. National Academy of Clinical Biochemistry. National Academy of Clinical Biochemistry laboratory medicine practice guidelines for use of tumor markers in testicular, prostate, colorectal, breast, and ovarian cancers. *Clin Chem* (2008) 54: 11–79.
16. Smith RA Cokkinides V and Eyre HJ. American Cancer Society Guidelines for the Early Detection of Cancer, 2006. *CA Cancer J Clin* (2006) 56: 11-25

## SYMBOLS USED

| Symbol  | English                                     | Deutsch                         | Italiano                                | Español                                      | Français                                  |
|---|---|---------------------------------|---|--|---|
|  | European Conformity                         | CE-Konformitäts-kennzeichnung   | Conformità europea                      | Conformidad europea                          | Conformité normes européennes             |
|  | Consult instructions for use *              | Gebrauchsanweisung beachten *   | Consultare le istruzioni per l'uso      | Consulte las instrucciones de uso            | Consulter les instructions d'utilisation  |
|  | <i>In vitro</i> diagnostic medical device * | <i>In-vitro</i> -Diagnostikum * | Dispositivo medico-diagnostico in vitro | Producto sanitario para diagnóstico in vitro | Dispositif médical de diagnostic in vitro |
|  | Catalogue number *                          | Artikelnummer *                 | No. di Cat.                             | No de catálogo                               | Référence                                 |
|  | Batch code *                                | Fertigungslosnummer, Charge *   | Lotto no                                | Número de lote                               | No. de lot                                |
|  | Contains sufficient for <n> tests *         | Ausreichend für <n> Prüfungen * | Contenuto sufficiente per "n" saggi     | Contenido suficiente para <n> ensayos        | Contenu suffisant pour "n" tests          |
|  | Temperature limit *                         | Temperaturbegrenzung *          | Temperatura di conservazione            | Temperatura de conservación                  | Température de conservation               |
|  | Use-by date *                               | Verwendbar bis *                | Data di scadenza                        | Fecha de caducidad                           | Date limite d'utilisation                 |
|  | Manufacturer *                              | Hersteller *                    | Fabbricante                             | Fabricante                                   | Fabricant                                 |
|  | Biological risks *                          | Biologische Risiken *           | Rischi biologici                        | Riesgos biológicos                           | Risques biologiques                       |
|  | Caution *                                   | Achtung *                       | Attenzione                              | Precaución                                   | Attention                                 |
|   |   |                                 |   |  |   |
|  | For research use only                       | Nur für Forschungszwecke        | Solo a scopo di ricerca                 | Sólo para uso en investigación               | Seulement dans le cadre de recherches     |
| <i>Distributed by</i>   | Distributed by                              | Vertreiber                      | Distributore                            | Distribuidor                                 | Distributeur                              |
| <i>Content</i>  | Content                                     | Inhalt                          | Contenuto                               | Contenido                                    | Conditionnement                           |
| <i>Volume/No.</i>   | Volume / No.                                | Volumen / Anzahl                | Volume / Quantità                       | Volumen / Número                             | Volume / Quantité                         |
|   |   |                                 |   |  |   |
| <i>Microtiterwells</i>  | Microtiterwells                             | Mikrotiterwells                 | Micropozzetti                           | Placas multipocillo                          | Microplaques                              |
| <i>Antiserum</i>  | Antiserum                                   | Antiserum                       | Antisiero                               | Antisuero                                    | Antisérum                                 |
| <i>Enzyme Conjugate</i>   | Enzyme Conjugate                            | Enzymkonjugat                   | Tracciante enzimatico                   | Conjugado enzimático                         | Conjugué enzymatique                      |
| <i>Enzyme Complex</i>   | Enzyme Complex                              | Enzymkomplex                    | Complesso enzimatico                    | Complejo enzimático                          | Complexe enzymatique                      |
| <i>Substrate Solution</i>   | Substrate Solution                          | Substratlösung                  | Soluzione di substrato                  | Solución de sustrato                         | Solution substrat                         |
| <i>Stop Solution</i>  | Stop Solution                               | Stopplösung                     | Soluzione d'arresto                     | Solución de parada                           | Solution d'arrêt                          |
| <i>Zero Standard</i>  | Zero Standard                               | Nullstandard                    | Standard zero                           | Estándar cero                                | Zero Standard                             |
| <i>Standard</i>   | Standard                                    | Standard                        | Standard                                | Estándar                                     | Standard                                  |
| <i>Control</i>  | Control                                     | Kontrolle                       | Controllo                               | Control                                      | Contrôle                                  |
| <i>Assay Buffer</i>   | Assay Buffer                                | Assaypuffer                     | Tampone del test                        | Tampón de ensayo                             | Tampon d'essai                            |
| <i>Wash Solution</i>  | Wash Solution                               | Waschlösung                     | Soluzione di lavaggio                   | Solución de lavado                           | Solution de lavage                        |
| <i>1N NaOH</i>  | 1N NaOH                                     | 1N NaOH                         | 1N NaOH (idrossido di sodio 1N)         | 1N NaOH                                      | 1N NaOH                                   |
| <i>1 N HCl</i>  | 1 N HCl                                     | 1 N HCl                         |   | 1 N HCl                                      | 1N HCl                                    |
| <i>Sample Diluent</i>   | Sample Diluent                              | Probenverdünnungs-medium        | Diluyente dei campioni                  | Solución para dilución de la muestra         | Solution pour dilution de l'échantillon   |
| <i>Conjugate Diluent</i>  | Conjugate Diluent                           | Konjugatverdünnungs-medium      | Diluyente del tracciante                | Solución para dilución del conjugado         | Solution pour dilution du conjugué        |