

Product information

Information about other products is available at: www.demeditec.com



User's Manual

PSA total ELISA

Enzyme Immunoassay for the quantitative determination of total Prostate Specific Antigen (PSA) in human serum or plasma.



DE3719



96



DRG Instruments GmbH
Frauenbergstraße 18
35039 Marburg

Distributed by / Vertrieb durch:

Demeditec Diagnostics GmbH
Lise-Meitner-Strasse 2
24145 Kiel-Wellsee
Germany

**Please use only the valid version of the package insert provided with the kit.
Verwenden Sie nur die jeweils gültige, im Testkit enthaltene, Arbeitsanleitung.
Si prega di usare la versione valida dell'inserto del pacco a disposizione con il kit.
Por favor, se usa solo la version valida de la metodico técnico incluido aqui en el kit.**

Table of Contents / Inhaltsverzeichnis / Tabella die Contenuti / Tabla de Contenidos

1	INTENDED USE	3
2	INTRODUCTION.....	3
3	PRINCIPLE OF THE ASSAY	3
4	MATERIALS PROVIDED WITH THE KIT.....	4
5	MATERIAL REQUIRED BUT NOT PROVIDED	4
6	STORAGE AND STABILITY.....	4
7	PRECAUTIONS	5
8	GUIDELINE FOR SAMPLE COLLECTION; PREPARATION AND STORAGE.....	5
9	ASSAY PROCEDURE	6
10	QUALITY CONTROL	7
11	EXPECTED VALUES LIMITATIONS OF THE PROCEDURE	7
12	PERFORMANCE CHARACTERISTICS.....	8
13	LEGAL ASPECTS.....	10
14	SUGGESTED READING	10
1	VERWENDUNGSZWECK	11
2	EINFÜHRUNG	11
3	TESTPRINZIP.....	11
4	IM TEST KIT ENTHALTENE MATERIALIEN	12
5	BENÖTIGTE NICHT IM TESTUMFANG ENTHALTENE MATERIALIEN	12
6	LAGERUNG UND STABILITÄT.....	12
7	VORSICHTSMASSNAHMEN	13
8	ORIENTIERUNGSHILFE FÜR PROBENNAHME; AUFBEREITUNG UND LAGERUNG	14
9	TESTDURCHFÜHRUNG.....	15
10	QUALITÄTSKONTROLLE	16
11	ERWARTETE WERTE UND GRENZEN DER METHODE	16
12	LEISTUNGSMERKMALE	17
13	RECHTLICHE GRUNDLAGEN.....	19
14	EMPFOHLENE LITERATUR	19
	SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS	20

1 INTENDED USE

The DE3719 total PSA ELISA is used for the quantitative determination of total prostate specific antigen (t-PSA) in human serum or plasma samples. The determination of t-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.

2 INTRODUCTION

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

In 1979, Wang et al isolated a specific antigen for normal prostate tissue and called this protein PSA. As demonstrated by immunohistological studies, PSA is localized in the cytoplasm of prostate acinar cells, ductal epithelium and in the secretion on the ductal lumina, present in normal, benign hyperplastic and malignant prostate tissues as well metastatic prostate cancer and in seminal plasma. If the structural integrity of the prostate is disturbed and/or the gland size is increased, the amount of PSA in the blood plasma may become elevated. An elevation of PSA levels to values higher than 3-4 ng/ml has been reported for patients with either benign prostatic hypertrophy (BPH) or prostate carcinoma. At this threshold follow-up examinations that allow to differentiate between these two conditions are recommended.

The determination of PSA serum levels is not only important for the screening of patients for prostate cancer, but also for monitoring patients that have been treated for this disease. 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.

3 PRINCIPLE OF THE ASSAY

This assay is a solid phase enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) based on the sandwich principle.

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

4 MATERIALS PROVIDED WITH THE KIT

Each kit contains reagents sufficient for 96 determinations.

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, ready to use;
Concentrations: 1.56 – 3.12 – 6.25 – 12.5 – 25.0 ng/mL
The standards are calibrated against the WHO Standard 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 QC-Datasheet.
Contain non-mercury preservative.
5. **Enzyme Conjugate**, 1 vial, 12 mL, ready to use,
Anti-PSA antibody conjugated to 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 1 N acidic solution,
Avoid contact with the stop solution. It may cause skin irritations and burns.

5 MATERIAL REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- Precision micropipettes (volume: 25 µL and 100 µL) with disposable tips
- Distilled water
- ELISA photometer with 450 nm- and 630 nm-filters
- Timer with 60 min. range or higher
- Microplate washer (optional)
- Vortex or similar mixing tools
- Container for the proper handling of waste and samples after use

6 STORAGE AND STABILITY

- Store the kit and components at 2 °C to 8 °C
- Bring to room temperature (18 °C – 25 °C) at least 30 minutes before use. After use put back into the refrigerator. Avoid long time storage at room temperature.
- Do not use the kit or components after the expiry date. For expiry date of the original packed kit see kit label.
- Close the bottles immediately after use.
- Store the plate incl. desiccant in the provided zip-lock pouch. Modules that are not used should always be stored under this condition.
- Ensure that kit components do not freeze.

7 PRECAUTIONS

- ELISA kits are only for in vitro diagnostic use by professionals.
- Serum and plasma samples should be treated as potentially infectious materials. Wear gloves and proper laboratory attire when handling sample materials. Do not eat, drink or smoke in areas where specimen or kit reagents are handled. Do not pipette with the mouth. In case of skin contact, wash with a germicidal soap and copious amounts of water. Seek medical advice if indicated.
- The PSA standards and controls are of human origin. They have been tested and confirmed negative for HIV, HBsAg and HCV. However, all standards should be treated as potential biohazards.
- Due to the potentially infectious character of samples and kit components all materials that have come in contact with these materials should be sterilized and disposed of according to local regulations. This also includes the liquid waste.
- The assay reagents contain preservatives, TMB, H₂O₂ or acidic solution and may be harmful if ingested. A direct skin or mucosa contact should be avoided. In case of skin contact, wash thoroughly with water and seek medical attention if required.
- The stop solution contains acidic solution. Since the acidic solution used to terminate the color reaction is corrosive, the instrumentation employed to dispense it should be thoroughly cleaned after use.
- Do not interchange reagents from different LOT# or different suppliers.
- Avoid reagent or sample carry-over by using fresh tips for solutions and samples.
- Do not use test kit if zip lock pouch or bottles have been damaged.

8 GUIDELINE FOR SAMPLE COLLECTION; PREPARATION AND STORAGE

8.1 Sample collection

Blood samples are collected by veinpuncture. 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

- biking
- sexual intercourse (ejaculation)
- Manipulation of the prostate during medical examinations like DRE, transrectal prostatic ultrasound etc.
- Prostatitis
- Liver dysfunction

The following conditions may lead to a decrease of PSA levels

- Intake of 5-alpha-reductaseinhibitors, antiandrogens, or GnRH analoga

8.2 Sample preparation

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

8.3 Storage of samples

For the assay either fresh serum or plasma samples can be used.

If not used immediately they can be stored at 2-8°C for 1 week. In case of longer storage, freeze at -20°C. A repeated freezing and thawing of samples should be avoided.

Note

- Highly lipemic or hemolytic samples can give incorrect analytical results.
- Samples must be free of microbial contaminations.
- Samples containing high titers of rheumatoid factor and human anti-mouse antibodies (HAMA) could give erroneous results.

9 ASSAY PROCEDURE

Note: It is highly recommended to perform all measurements as duplicates. An independent standard curve should be made for each series of measurements. For best results it is important that the solutions are always added to the wells in the same order to minimize variations in incubation times.

1. Prior to use bring all reagents, standards, controls, and samples to room temperature (18 °C - 25 °C).
2. Check that all components are not expired and take care that bottles and plate (inclusive pouch) are not damaged.
3. Format the required microplate wells. Keep in mind that all measurements should be performed as duplicate. Document position of wells and respective samples, standards and controls to ensure later identification. Put any unused microwell modules back into the zip lock bag with the desiccant, seal bag and store at 2 °C - 8 °C.
4. Pipette 25 µL of standards, controls or samples into each well. Samples with an expected PSA value higher than 25 ng/mL should be diluted with the sample diluent.
5. Incubate 5 min at room temperature (18 °C - 25 °C)
6. Add 100 µL of PSA conjugate into each well
7. Mix by moving plate on the table (10sec)
8. Incubate 1 h at room temperature (18 °C - 25 °C)
9. Remove solution from the wells by aspirating the liquid or by decanting it. If decanting, tap plate on adsorbent paper to remove residual liquid.
10. For washing fill plate with distilled water and wait 15 sec before removing the distilled water; wash 5x to 6x. We recommend the following procedure: wash wells 6-times with 250 µL / well distilled water. Preferably use an automated washing procedure. If washing manually take care that the washing solution remains in each well for the same time. This is necessary to receive lowest possible CV-values.
11. Pipette 100 µL TMB-substrate solution into each well
12. Incubate 20 min at room temperature (18 °C - 25 °C)
13. Add 100 µL/well stop solution (same order as substrate solution)
14. Read absorbencies (OD) at 450 nm (blinking 630 nm)

9.1 Calculation of Results

1. Calculate the average absorbance values for each set of standards, controls and patient samples.
2. Using linear graph paper, construct a standard curve by plotting the mean absorbance obtained from each standard against its concentration with absorbance value on the vertical (Y) axis and concentration on the horizontal (X) axis.
3. Using the mean absorbance value for each sample determine the corresponding concentration from the standard curve.
4. Automated method: The results in the IFU have been calculated automatically using a 4 PL (4 Parameter Logistics) curve fit. 4 Parameter Logistics is the preferred method. Other data reduction functions may give slightly different results.
5. The concentration of the samples can be read directly from this 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.

9.1.1 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 Units (450 nm)
Zero Standard 0 (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

10 QUALITY CONTROL

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

11 EXPECTED VALUES LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

The generally recommended threshold for follow-up examinations is:

Cut-off value: 3.0-4.0ng PSA /mL

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

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

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

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

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

12 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

12.1 Detection limit

The limit of detection for this kit is 0.2 ng/mL

12.2 Precision

Intra- and inter-assay precisions were established by analysing three patient sera of different PSA concentrations. The results are shown in Tables 1 and 2.

Table 1. *Intra-assay precision*

Patients	Number of replicates	Mean ng/mL	SD ng/mL	CV %
1	24	12.52	0.65	6.0
2	24	3.44	0.13	3.9
3	32	0.83	0.07	8.8

Table 2. *Inter-assay precision*

Patients	Number of replicates	Mean ng/mL	SD ng/mL	CV %
1	4	12.28	0.82	6.7
2	4	3.33	0.266	7.98

12.3 Recovery

A known amount of PSA was added to three patient sera and the quantities recovered were measured. The results are shown in Table 3.

Table 3. *Recovery*

sample	Expected value (ng/mL)	Observed value (ng/mL)	Recovery %
1	6.30	6.40	102
2	4.67	4.56	98
3	10.10	10.91	108

12.4 Specificity

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

Table 4. Specificity

Antigens	Amount added	Cross reaction
Proteins		
AFP	10 µg/mL	No
CEA	10 µg/mL	No
HCG	10 µg/mL	No
Lactalbumin	10 µg/mL	No
PAP	1 µg/mL	No
Interfering substances		
Bilirubin	0.2 mg/mL	No
Hemoglobin*	0.1 mg/ml	No
Triglyceride	15 mg/mL	No
Chemotherapeutic Agents		
Cyclophosphamid	800 µg/mL	No
Doxorubicin * HCl	20 µg/mL	No
Diethylstilbestrol	2 µg/mL	No
Flutamide	10 µg/mL	No
Methotrexate	50 µg/mL	No

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

12.5 High dose hook effect

The assay was tested for a high dose hook effect. Up to a PSA concentration of 2000 ng/mL no hook effect was observed. Please note that if the OD is out of the standard range for highly concentrated samples, the sample must be diluted before the next measurement to obtain correct results.

12.6 Correlation

The DE3719 total PSA ELISA was compared with the Roche ElecSys total PSA:

$$Y = 0.9644 x + 0.0741$$

In a second study the DE3719 t-PSA ELISA was compared to another CE registered PSA ELISA:

$$Y = 1.001x, R^2 = 0.9704$$

12.7 Calibration

The DE3719 total PSA ELISA is calibrated against WHO Standard 96/670.

13 LEGAL ASPECTS

13.1 Reliability of Results

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

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

13.2 Therapeutic Consequences

Therapeutic consequences should never be based on laboratory results alone even if all test results are in agreement with the items as stated under point 14.1. Any laboratory result is only a part of the total clinical picture of a patient.

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

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

13.3 Liability

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

Claims submitted due to customer misinterpretation of laboratory results subject to point 14.2. are also invalid. Regardless, in the event of any claim, the manufacturer's liability is not to exceed the value of the test kit. Any damage caused to the test kit during transportation is not subject to the liability of the manufacturer.

14 SUGGESTED READING

1. Fritsche HA und RJ. Babalan Clin Chem (1993) Vol: 39: 1529-1529 Analytical performance goals for measuring prostate-specific antigen:
2. Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaft (AWMF): Leitlinien der Deutschen Urologen: PSA-Bestimmung in der Prostatakarzinomdiagnostik (2003) <http://www.uni-duesseldorf.de/WWW/AWMF/II/uro1-36v.htm> (Stand Juli 2003)
3. Hammerer P. and Huland H., Der Onkologe (1996), Vol 2: 218-223 Früherkennung des Prostatakarzinoms. Onkologe
4. Milford Ward A. et al., Ann Clin Biochem (2001), Vol 38: 633-651 Prostate specific antigen: biology, biochemistry and available commercial assays.
5. Price C. P. et al., Ann Clin Biochem (2001), Vol 38: 188-216 Pre-and post-analytical factors that may influence use of serum prostrate specific antigen and its isoforms in a screening programme for prostate cancer.
6. Lange P et al., J Urol (1989) Vol 141:873 The value of serum prostate-specific antigen determinations before and after radical prostatectomy,
7. Akdas et al. British J Uro (1997) Vol 79: 920-923 The role of free prostate specific antigen in the diagnosis of prostate cancer
8. Thomas L (2008) Labor und Diagnose, TH-Books Verlagsgesellschaft 1342-1351

1 VERWENDUNGSZWECK

Der DE3719 Gesamt PSA ELISA dient der quantitativen Bestimmung der gesamten immunologisch nachweisbaren Menge an Prostata-spezifischem Antigen (t-PSA) in humanem Serum- oder Plasmaproben.

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

2 EINFÜHRUNG

Prostatakrebs ist die bei Männern am häufigsten auftretende Krebsart und die zweithäufigste Todesursache bei Krebserkrankungen von Männern. Bis vor kurzem wurden überwiegend Digitale Rektale Untersuchungen (DRU) als diagnostische Methode zur Früherkennung von Prostatakrebs eingesetzt. In den letzten Jahren hat sich zunehmend die Bestimmung der PSA-Konzentration im Serum durchgesetzt; um die diagnostische Spezifität der DRU zu erhöhen. Obwohl PSA ein gewebespezifischer und kein tumorspezifischer Marker ist, hat es sich zu dem wichtigsten Marker für Prostatakarzinome entwickelt, da es eine bessere Spezifität als andere biochemische Markerproteine aufweist, die in diesem Zusammenhang getestet wurden (z.B. PAP, Gesamt Alkalische Phosphatase, Carcinoembryonic Antigen (CEA) u.a.).

Im Jahr 1979 isolierten Wang et al. ein spezifisches Antigen für normales Prostatagewebe und nannten dieses Protein PSA. In immunhistologischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass PSA im Zytoplasma der azinösen Zellen der Prostata, im Gängepithel und im Drüsengangsekret zu finden ist, sowie in gesundem nicht-malignem, hyperplastischem und malignem Prostatagewebe, im metastasierenden Prostatakarzinom und in der Seminalflüssigkeit. Bei Störung der strukturellen Integrität der Prostata und/oder Vergrößerung der Prostata kann die PSA-Konzentration im Blutplasma ansteigen. Eine Erhöhung auf Werte $< 3-4$ ng/ml wurde in Patienten gefunden, die entweder eine gutartige Prostatahypertrophie (BPH) oder ein Prostatakarzinom aufwiesen. Ab diesem Schwellenwert werden Nachfolgeuntersuchungen empfohlen, die es erlauben zwischen den beiden Krankheitsbildern zu differenzieren.

Die Bestimmung der PSA-Konzentration im Serum ist nicht nur hilfreich, um Patienten auf Prostatakrebs zu screenen sondern auch um die Effektivität einer Operation oder anderer Therapien zu untersuchen. Hier sind regelmäßige PSA-Untersuchungen ein wichtiges Hilfsmittel, um die akute Effektivität einer Operation oder anderer Maßnahmen zu überprüfen. Ein Anstieg der PSA-Konzentration in Patienten nach radikaler Prostatasektomie oder Radiotherapie ermöglichen die frühzeitige Entdeckung eines residualen oder rezidiven Prostatakarzinoms.

3 TESTPRINZIP

Bei der vorliegenden Untersuchung handelt es sich um einen Festphasen-Enzym-Immunoassay (ELISA) nach dem Sandwichprinzip. Die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen sind mit einem Antikörper beschichtet der auf ein Epitop eines Antigenmoleküls (PSA) ausgerichtet ist. Ein Aliquot des Patientenserums wird zusammen mit einem enzymmarkierten Sekundär-Antikörper (E-Ab), der gegen einen anderen Bereich des Antigenmoleküls gerichtet ist, in die Vertiefung gegeben. Nach der Inkubation wird der ungebundene E-Ab ausgewaschen. Die Menge des gebundenen E-Ab ist proportional zur Konzentration der in der Probe befindlichen Antigenmenge. Nach dem Hinzufügen der Substratlösung ist die gemessene Farbintensität proportional zur Konzentration der in der Probe befindlichen Antigenmenge. Aus den gemessenen Extinktionswerten (OD) der Standards wird eine Eichkurve erstellt, auf Grundlage derer die unbekanntes Proben berechnet werden.

4 IM TEST KIT ENTHALTENE MATERIALIEN

Jeder Kit enthält ausreichend Reagenzien zur Durchführung von 96 Bestimmungen.

1. **Microtiterwells**, 96 Wells, 12 x 8 Wells (einzeln brechbar);
Mit anti-PSA-Antikörper (monoklonal) beschichtet.
2. **Zero Standard**, 1 Fläschchen, 10,0 mL, gebrauchsfertig.
(Probenverdünnungsmittel)
Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.
3. **Standard (Standard 1-5)**, 5 Fläschchen, 0,5 mL, gebrauchsfertig;
Konzentrationen: 1,56 – 3,12 – 6,25 – 12,5 – 25,0 ng/mL
Die Standards sind kalibriert gegen den WHO Standard 96/670 (NIBSC);
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 QC-Datenblatt.
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 1 N saure Lösung
Kontakt mit der Stopplösung vermeiden! Kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen.

5 BENÖTIGTE NICHT IM TESTUMFANG ENTHALTENE MATERIALIEN

- Präzisionsmikropipetten (Volumen: 25 µL und 100 µL) mit Einwegspitzen
- Destilliertes Wasser
- ELISA-Photometer für Mikrotiterplatten mit 450 nm und 630 nm Filtern
- Zeitmesser bis 60 min. oder mehr
- Waschgerät für Mikrotiterplatten (optional)
- Vortex-Mixer oder vergleichbare Mixgeräte
- Gefäß für die ordnungsgemäße Entsorgung von Abfall und Proben nach Gebrauch

6 LAGERUNG UND STABILITÄT

- Lagern Sie den Kit und die Einzelkomponenten bei 2 °C bis 8 °C.
- Bringen Sie den Kit mindestens 30 Minuten vor Gebrauch auf Raumtemperatur. Nach der Benutzung müssen die verbliebenen Bestandteile wieder im Kühlschrank gelagert werden. Eine längerfristige Lagerung bei Raumtemperatur sollte vermieden werden.
- Nach Ablauf des Verfallsdatums dürfen der Kit bzw., die einzelnen Bestandteile nicht länger verwendet werden. Das Verfallsdatum kann den entsprechenden kennzeichnenden Aufklebern entnommen werden,
- Nach der Benutzung müssen die Fläschchen sofort wieder gut verschlossen werden.
- Die ELISA Platte muss zusammen mit dem Trockenmittel in dem beigefügten Zip-Lock-Beutel aufbewahrt werden. Bitte stellen Sie sicher, dass die Testkomponenten nicht einfrieren,

7 VORSICHTSMASSNAHMEN

- Die ELISA Kits sind nur für in vitro diagnostische Anwendung durch professionelles Personal ausgelegt.
- Serum- und Plasmaproben sollten als potentiell infektiös angesehen werden. Tragen Sie Handschuhe und Laborschutzbekleidung beim Umgang mit Probenmaterial. Essen, Trinken und Rauchen sind in Bereichen, in denen Probenmaterial verarbeitet wird, untersagt. Pipettieren Sie Lösungen niemals mit dem Mund. Im Falle eines Hautkontakts waschen Sie den betroffenen Bereich mit bakterizider Seife und reichlich Wasser. Suchen Sie, falls erforderlich einen Arzt auf.
- Die PSA Standards und die Kontrolle sind humanen Ursprungs. In einer Bestätigungsanalyse konnte gezeigt werden, dass die Tests frei von nachweisbaren Konzentrationen an HIV, HBsAG und HCV sind. Bitte betrachten Sie die Standards dennoch als potentiell biogefährdend.
- Wegen des potentiell infektiösen Charakters der Proben und der Kit Bestandteile sollten alle damit in Kontakt gekommenen Materialien vor der Entsorgung sterilisiert werden. Die Entsorgung sollte im Einklang mit nationalen Vorschriften erfolgen Dies umfasst auch den anfallenden Flüssigabfall.
- Die Reagenzien des ELISA Kits enthalten Konservierungsmittel, TMB oder saure Lösung. Deswegen ist die Einnahme der Lösungen gefährlich. Im Falle eines Haut- oder Schleimhautkontakts bitte mit reichlich Wasser abwaschen. Suchen Sie im Falle eines Unwohlseins einen Arzt auf.
- Die Stopplösung enthält saure Lösung. Da die zum Abbruch der Farbreaktion notwendige saure Lösung korrosiv ist, sollten alle für ihre Beigabe verwendeten Instrumente gründlich gereinigt werden.
- Reagenzien unterschiedlicher LOT# oder unterschiedlicher Lieferanten dürfen nicht ausgetauscht werden
- Verschleppung von Reagenzien oder Probenmaterial sollte durch den Gebrauch frischer Spitzen für jede Lösung oder Probe vermieden werden,.
- Falls der ZipLock-Beutel, in dem die Platte gelagert wird, beschädigt ist, darf der Test nicht weiter verwendet werden.

8 ORIENTIERUNGSHILFE FÜR PROBENNAHME; AUFBEREITUNG UND LAGERUNG

8.1 Probengewinnung

Die Blutprobe wird aus der Vene entnommen. 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:

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

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

- Einnahme von 5-alpha-Reductaseinhibitoren, Antiandrogenen oder GnRH Analoga

8.2 Probenaufbereitung

Serum oder Plasmaproben werden gemäß Standardtechniken gewonnen. Die Abtrennung von Serum oder Plasma sollte so rasch wie möglich erfolgen um eine Hämolyse zu vermeiden und um die Stabilität von PSA im Probenmaterial zu erhöhen.

8.3 Probenlagerung

Für den Test sind frische Serum- oder Plasmaproben geeignet. Wenn sie nicht sofort benötigt werden, können die Proben für eine Woche zwischen 2 °C - 8 °C gelagert werden. Sollen die Proben länger aufbewahrt werden, müssen sie bei -20 °C eingefroren werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen von Probenmaterial sollte vermieden werden.

Hinweise

- Stark hämolytische oder lipämische Proben können fehlerhafte Analyseergebnisse verursachen.
- Die Proben müssen frei von mikrobiellen Kontaminationen sein.
- Proben mit hohem Rheumafaktor und humanen Antimaus-Antikörpern (HAMA) können zu falschen Ergebnissen führen.

9 TESTDURCHFÜHRUNG

Hinweis: Es wird dringlich empfohlen alle Messungen als Doppelbestimmung durchzuführen. Für jede Messreihe muss eine unabhängige Standardkurve erhoben werden. Beste Ergebnisse werden erhalten, wenn alle Lösungen jeweils in der gleichen Reihenfolge in die Näpfcchen gegeben werden, so dass Variationen in den Inkubationszeiten minimiert werden.

1. Vor der Durchführung müssen alle Reagenzien, Standards, Kontrollen und Proben auf Raumtemperatur gebracht werden (18 °C - 25 °C).
2. Überprüfen Sie, dass das Haltbarkeitsdatum der einzelnen Komponenten nicht abgelaufen ist. Stellen Sie sicher, dass die Fläschchen und die ELISA-Platte (inklusive des Schutzbeutels) keine Schäden aufweisen.
3. Formatieren Sie die erforderlichen Mikrotiterplatten Näpfcchen. Beachten Sie dabei, dass alle Messungen als Doppelbestimmung durchgeführt werden sollten. Dokumentieren Sie die Positionen der Näpfcchen für die jeweiligen Proben, die Standards und die Kontrolle. Um eine spätere Zuordnung der Messwerte zu gewährleisten. Geben Sie nicht benötigte Module zusammen mit dem Trockenmittel zurück in den Schutzbeutel, versiegeln Sie den Beutel und lagern Sie ihn bei 2 °C - 8 °C.
4. Pipettieren Sie je 25 µL der Standards, Kontrollen oder Proben in jedes Näpfcchen. Erwarten Sie PSA-Konzentrationen oberhalb von 25 ng/ml, sollten die Proben mit dem Verdünnungspuffer verdünnt werden.
5. 5 Minuten bei Raumtemperatur (18 °C - 25 °C) inkubieren
6. Geben Sie 100 µL Konjugat in jedes Näpfcchen. und mischen Sie, indem Sie die Platte für 10 sec auf dem Tisch hin- und herbewegen.
7. Mischen Sie, indem Sie die Platte für 10 sec auf dem Tisch hin- und herbewegen.
8. Inkubieren Sie den Test für 1 h bei Raumtemperatur (18 °C - 25 °C)
9. Entfernen Sie die Lösung aus den Näpfcchen, indem Sie sie absaugen oder abgießen. Im Falle eines Abgießens, sollte die Platte über saugfähigem Papier ausgeklopft werden, um Flüssigkeitsrückstände vollständig zu entfernen.
10. Um die ELISA-Platte zu waschen, füllen Sie die Platte mit destilliertem Wasser. Warten Sie 15 Sekunden und entfernen Sie dann das Wasser. Waschen Sie insgesamt 5- bis 6-mal.
Wir empfehlen die folgende Methode: Jedes Näpfcchen wird 6x mit 250µl destilliertem Wasser/Napf gespült. Wenn möglich sollte der Waschvorgang automatisiert erfolgen. Wird der Waschvorgang manuell durchgeführt, sollte sicher gestellt werden, dass die Verweildauer der Waschlösung für jedes Näpfcchen vergleichbar ist. Auf diese Weise erhält man möglichst geringe CV-Werte.
11. Pipettieren Sie 100 µL TMB-Substrat Lösung in jedes Näpfcchen
12. Inkubieren Sie die Platte 20 Minuten bei Raumtemperatur (18 °C - 25 °C)
13. Geben Sie 100 µL Stopplösung pro Napf zu (in der gleichen Reihenfolge wie die Substratlösung)
14. Messen Sie die Extinktionswerte (OD) bei 450 nm (Blanking 630 nm)

9.1 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 Arbeitsanleitung ermittelten Werte wurden automatisch mit Hilfe der 4 Parameter Gleichung (4PL, 4 Parameter Logistics, 4 Parameter Rodbard) bestimmt. 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.

9.1.1 Beispiel für eine Standardkurve

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

Standard	Optische Dichte (450 nm)
Zero Standard 0 (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

10 QUALITÄTSKONTROLLE

- Bei jedem Assay wird empfohlen, interne Kontrollen (Doppelbestimmung) mitzuführen. Die Kontrollergebnisse sollten sich innerhalb der festgelegten Bereiche befinden und sollten bevorzugt niedrige, mittlere und hohen Konzentrationen repräsentieren.
- Ein Risiko für den Patienten entsteht überwiegend durch falsch negative Ergebnisse in der Nähe des Schwellenwerts (cut-off) für PSA < 4,0 ng/ml. Es wird empfohlen den Test und das Labor durch externe Versuche zu validieren (z.B. Ringversuche der DGKC).

11 ERWARTETE WERTE UND GRENZEN DER METHODE

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

Cut-off value: 3,0-4,0 ng PSA /mL

In 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 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. Wenn möglich sollte jedes Labor eigene spezifische Werte etablieren, die der jeweiligen Population in der Nähe des Labors Rechnung tragen.

Bitte beachten Sie, dass einige Prostatatumoren keine sichtbar erhöhten PSA-Spiegel verursachen. PSA Messungen sollten deshalb die 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 t-PSA Messung zu erhöhen. In der Literatur werden die PSA Dichte, der PSA Anstieg innerhalb eines Zeitraums sowie das Verhältnis von f-PSA zu 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.

12 LEISTUNGSMERKMALE

12.1 Nachweisgrenze

Die Nachweisgrenze des PSA ELISAs ist 0,2 ng/mL

12.2 Präzision

Die Intra-Assay- und Inter-Assay-Präzision wurde anhand der Analyse von drei Patientenseren mit unterschiedlicher PSA-Konzentration untersucht. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 1 und 2 dargestellt.

Tabelle 1. *Intra-Assay Präzision*

Patienten	Anzahl der Wiederholungen	Mittelwert ng/mL	Standardabweichung ng/mL	VK %
1	24	12,52	0,65	6,0
2	24	3,44	0,13	3,9
3	32	0,83	0,07	8,8

Tabelle 2. *Inter-Assay Präzision*

Patienten	Anzahl der Wiederholungen	Mittelwert ng/mL	Standardabweichung ng/mL	VK %
1	4	12,28	0,82	6,7
2	4	3,33	0,266	7,98

12.3 Wiederfindung

Eine bekannte Menge an PSA wurde zu drei Patientenproben gegeben. Anschließend wurde die wiedergefundene Menge gemessen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Table 3. *Wiederfindung (Recovery)*

Probe	Erwarteter Wert (ng/mL)	Ermittelter Wert (ng/mL)	Wiederfindung %
1	6,30	6,40	102
2	4,67	4,56	98
3	10,10	10,91	108

12.4 Spezifität

Der Assay ist hochspezifisch für total PSA (free PSA & PSA-ACT-complex) und weist eine relativ geringe Kreuzreaktivität zu anderen Proteinen und Polypeptiden, Lipiden oder chemotherapeutischen Wirkstoffen auf, die in Patientenproben vorliegen können.

Table 4) Spezifität

Antigene	Zugefügte Menge	Kreuzreaktivität
Proteine		
AFP	10 µg/ml	Nein
CEA	10 µg/ml	Nein
HCG	10 µg/ml	Nein
Lactalbumin	10 µg/ml	Nein
PAP	1 µg/ml	Nein
Interferierende Substanzen		
Bilirubin	0,2 mg/ml	Nein
Hämoglobin*	0,1 mg/ml	Nein
Triglycerid	15 mg/ml	Nein
Chemotherapeutische Wirkstoffe		Nein
Cyclophosphamid	800 µg/ml	Nein
Doxorubicin * HCl	20 µg/ml	Nein
Diethylstilbestrol	2 µg/ml	Nein
Flutamid	10 µg/ml	Nein
Methotrexat	50 µg/ml	Nein

* höhere Konzentrationen von Hämoglobin können zu erhöhten OD Werten führen. Hämolytische Proben sollten deswegen vermieden werden.

12.5 High Dose Hook Effekt

Der Assay wurde auf das Vorliegen eines High-Dose-Hook-Effekts untersucht.

Bis zu einer PSA-Konzentration von 2000 ng/ml wurde kein High-Dose-Hook-Effekt beobachtet.

Bitte beachten Sie, dass hochkonzentrierte Proben mit OD-Werten außerhalb der Standardreihe vor der nächsten Bestimmung verdünnt werden müssen

12.6 Korrelation

Der DE3719 Gesamt PSA ELISA-Test wurde mit dem Roche ElecSys Gesamt PSA-Test verglichen:

$$Y = 0.9644 x + 0.0741:$$

In einer zweiten Studie wurde der DE3719 Gesamt PSA ELISA mit einem zweiten Referenz PSA ELISA verglichen:

$$Y = 1.001x, R^2 = 0.9704$$

12.7 Kalibrierung

Der DE3719 total PSA ELISA wird gegen WHO Standard 96/670 kalibriert.

13 RECHTLICHE GRUNDLAGEN

13.1 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 DEMEDITEC in Verbindung.

13.2 Therapeutische Konsequenzen

Therapeutische Konsequenzen sollten keinesfalls nur aufgrund von Laborergebnissen erfolgen, selbst dann nicht, wenn alle Testergebnisse mit den in 14.1. 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.

13.3 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 14.2. 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.

14 EMPFOHLENE LITERATUR

1. Fritsche HA und RJ. Babalan Clin Chem (1993) Vol: 39: 1529-1529 Analytical performance goals for measuring prostate-specific antigen:
2. Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaft (AWMF): Leitlinien der Deutschen Urologen: PSA-Bestimmung in der Prostatakarzinomdiagnostik (2003) <http://www.uni-duesseldorf.de/WWW/AWMF/II/uro1-36v.htm> (Stand Juli 2003)
3. Hammerer P. and Huland H., Der Onkologe (1996), Vol 2: 218-223 Früherkennung des Prostatakarzinoms. Onkologe
4. Milford Ward A. et al., Ann Clin Biochem (2001), Vol 38: 633-651 Prostate specific antigen: biology, biochemistry and available commercial assays.
5. Price C. P. et al., Ann Clin Biochem (2001), Vol 38: 188-216 Pre-and post-analytical factors that may influence use of serum prostrate specific antigen and its isoforms in a screening programme for prostate cancer.
6. Lange P et al., J Urol (1989) Vol 141:873 The value of serum prostate-specific antigen determinations before and after radical prostatectomy,
7. Akdas et al. British J Uro (1997) Vol 79: 920-923 The role of free prostate specific antigen in the diagnosis of prostate cancer
8. Thomas L (2008) Labor und Diagnose, TH-Books Verlagsgesellschaft 1342-1351

SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS

Symbol	English	Deutsch	Français	Español	Italiano
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consulter les instructions d'utilisation	Consulte las instrucciones de uso	Consultare le istruzioni per l'uso
	European Conformity	CE-Konformitätskennzeichnung	Conformité aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	Usage Diagnostic in vitro	Para uso Diagnóstico in vitro	Per uso Diagnostica in vitro
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Seulement dans le cadre de recherches	Sólo para uso en investigación	Solo a scopo di ricerca
	Catalogue number	Katalog-Nr.	Numéro de catalogue	Número de catálogo	Numero di Catalogo
	Lot. No. / Batch code	Chargen-Nr.	Numéro de lot	Número de lote	Numero di lotto
	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Température de conservation	Temperatura de conservación	Temperatura di conservazione
	Expiration Date	Mindesthaltbarkeitsdatum	Date limite d'utilisation	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Legal Manufacturer	Hersteller	Fabricant	Fabricante	Fabbricante
Distributed by	Distributor	Vertreiber	Distributeur	Distribuidor	Distributore
Content	Content	Inhalt	Conditionnement	Contenido	Contenuto
Volume/No.	Volume / No.	Volumen/Anzahl	Volume/Quantité	Volumen/Número	Volume/Quantità