



# CanAg Free PSA EIA

Prod. No. 350-10

Istruzioni per l'uso

Dosaggio Immunoenzimometrico

2009-11

96 tests

## **FINALITA' DEL TEST**

Il kit CanAg Free PSA EIA è finalizzato alla determinazione quantitativa dell'antigene libero della prostata PSA ( Prostate Specific Antigen ) in siero umano.

## **INTRODUZIONE**

PSA è una glicoproteina serino proteasi di 32 kDa a catena singola con una specificità chimotripsino simile prodotta dall'epitelio secretorio della ghiandola prostatica (1). PSA viene normalmente secreta nel liquido seminale ed ha un ruolo funzionale nella disgregazione delle proteine nella vescicola seminale e nella liquefazione dei coaguli seminali (2). La concentrazione di PSA presente nel sangue è normalmente bassa per cui valori aumentati sono indice di patologia prostatica , inclusi l'iperplasia prostatica benigna ed il tumore della prostata. Il dosaggio di PSA è oggi ampiamente usato per la determinazione ed il trattamento di pazienti con tumore prostatico e viene considerato come il marcatore serologico più importante del tumore della prostata (3).

PSA forma complessi stabili con varie antiproteasi e la porzione preminente di PSA nel siero dei pazienti si trova in complessi con  $\alpha_1$ -antichimotripsina ( PSA-ATC) (4).

Vi sono comunque ampie variazioni nella relazione fra Free PSA ed il complesso PSA-ACT a seconda dei soggetti. Alcuni studi hanno provato che la porzione di Free PSA è più alta nelle patologia prostatiche benigne piuttosto che nel tumore prostatico (4, 5). Il kit CanAg Free PSA EIA è un dosaggio per la determinazione di Free PSA senza crossreattività con il complesso PSA-ACT (6).

## **PRINCIPIO DEL DOSAGGIO**

Il metodo immunoenzimatico utilizzato da CanAg Free PSA EIA è di tipo fase solida, sandwich diretto non competitivo. I calibratori, i controlli ed i campioni vengono incubati in pozzetti sensibilizzati con streptavidina unitamente ad anticorpi monoclonali anti-Free PSA biotilinati ed anticorpi anti-PSA marcati con perossidasi da rafano. Dopo il lavaggio il reagente tamponato Substrato/Cromogeno (perossido

d'idrogeno e 3, 3', 5, 5' tetrametilbenzidina) viene dispensato in tutti i pozzetti attivando in tal modo la reazione enzimatica. Durante la reazione enzimatica si sviluppa una colorazione blu nel caso l'antigene sia presente. L'intensità del colore sviluppato è proporzionale alla concentrazione di Free PSA presente nei campioni. L'intensità del colore viene misurata per mezzo di un lettore spettrofotometrico di micropiastre alla lunghezza d'onda di 450 nm. Le curve di calibrazione vengono estrapolate dai valori di assorbanza ottenuti alla concentrazione di ogni calibratore e su di esse viene misurata la concentrazione di Free PSA presente nei campioni.

## REATTIVI

- Ogni kit CanAg Free PSA EIA contiene reattivi sufficienti per eseguire 96 dosaggi
- La data di scadenza è specificata sull'etichetta posta sull'esterno della scatola del kit
- Non usare il prodotto oltre la data di scadenza
- Non mescolare reattivi provenienti da lotti diversi
- Conservare il kit a 2-8°C. Non congelare
- I reattivi una volta aperti sono stabili alle condizioni descritte nella tabella che segue a condizione che non siano contaminati, vengano conservati nei flaconi originali opportunamente chiusi e manipolati come prescritto. Riportare i reattivi a 2-8°C immediatamente dopo l'uso

Componenti	Quantità	Stabilità e conservazione dopo l'apertura
------------	----------	---

### MICROPLA

<b>Micropiastra sensibilizzata con Streptavidina</b>	1 piastra	2-8°C fino alla scadenza riportata sulla micropiastra
--	-----------	---

12x8 pozzetti a frattura prestabililita sensibilizzati con Streptavidina. Dopo l'apertura riporre immediatamente le strips non usate nella busta di alluminio contenente l'essiccatore. Richiudere attentamente in modo da conservare in ambiente asciutto.

<b>Free PSA Calibratori</b>	6 flaconi	2-8°C fino alla scadenza riportata sui flaconi
-----------------------------	-----------	--

<b>CAL</b>	<b>PSA</b>	<b>0</b>	0 µg/L	1 x 0.75 mL
------------	------------	----------	--------	-------------

<b>CAL</b>	<b>PSA</b>	<b>0.3</b>	0.3 µg/L	1 x 0.75 mL
------------	------------	------------	----------	-------------

<b>CAL</b>	<b>PSA</b>	<b>1</b>	1 µg/L	1 x 0.75 mL
------------	------------	----------	--------	-------------

<b>CAL</b>	<b>PSA</b>	<b>2</b>	2 µg/L	1 x 0.75 mL
------------	------------	----------	--------	-------------

Componenti	Quantità	Stabilità e conservazione dopo l'apertura
------------	----------	---

CAL	PSA	5
-----	-----	---

5 µg/L      1 x 0.75 mL

CAL	PSA	10
-----	-----	----

10 µg/L      1 x 0.75 mL

L'antigene di derivazione umana Free PSA è conservato in tampone Tri-HCl contenente sieralbumina bovina, un colorante giallo inerte e 0,01% di metil-isotiazolone (MIT) come conservante. Pronto all'uso.

**Free PSA Controlli**      2 flaconi      2-8°C fino alla scadenza riportata sui flaconi

CONTROL	FPSA	1
---------	------	---

1 x 0.75 mL

CONTROL	FPSA	2
---------	------	---

1 x 0.75 mL

L'antigene di derivazione umana Free PSA è conservato in soluzione salina tamponata con Tris-HCl contenente siero albumina bovina e 0,01% di metil-isotiazolone (MIT) come conservante. Pronto all'uso

BIOTIN	Anti-FPSA
--------	-----------

1 x 15 mL

2-8°C fino alla scadenza riportata sul flacone

Biotina Anti-Free PSA anticorpo monoclonale di origine murina, approssimativamente 1,5 µg/mL. Contiene soluzione salina tamponata con Tampone Fosfato (pH 7,2), sieralbumina bovina, immunoglobulina bovina, agenti bloccanti, Tween 20, un colorante blu inerte e 0,01% metil-isotiazolone (MIT) come conservante. Pronto all'uso.

CONJ	Anti-FPSA
------	-----------

**Tracciante, HRP Anti-Free PSA** 1 x 0.75 mL

2-8°C fino alla scadenza riportata sul flacone

Soluzione stock di HRP Anti-PSA anticorpo monoclonale di origine murina, approssimativamente 20 µg/mL. Contiene conservanti. Mescolare con Biotina Anti-Free PSA prima dell'uso.

SUBS	TMB
------	-----

**TMB HRP – Substrato**

1 x 12 mL

2-8°C fino alla scadenza riportata sul flacone

Contiene perossido d'idrogeno tamponato e 3, 3',5, 5' tetrametilbenzidina (TMB). Pronto all'uso

Componenti	Quantità	Stabilità e conservazione dopo l'apertura
------------	----------	---

**STOP**

<b>Reattivo Bloccante</b>	1 x 15 mL	2-8 °C fino alla scadenza Riportata sul flacone
---------------------------	-----------	--

Contiene 0,12 M HCl. Pronto all'uso.

**WASHBUF 25X**

<b>Tampone Lavaggio concentrato</b>	1 x 50 mL	2-8°C fino alla scadenza Riportata sul flacone
-------------------------------------	-----------	---

Soluzione salina tamponata con Tris-HCl e con Tween 20. Contiene Germall II come conservante. Diluire x25 con acqua distillata prima dell'uso.

#### Indicatori di instabilità

La soluzione TMB HRP –Substrato deve essere incolore o al massimo leggermente azzurra. Una intensa colorazione blu indica che il reattivo è stato contaminato e pertanto non deve essere usato.

#### AVVERTENZE E PRECAUZIONI

##### Per uso diagnostico in vitro

- Escusivamente per uso professionale
- Come riferimento si consiglia la pubblicazione n° (CDC) 88-8395 del US Department of Health and Human Service o qualsiasi altro regolamento locale o nazionale relativo alle norme di sicurezza da seguire nei Laboratori Diagnostici
- Manipolare i campioni dei pazienti come potenzialmente infetti
- Seguire la locale normativa in vigore relativa allo scarico dei reattivi

##### Avviso

Le materie prime usate nella preparazione dei reattivi di origine umana sono state analizzate e trovate Non Reattive per l'anticorpo anti - HIV 1/2 , per l'anticorpo anti-HCV e per l'antigene di superficie dell'Epatite B ( HBsAg). Tuttavia poichè nessun metodo diagnostico è in grado di escludere completamente la possibilità di trasmissione di infezioni attraverso il sangue si consiglia di maneggiare questi reattivi come potenzialmente infettivi.

## **PRELIEVO E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI**

Il kit CanAg Free PSA richiede l'uso di campioni di siero umano. Prelevare il sangue per via venosa seguendo la normale procedura. I campioni possono essere conservati a 2-8°C per 24 ore ed a -20°C per 12 mesi. Per periodi più lunghi conservare i campioni a -70°C od a temperature inferiori. I campioni non devono essere conservati in congelatori a scongelamento automatico. Scongelare i campioni lentamente preferibilmente a 2-8°C durante la notte e quindi portarli a temperatura ambiente prima del dosaggio. Livelli elevati di PSA libero sono attesi a seguito di manipolazioni della prostata. Si raccomanda pertanto di prelevare il sangue antecedentemente all'indagine digitale effettuata per via rettale. Dopo i trattamenti chirurgici della prostata come l'agobiopsia o la resezione transuretrale si raccomanda di aspettare almeno 6 settimane prima di prelevare il sangue per effettuare il dosaggio del PSA libero (7). Bisogna inoltre considerare che il trattamento di BPH con Finasteride provoca una diminuzione dei livelli del PSA libero (7).

## **PROCEDIMENTO OPERATIVO**

Materiali richiesti per il dosaggio ma non forniti con il kit

### **1. Agitatore di micropiastre**

L'agitazione va effettuata con modalità medio-vigorosa. L'agitazione longitudinale deve essere tarata sulle 200 rotazioni/min e 700-900 oscillazioni/min.

### **2. Lavatore di micropiastre**

Lavatore di micropiastre automatico in grado di effettuare da 1 a 6 cicli di lavaggio con un minimo volume di riempimento di 350 µL/pozzetto/ciclo di lavaggio. Si consiglia il lavatore di strip manuale Nunc Immuno 8 nel caso un lavatore di micropiastre automatico non sia disponibile.

### **3. Spettrofotometro per micropiastre**

Letture spettrofotometriche con lunghezza d'onda a 450nm ed un intervallo di assorbanza da 0 a 3.0.

### **4. Pipette di precisione**

Con puntali di plastica a gettare in grado di dispensare microlitri. Utili ma non indispensabili per dispensare 100µL sono le pipette ad 8 canali con puntali di plastica a gettare.

### **5. Acqua distillata o deionizzata**

Per la preparazione della Soluzione Lavaggio.

## **Note**

1. La comprensione globale di questo libretto d'istruzioni garantisce l'uso appropriato del kit CanAg Free PSA EIA. I reattivi forniti con il kit devono essere usati come un'unità integrale. Non mescolare reattivi di kits con differente numero di lotto. Non usare i reattivi dopo la data di scadenza indicata sull'esterno della scatola del kit.
2. Portare i reattivi a temperatura ambiente (20-25°C) prima dell'uso. Il dosaggio deve essere effettuato ad una temperatura compresa fra i 20-25°C per potere ottenere risultati accurati. I campioni congelati devono essere gentilmente ma accuratamente mescolati dopo lo scongelamento.

3. Prima di dispensare i calibratori ed i campioni è consigliabile segnare le strips in modo tale da poterle facilmente identificare durante e dopo il dosaggio.
4. Un lavaggio efficace per la separazione dei reagenti legati e non legati dal complesso antigene-anticorpo adsorbito in fase solida è uno dei requisiti più importanti in un test EIA. Per garantire un lavaggio efficiente, occorre accertare che: in ogni ciclo di lavaggio tutti i pozzetti siano completamente riempiti fino al bordo superiore dalla soluzione di lavaggio; la soluzione di lavaggio sia dispensata con un flusso appropriato; l'aspirazione del liquido nei pozzetti, tra e dopo ogni ciclo di lavaggio, sia completa e che i pozzetti siano perfettamente asciutti. Nel caso in cui rimanga del liquido residuo sul fondo dei pozzetti, capovolgere la micropiastra, premendola con cura contro della carta assorbente.
  - Lavaggio automatico: Seguire le istruzioni del produttore per una accurata pulizia e manutenzione ed effettuare il numero richiesto di cicli di lavaggio prima e dopo ogni incubazione. Si raccomanda vivamente di utilizzare la modalità di trattamento delle strip e la modalità di lavaggio overflow con un volume di dispensazione di 800 µL. Il sistema di lavaggio ed aspirazione non va lasciato per lunghi periodi a contatto della soluzione di lavaggio, altrimenti si rischia l'intasamento degli ugelli e quindi una dispensazione e un'aspirazione insufficienti
5. Il TMB HRP-Substrato è molto sensibile alla contaminazione. Per una stabilità ottimale del TMB HRP-Substrato versare la quantità necessaria dal flacone in un contenitore accuratamente pulito o preferibilmente in una vaschetta di plastica a gettare per evitare la contaminazione del reattivo. Assicurarci di usare pipette con puntali puliti di plastica a gettare.
6. Assicurarci di usare pipette con puntali puliti di plastica a gettare ed usare un appropriata tecnica di pipettamento manipolando campioni e reattivi. Evitare la contaminazione del reattivo tenendo il puntale della pipetta leggermente al disopra del bordo superiore del pozzetto ed evitando di toccare la plastica della strip o la superficie del liquido. Un appropriata tecnica di pipettamento è particolarmente importante quando si manipola il TMB HRP-Substrato.

---

#### **Preparazione dei reattivi**

#### **Stabilità dei reattivi ricostituiti**

##### **Soluzione Lavaggio**

2 settimane a 20-25°C  
in flacone sigillato

Versare 50 mL di Tampone Lavaggio concentrato in un recipiente pulito e diluire x25 aggiungendo 1200 mL di acqua distillata o deionizzata ottenendo in tal modo una soluzione lavaggio tamponata.

---

##### **Soluzione Anticorpi**

3 settimane a 2-8°C

Preparare la quantità necessaria di Soluzione Anticorpi mescolando 50 µL di Tracciante, HRP-Anti-Free PSA con 1 mL di Biotina Anti Free PSA per strip (vedere la tabella sottostante ed il Protocollo Analitico).

No. di strips	Tracciante, HRP Anti-Free PSA	Biotina Anti-Free PSA
Strips	( $\mu$ L)	(mL)
1	50	1
2	100	2
3	150	3
4	200	4
5	250	5
6	300	6
7	350	7
8	400	8
9	450	9
10	500	10
11	550	11
12	600	12

Assicurarsi di usare un contenitore di plastica pulita od un flacone di vetro per preparare la Soluzione Anticorpi.

**Alternativa** : versare il contenuto del tracciante, HRP Anti-Free PSA nel flacone di Biotina Anti-Free PSA e mescolare gentilmente. Assicurarsi che tutto il contenuto del Tracciante venga trasferito nel flacone di Biotina Anti-Free PSA.

**NOTA:** la Soluzione Anticorpi è stabile per 3 settimane a 2-8°C. Non preparare più Soluzione Anticorpi del necessario ed assicurarsi che venga conservata correttamente.

### PROCEDIMENTO ANALITICO

Eseguire in duplicato il dosaggio dei calibratori, dei controlli e dei campioni. Preparare una curva di calibrazione per ogni seduta analitica. Tutti i reattivi ed i campioni devono essere portati a temperatura ambiente (20-25°C) prima di eseguire il dosaggio.

1. Preparare prima la Soluzione Lavaggio e la Soluzione Anticorpi. E' importante usare dei contenitori puliti.
2. Trasferire il numero necessario di strips nell'apposito supporto ( riporre le restanti strips nella busta di alluminio contenente una sostanza disidratante e sigillare. Lavare ogni strip una volta con la Soluzione Lavaggio. Non lavare un numero maggiore di strips di quelle che possono essere usate entro 30 min.
3. Pipettare 50 $\mu$ L dei Calibratori Free PSA ( Cal 0, 0.3, 1, 2, 5, 10 ), dei Controlli (C) e dei campioni dei pazienti ( unknowns – Unk ) nei pozzetti seguendo lo schema seguente:

	1	2	3	4	5	6	7 etc
A	Cal 0	Cal 5	Unk1				
B	Cal 0	Cal 5	Unk1				
C	Cal 0.3	Cal 10	Unk2				
D	Cal 0.3	Cal 10	Etc.				
E	Cal 1	C1					
F	Cal 1	C1					
G	Cal 2	C2					
H	Cal 2	C2					

4. Aggiungere 100µL della Soluzione Anticorpi in ogni pozzetto usando una pipetta di precisione da 100µL (o una pipetta di precisione da 100µL ad 8 canali). Evitare la contaminazione mantenendo il puntale leggermente al disopra del bordo del pozzetto senza toccare la plastica o la superficie del liquido.
5. Incubare le strips per 1 ora ( $\pm$  10 min) a temperatura ambiente (20-25°C) agitando costantemente con un agitatore di micropiastre.
6. Lavare ogni strip 6 volte seguendo il procedimento di lavaggio descritto nella Nota Procedurale, punto 4.
7. Aggiungere 100µL di TMB HRP-Substrato in ogni pozzetto usando la stessa tecnica di pipettamento descritta al punto 4. Il TMB HRP-Substrato deve essere dispensato nei pozzetti il più in fretta possibile ed il tempo trascorso fra la dispensazione nel primo pozzetto e l'ultimo non deve superare i 5 min.
8. Incubare per 30 min ( $\pm$  5 min) a temperatura ambiente in costante agitazione. Evitare l'esposizione diretta alla luce.
9. Aggiungere 100µL di Reattivo Bloccante. Mescolare e leggere l'assorbanza a 450nm con un lettore di micropiastre entro 15 min dall'aggiunta del Reattivo Bloccante.

#### **Intervallo di misura**

Il kit CanAg Free PSA EIA misura concentrazioni tra 0.03 e 10 µL. Se si attendono concentrazioni di Free PSA superiori all'intervallo di misura si raccomanda di diluire i campioni con normale siero umano maschile prima di effettuare il dosaggio. **NOTA:** il siero usato per la diluizione deve essere a sua volta dosato per determinare la concentrazione di Free PSA endogeno (vedi "Calcolo dei risultati").

#### **Controllo di Qualità**

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

ripetuto. Ogni laboratorio ha inoltre la possibilità di preparare il proprio pool di sieri a differenti concentrazioni che può essere usato come controllo interno per garantire la precisione del dosaggio.

### Riferimenti

Il 1<sup>st</sup> International Standard 96/668 può essere usato come standard di riferimento.

I valori dei Free PSA Calibratori e Controlli vengono definiti sulla base di un set di standard di riferimento interno i cui valori sono rintracciabili nel 1<sup>st</sup> International Standard.

### CALCOLO DEI RISULTATI

Se viene usato uno spettrofotometro con procedimento di calcolo programmato consultarne il manuale e creare un programma usando le concentrazioni riportate sulle etichette di ogni calibratore Free - PSA

Per il calcolo automatico dei risultati di Free PSA si raccomanda di usare uno dei seguenti metodi:

- Metodo di fitting con curva spline cubica. Il calibratore 0 deve essere incluso nella curva con valore 0 µg/L.
- Metodo di fitting con curva spline linearizzata. Il calibratore 0 deve essere usato come bianco della micropiastra.
- Interpolazione con valutazione punto a punto. Il calibratore 0 deve essere incluso nella curva con valore 0 µg/L.
- Metodo di fitting con curva quadratica. Il calibratore 0 deve essere incluso nella curva con valore 0 µg/L.

**NOTA:** 4-si sconsiglia di usare metodi di valutazione parametrica o di regressione lineare.

Per la misurazione manuale la curva di calibrazione viene tracciata riportando su grafico lineare – lineare i valori di assorbanza (A) ottenuti per ogni calibratore Free PSA contro la corrispondente concentrazione di Free Psa espressa in µg/L ( vedi figura sottostante), Le concentrazioni ignote di Free PSA possono quindi essere estrapolate dalla curva di calibrazione usando il valore medio di assorbanza di ogni campione.

### Calcolo dei risultati con campioni diluiti

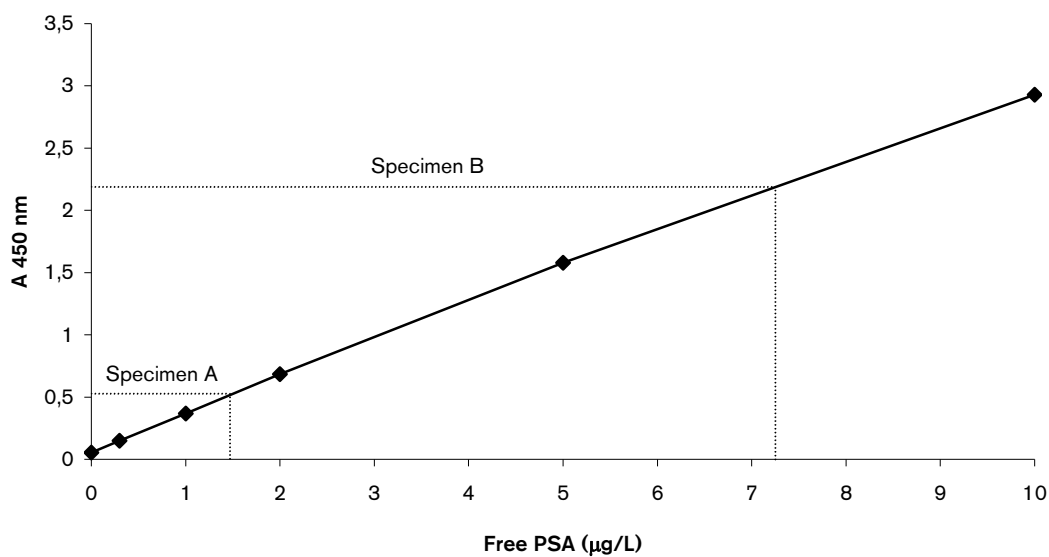
Se i campioni ad un primo dosaggio danno concentrazioni di Free PSA più alte di 10 µg/L i campioni devono essere diluiti 1/10 con siero umano maschile normale e rianalizzati per determinare correttamente la concentrazione di Free PSA endogeno. **NOTA:** il siero usato per la diluizione deve a sua volta essere dosato per determinare la concentrazione di Free PSA endogeno.

La concentrazione di Free PSA nei campioni diluiti viene pertanto calcolata come:

Diluizione 1/10 :  $10 \times ([ \text{Free PSA} ] \text{ campione diluito} - (0.9 \times [ \text{Free PSA} ] \text{ siro normali maschile}))$

### Esempio di risultati

Campioni	Conc dei calibratori ( $\mu\text{g/L}$ )	Valori medi (A)	Free PSA ( $\mu\text{g/L}$ )
CAL PSA 0	0 $\mu\text{g/L}$	0.054	
CAL PSA 0.3	0.3 $\mu\text{g/L}$	0.148	
CAL PSA 1	1 $\mu\text{g/L}$	0.369	
CAL PSA 2	2 $\mu\text{g/L}$	0.683	
CAL PSA 5	5 $\mu\text{g/L}$	1.580	
CAL PSA 10	10 $\mu\text{g/L}$	2.930	
Campione A		0.522	1.480
Campione B		2.181	7.147



**Esempio ( non usare questa curva o la tabella sottostante per determinare i risultati del dosaggio)**

## LI MITI DEL DOSAGGIO

La concentrazione di Free PSA non può essere interpretata come evidenza assoluta della presenza o della assenza di patologia tumorale. I risultati del dosaggio sono interpretabili solo unitamente ad altri sistemi di investigazione della diagnosi della malattia e della anamnesi del paziente. Il dosaggio di Free PSA non può sostituire metodi consolidati di valutazione clinica.

I calibratori del kit CanAg Free PSA EIA non devono essere usati per studi di recupero di Free PSA.

Per studi di recupero si raccomanda l'uso di campioni ad alta concentrazione di Free PSA.

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

## VALORI ATTESI

La misura di Free Psa può essere effettuata congiuntamente al dosaggio equimolare CanAg PSA EIA (340-10) di PSA totale per poter così ottenere il valore del rapporto Free PSA/Total PSA.

CanAg Free Psa EIA e CanAg PSA EIA sono stati dosati in 52 uomini con diagnosi di iperplasia prostatica benigna ( BPH ) e 77 uomini con diagnosi di tumore della prostata (Pca):

Diagnosi	n	Rapporto medio FPSA/TPSA	Min.	Max.	Rapporto medio FPSA/TPSA	Deviazione standard	95% intervallo di confidenza
BPH	52	0.18	0.04	0.42	0.19	0.08	0.17 – 0.21
Pca	77	0.09	0.02	0.53	0.12	0.09	0.10 – 0.14

La scelta del cut-off da usarsi nella pratica clinica dipende dall'applicazione clinica, laddove si desidera ottenere una sensibilità od una specificità ottimali. Sensibilità (% Pca correttamente determinati)

Specificità (% BPH correttamente determinati) a rapporti differenti FPSA/TPSA sono mostrati nella tabella sottostante:

FPSA/TPSA rapporto cut-off	Specificità clinica (% BPH > cut-off)			Sensibilità clinica (% PCa ≤ cut-off)		
	n	%	95% intervallo di confidenza	N	%	95% intervallo di confidenza
0.23	14(52)	27%	0.16 – 0.41	69(77)	90%	0.81 – 0.95
0.16	36(52)	69%	0.55 – 0.81	64(77)	83%	0.73 – 0.91
0.08	48(52)	92%	0.81 – 0.98	30(77)	39%	0.28 – 0.51

Si raccomanda che ogni laboratorio valuti la trasferibilità dei valori attesi sopra elencati ai propri pazienti ed alle caratteristiche del dosaggio (7).

## PRESTAZIONI METODOLOGICHE

### Precisione

La precisione totale è stata determinata in accordo a NCCLS normativa EP5-A (9) usando 4 concentrazioni di un pool di sieri umani congelati con aggiunta di Free PSA e 6 differenti combinazioni dei reattivi di CanAg Free PSA EIA. Ogni campione è stato pipettato a caso ( n = 2/ analisi) e dosato 2 volte al giorno per 20 giorni.

Campioni	Replicati	Media (µg/L)	Intra saggio SD (µg/L)	Intra saggio CV %	Interdies SD (µg/L)	Interdies CV %
Free PSA 1	80	0.38	0.01	1.9	0.01	3.0
Free PSA 2	80	1.44	0.02	1.6	0.04	2.6
Free PSA 3	80	3.46	0.05	1.6	0.08	2.3
Free PSA 4	80	6.91	0.09	1.3	0.12	1.8

### Limiti del dosaggio

Il limite del dosaggio di CanAg Free PSA EIA è < 0.03 µg/L definito come la concentrazione corrispondente alla media del valore di assorbanza del calibratore 0 più 2 deviazioni standard secondo la formula:

$$\frac{2 \times \text{SD CAL 0}}{\text{OD CAL 0.3} - \text{OD CAL 0}} \times 0.3 \mu\text{g/L}$$

### Recupero

Campioni di siero vengono preparati aggiungendo aliquote di campioni con elevate concentrazioni di Free PSA a campioni di siero maschile normale. Il recupero dell'antigene è stato ± 15% dei valori attesi.

**Nota:** gli studi di recupero non devono essere effettuati usando gli standards del kit.

### Effetto gancio

Nessun effetto gancio si è verificato in campioni fino a > 5000 µg/L.

### Linearità

Campioni da pazienti sono stati diluiti con siero umano normale maschile ed analizzati. I valori ottenuti erano entro ± 10% dei valori attesi.

### Specificità

Il kit CanAg Free PSA EIA si basa su 2 anticorpi monoclonali di origine murina, PSA30 e PSA66 diretti contro due distinti epitopi esposti in Free PSA. Questa combinazione di anticorpi garantisce un dosaggio specifico per Free PSA con cross-reattività verso il complesso PSA-ATC < 1% ( 7 ). Si è seguita la normativa EP7-P (9) del NCCLS per individuare potenziali sorgenti d'interferenza.

Le sostanze indicate in tabella sono state analizzate alle concentrazioni indicate e non hanno evidenziato interferenze nel dosaggio

	<b>Concentrazioni ad interferenza (± 10%) non significativa</b>
Lipemia (Intralipid®)	10 mg/mL
Bilirubina libera	0.4 mg/mL
Emoglobina	5 mg/mL

### **Confronto di metodiche**

Il kit CanAg Free PSA EIA ( Prot. No. 350-10) è stato confrontato con il kit two-step CanAg Free PSA EIA ( Prod. No. 330-10). 127 sieri umani maschili con valori da 0 a 9 µg/L sono stati dosati e l'analisi della regressione lineare dei risultati ottenuti è stata:

$$[\text{Free PSA}] \text{ prod.N}^\circ 350-10 = 1.02 \times [\text{Free PSA} \text{ prod.N}^\circ 330-10 - 0.06] \quad r = 0.99$$

### **AVVERTENZE**

I dati di funzionalità presentati sono stati ottenuti usando il procedimento analitico descritto in questo libretto d'istruzioni. Ogni variazione o modifica del procedimento analitico non indicato da Fujirebio Diagnostics può alterare i risultati. In questo caso Fujirebio Diagnostics non si assume alcuna delle responsabilità espresse, implicite o legali, inclusa la responsabilità implicita della commerciabilità e della proprietà d'uso.

## REFERENCES

1. Wang MC, Valenzuela LA, Murphy GP, Chu TM (1979). Purification of a human prostate specific antigen. *Invest Urol* 17: 159–163.
2. Lilja H. (1985). A kallikrein-like serine protease in prostatic fluid cleaves the predominant seminal vesicle protein. *J Clin Invest* 76: 1899–1903.
3. Haese A., Becker C., Diamandis E., and Lilja H., (2002) Adenocarcinoma of the Prostate In: “Tumor Markers. Physiology, Pathobiology, Technology, and Clinical applications”. Eds. Diamandis et al., AACCC Press, Washington, pp. 193-238.
4. Lilja H., Christensson A., Dahlén U., Matikainen M-T., Nilsson O., Pettersson K., Lövgren T. (1991). Prostate-specific antigen in serum occurs predominantly in complex with  $\alpha_1$ -antichymotrypsin. *Clin Chem* 37: 1618–1625.
5. Christensson A., Björk T., Nilsson O., Dahlén U., Matikainen M-T., Cockett ATK, Abrahamsson PA, Lilja H. (1993). Serum prostate specific antigen complexed to  $\alpha_1$ -antichymotrypsin as an indicator of prostate cancer. *J Urology* 150: 100–105.
6. Nilsson O., Peter A. Andersson I., Nilsson K., Grundström B., and Karlsson B. Antigenic determinants of prostatespecific antigen (PSA) and development of assays specific for different forms of PSA. *Br J Cancer* 75(6):789–797, 1997.
7. Price C. P., Allard J., Davies G., Dawnay A., J Duffy M., France M., Mandarino G., Milford Ward A., Patel B., Sibley P. and Sturgeon C. (2001) Pre-and post-analytical factors that may influence use of serum prostate specific antigen and its isoforms in a screening programme for prostate cancer. *Ann Clin Biochem*; 38: 188–216.
8. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices. Approved Guideline EP5-A (1999).
9. National Committee for Clinical Laboratory Standards, National Evaluation Protocols for Interference Testing, Evaluation protocol Number 7, Vol. 6, No 13, August (1986).



---

CanAg<sup>®</sup> è un marchio registrato di Fujirebio Diagnostics AB

Fujirebio Diagnostics AB  
Elof Lindälvs gata 13  
SE-414 55 Göteborg  
Sweden  
Phone + 46 31-85 70 30  
Fax + 46 31-85 70 40  
info@fdab.com  
www.fdab.com