

## SERATEC<sup>®</sup> PSA SEMIQUANT

Art.-Nr. PSM400F

### Diagnostico in vitro ad uso professionale per la dimostrazione di presenza di liquido seminale con la registrazione semiquantitativa del PSA (antigene prostata-specifico)

#### Impiego

Il test PSA SEMIQUANT della SERATEC<sup>®</sup> serve alla rapida identificazione di PSA nel liquido seminale. L'analisi avviene otticamente con la comparsa di una banda risultata da campioni positivi al PSA. L'intensità della banda, se necessario, può venire confrontata con una banda standard interna la cui colorazione corrisponde a una concentrazione di 4 ng/mL PSA.

#### Retroscena

Il PSA (antigene prostata-specifico) è una glicoproteina che viene sintetizzata nella prostata e che da lì viene secreta nel liquido seminale. Lì serve alla sua fluidificazione raggiungendo concentrazioni da 0,2 a 3 mg/mL. L'elevatezza dei valori e il fatto che il PSA nel secreto vaginale sia presente solo in quantità trascurabili (0,4-0,9 ng/mL o 0,0-1,25 ng/mL)<sup>2,3</sup> fanno del PSA un marker interessante nell'attività giudiziaria (delitti a sfondo sessuale) per dimostrare la presenza anche trascurabile di liquido seminale. I vantaggi della documentazione di PSA sono:

- La documentazione di sperma può venire effettuata anche nei casi in cui non sono state trovate cellule seminali (per es. nel caso di uomini che hanno fatto effettuare la vasectomia).
- Anche quantità molto trascurabili di sperma possono venire identificate. Studi di MACALUSO et al. (1999) mostrano che già una quantità di soli 10 µl di sperma può fare aumentare di circa 200 volte la concentrazione di PSA nel secreto vaginale.
- Il PSA mostra una buona stabilità. Negli strisci vaginali si lascia documentare<sup>5</sup> fino a 14-47 ore dopo il coito. Anche macchie di sperma vecchie di 30 anni presentano concentrazioni documentabili di PSA.
- Il marker del PSA supera nella specificità quella del test della fosfatasi acida.

La qualità del test viene limitata dal fatto che altri tessuti liquidi corporei come sangue e urina possono contenere PSA. Mentre la concentrazione di PSA nel siero sanguigno maschile generalmente è basso (< 4 ng/mL) e raggiunge i valori della prostata fino a 200 ng/mL solo in caso di malattia il valore di PSA nell'urina di uomini sani può arrivare almeno a 800 ng/mL (valore stimato).<sup>4</sup> In caso di dubbio una differenziazione della concentrazione di PSA fra liquido seminale e urina è possibile. Il livello di fluidificazione più alto dell'urina che viene riportato in letteratura e che ha portato a un risultato di test positivo, è indicato con 1:200. Campioni di sperma invece hanno di regola mostrato anche con una fluidificazione di 1:200.000 un risultato di test positivo, cioè con una fluidificazione 1000 volte superiore.<sup>4</sup> Svariate analisi mostrano che trascurabili percentuali di PSA sono documentabili già in giovani di 11 anni.<sup>4</sup>

Altri tessuti liquidi che possono contenere PSA sono elencati sotto la referenza # 6. Le concentrazioni di PSA negli altri tessuti liquidi sono così ridotte che a estrazione o fluidificazione avvenuta, non influenzano con molta probabilità il risultato del test.

#### Descrizione del prodotto

Il test SERATEC<sup>®</sup> PSA SEMIQUANT venne sviluppato in origine per dimostrare la presenza di PSA nel siero sanguigno per il riconoscimento precoce del cancro alla prostata e viene per questo usato come test semiquantitativo. Per documentare la presenza di liquido seminale viene impiegato come test qualitativo, tuttavia in caso di necessità, confrontando con uno standard interno, una stima approssimativa può venire fatta.

#### Principio del test

Il test SERATEC<sup>®</sup> PSA SEMIQUANT è un test cromografico immunotecnico (Chromatographic Immunoassay, CIA) per la documentazione rapida semiquantitativa di PSA nei tessuti corporei liquidi. Come elementi attivi, contiene due anticorpi topo monoclonali anti-PSA. Sulla membrana, nella regione dei risultati, è applicato uno degli anticorpi. La regione al di sopra e la regione degli standard interni (in mezzo) contiene anticorpi di capra-antitopo. La quantità della regione standard interna è stata scelta in modo tale che la colorazione della banda corrisponde all'intensità della banda dei risultati con una concentrazione di 4 ng/mL di PSA.

Un cuscino in fibra vetrosa giacente davanti alla membrana, serve alla campionatura e convoglia il fluido a una pellicola con un secondo anticorpo monoclonale (topo) mobile secco contro il PSA che è marcato con particelle colloidali in oro e che eventualmente lega il PSA disponibile presente nel campione. Indipendentemente dal contenuto in PSA nel campione, l'anticorpo topo marcato in oro forma con gli anticorpi antitopo della regione di controllo e del complesso interno degli standard un complesso. Ciò viene confermato con lo sviluppo di due bande colorate visibili nella parte superiore della finestra di controllo. Queste bande indicano della corretta esecuzione del test.

Nel caso di un campione PSA positivo, il complesso degli anticorpi PSA-anti-PSA marcato in oro lega agli anticorpi fissati monoclonali topo-anti-PSA nella regione dei risultati che riconosce, un altro epitopo del PSA. In questo caso si sviluppa un'altra banda colorata, così che il test con campioni **PSA-positivi**, mostra in totale tre bande. L'intensità della colorazione della banda mediana (standard interno) corrisponde a una concentrazione di PSA di 4 ng/mL che può venire utilizzata per la stima di quantità.

#### Materiali

**Contenuto del test:** 40 kit da test, ognuno con una pipetta in plastica, istruzioni per l'uso e 50 mL tampone di estrazione.

**Accessori:** cronometro o contaminuti

#### CONSERVAZIONE E SCADENZA

Il test può venire conservato fino alla scadenza indicata refrigerato da +4 a +8 °C o a temperatura ambiente (non oltre 30 °C) senza venire aperto.

#### CARATTERISTICHE QUALITATIVE

##### Sensibilità

Il range registrabile del test è situato tra 2 ng/mL di PSA e 100 µg/mL di PSA (valori minimi). Tenere conto che spesso anche campioni con basso contenuto di PSA (fino a circa 0,5 ng/ml) vengono rilevati dal test e possono causare bande di controllo scarsamente riconoscibili. Con concentrazioni di 500 µg/mL superiori dall'indebolimento della banda di risultato del test è chiaramente riconoscibile l'effetto Prozone (effetto High Dose Hook).

##### Materiale di riferimento

Per controllare l'efficienza del test nel controllo di qualità conclusivo è d'aiuto la WHO Standard: Prostate Specific Antigen (90:10), First International Standard, NIBSC Code 96/670.

##### Funzioni

Per l'identificazione di 2 ng/mL di PSA (indicato dalla comparsa della banda di risultato) il test SERATEC<sup>®</sup> PSA SEMIQUANT dispone delle seguenti funzioni:

sensibilità diagnostica:	100 %
specificità diagnostica:	100 %
valore previsione positiva:	100 %
valore previsione negativa:	100 %
riproducibilità:	100 %

Per la distinzione di campi di concentrazione di < per es. ≥ 4ng/mL di PSA nel siero del sangue, come è necessario per la diagnostica tumorale, in due studi clinici indipendenti tra loro sono state determinate le seguenti funzioni (valori medi):

sensibilità diagnostica:	90,0 %
specificità diagnostica:	88,7 %
valore previsione positiva:	83,3 %
valore previsione negativa:	96,5 %
riproducibilità:	90,2 %

## Specificità

Il test non indica una reazione crociata con altre proteine del liquido seminale. Nell'immunoblot con i liquidi seminali si evidenzia con gli anticorpi solo una banda reattiva della grandezza del PSA. Una reazione crociata con il liquido seminale di altri mammiferi (cane, gatto, cavallo, maiale, manzo) non è stata rilevata ad eccezione dei primati. Il test non mostra alcuna reazione crociata con altre proteine da siero umano. Il sangue femminile, il cui contenuto di PSA è inferiore al limite di rilevabilità, non ha mostrato alcuna reattività.

## ESECUZIONE DEL TEST

### Indicazioni di sicurezza

I campioni di sperma sono costituiti da materiale potenzialmente infettivo e devono venire trattati con adeguata prudenza e solo con le misure di sicurezza appropriate (per es. guanti e abiti da laboratorio). Durante il test, prima di gettare il materiale usato, sterilizzarlo in autoclave poiché contiene materiale potenzialmente infettivo.

- Destinato a uso unico IN VITRO.
- Non usare il test dopo la data di scadenza o se l'involucro è danneggiato.
- I materiali usati per il test sono potenzialmente infettivi (per es. anticorpi), ma utilizzati in modo appropriato, non causano alcun pericolo.
- Estrarre dall'involucro protettivo il kit per il test solo prima dell'uso.

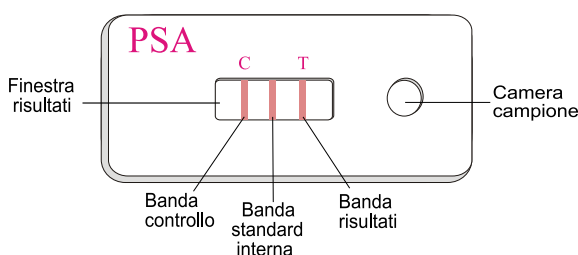
### Preparazione del campione

A causa del contenuto estremamente alto di PSA si consiglia di diluire il liquido seminale almeno di 1:500 con la soluzione tampone fornita (se si desidera usare la propria soluzione tampone, consigliamo la seguente composizione: 1 M TRIS pH=8,2). Materiali macchiati di liquido seminale possono, se necessario, per l'estrazione del PSA, venire mescolati e estratti per 2 ore o diluiti con la soluzione tampone fornita. Dopo una centrifugazione di tre minuti usare il surnatante come prova.<sup>1</sup> Il valore pH della prova deve trovarsi, a causa della soluzione tampone in zona neutrale, valori di pH inferiori a due possono dare valori erroneamente positivi o sbagliati. Non sono state rilevate delle interferenze per particelle di tessuti nei campioni.

### Attenzione!

- I campioni non devono essere troppo viscosi (trasporto difettoso a causa di forze capillari)
- Prima dell'inizio del test i campioni devono essere a temperatura ambiente

## Esecuzione del test



- Inserire 5 gocce del campione (circa 200 µl) con la pipetta fornita nella cavità tonda (camera del campione). Iniziare il cronometraggio. Conservare i resti della soluzione per effettuare, se necessario, ulteriori analisi su diversi livelli di diluizione.
- Dopo 10 minuti di incubazione a temperatura ambiente il risultato può venire letto. Il liquido nella camera di prova, dopo questo arco di tempo, dovrebbe essere stato aspirato completamente. Se si vuole effettuare una stima della quantità, rispettare assolutamente questo arco di tempo, poiché può avvenire uno spostamento nell'intensità dei colori tra standard interno e banda dei risultati.

### Interpretazione dei risultati

Nella finestra dei risultati compaiono con 2 campioni PSA-negativi, con 3 campioni PSA-positivi bande di controllo :

**Banda di controllo (T):** rispecchia la concentrazione di PSA del campione, visibile solo con campioni PSA-positivi

**Standard interno:** l'intensità di colorazione della banda di controllo corrisponde a una concentrazione PSA di ≈ 4 ng PSA/ml

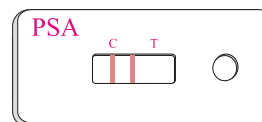
**Banda di controllo (C):** controllo di un possibile errore di utilizzo e dell'integrità degli elementi del test

## Interpretazione dei risultati

**Risultato negativo:** (nessun PSA disponibile o concentrazione di PSA inferiore al limite di rilevabilità)

La banda di risultato (T) non è riconoscibile. La comparsa della banda interna-standard e della banda di controllo (C) confermano la corretta esecuzione del test.

In questo caso è molto probabile escludere che il campione contenga liquido seminale.

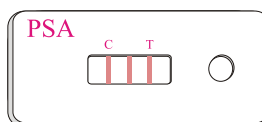


### Osservazione:

assicurarsi che la solubilità del campione si trovi in un campo misurabile. Concentrazioni di PSA troppo esigue (per es. per estrazione insufficiente) o troppo alta (per esempio a causa di una diluizione insufficiente; ≥500 µg/mL PSA sfociano in un effetto High Dose Hook) interferiscono con lo sviluppo di una banda di risultati.

### Risultato positivo (PSA disponibile)

Banda di risultato di test (T), banda interna-standard e banda di controllo (C) vengono formate. In questo caso si può con grande probabilità ritenere che il campione contiene liquido seminale.

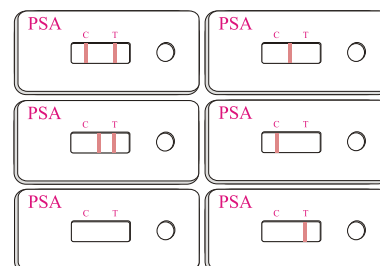


### Osservazione:

Anche altri liquidi di tessuti corporei possono contenere PSA anche se in concentrazioni minori. Se dovesse sussistere la possibilità di uno scambio, si può provare a ottenere un risultato chiaro testando livelli più alti di diluizione.

### Risultato non valido

La banda interna standard e/o la banda di controllo (C) non si formano. In questo caso il test deve venire ripetuto con un nuovo kit PSA.



### Osservazione:

Se il campione contiene molto PSA, la banda di controllo può essere sviluppata in modo molto debole.

## Letteratura

<sup>1</sup>Hochmeister et al. (1999) Evaluation of Prostrate- Specific Antigen (PSA) Membrane Test Assays for the Forensic Identification of Seminal Fluid: J Forensic Sci Vol 44: 1057-1060.

<sup>2</sup>Lawson et al. (1998) Objective markers of condom failure. Sex Transm Dis 25: 427-423.

<sup>3</sup>Macaluso et al. (1999) Prostrate-specific antigen in vaginal fluid as a biologic marker of condom failure. Contraception 59: 195-201.

<sup>4</sup>Sato et al. (2002) Use of the „SMITEST“ PSA card to identify the presence of prostrate –specific antigen in semen and male urine. Forensic Sci Int 127: 71-74.

<sup>5</sup> Hochmeister et al. (1997) Evaluation of Prostrate-Specific Antigen (PSA) Membrane Tests for the Forensic Identification of Semen. 8<sup>th</sup> International Symposium on Human Identification. [www.promega.com/geneticidproc/ussymp8proc/33.html](http://www.promega.com/geneticidproc/ussymp8proc/33.html)

<sup>6</sup>Laux et al., Forensic Detection of Semen III. Detection of PSA Using Membrane Based Tests: Sensitivity Issues with Regards to the presence of PSA in other Body Fluids. <http://mafs.net/pdf/forensicedetectionsemen3.pdf>

<sup>7</sup>Laux et al., Forensic Detection of Semen II. Comparison of the Abacus Diagnostics OneStep ABA card p30 Test and the Seratec<sup>®</sup> PSA Semiquant Kit for the Determination of the Presence of Semen in Forensic Cases. <http://mafs.net/pdf/laux2.pdf>

<sup>8</sup>Gartside et al., Estimation of Prostate-Specific Antigen (PSA) Extraction Efficiency from Forensic Samples Using the Seratec<sup>®</sup> PSA Semiquant Semiquantitative Membrane Test. Forensic Science Communications 2003 April; 5 (2). <http://www.fbi.gov/hq/lab/fsc/backissu/april2003/gartside.htm>