

RESUMEN Y APLICACIÓN

El Antígeno Prostático Específico (PSA) es una glicoproteína de cadena simple, sintetizada por las células epiteliales de la próstata que, en el suero humano, se encuentra predominantemente unida a la alfa 1-antitripsina (PSA-ACT) y alfa 2-macroglobulina (PSAAMG). También pueden encontrarse trazas de alfa 1-antitripsina e inhibidor de tripsina inter-alfa unido a PSA. El PSA restante se encuentra en forma libre (f-PSA). Los métodos actuales de detección de cáncer de próstata utilizan la detección de la principal forma de PSA-ACT. Los niveles de 4,0 ng/ml o superiores son fuertes indicadores de la posibilidad de cáncer prostático. Sin embargo, niveles séricos de PSA elevado también se han atribuido a hiperplasia benigna de próstata y a prostatitis, que conducen a un gran porcentaje de detección de falsos positivos. Una potencial solución a este problema consiste en la determinación de niveles de PSA libre. Estudios preliminares han sugerido que el porcentaje de PSA libre es menor en pacientes con cáncer de próstata que en aquellos con hiperplasia prostática benigna, por lo tanto, la medición de PSA libre de suero en conjunción con PSA total, puede mejorar la especificidad en la detección del cáncer de próstata en los hombres seleccionados con niveles de PSA sérico elevado, lo cual posteriormente reduciría las biopsias prostáticas innecesarias, con efectos mínimos en las tasas de detección del cáncer.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

La Prueba PSA ELISA está basada en el principio de un ensayo inmunoabsorbente vinculado a las enzimas de fase sólida. El sistema de ensayo utiliza un anticuerpo anti-PSA de ratón dirigido hacia el PSA intacto para la inmovilización de la fase sólida (en los pozos de micro valoración). Un anticuerpo anti-PSA monoclonal conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) se encuentra en la solución del conjugado de enzima-anticuerpo. La muestra de la prueba reacciona primero con el anticuerpo de conejo inmovilizado a temperatura ambiente por 60 minutos. Los pozos son lavados para remover cualquier antígeno no adherido. El conjugado HRP anti-PSA monoclonal es entonces agregado con el antígeno inmovilizado por 60 minutos a temperatura ambiente provocando que las moléculas de PSA se encuentren entre la fase sólida y los anticuerpos vinculados a la enzima. Los pozos son lavados con agua para remover anticuerpos etiquetados no adheridos. Una solución de Reactivo TMB es agregada e incubada a temperatura ambiente por 15 minutos, provocando el desarrollo de un color azul. El desarrollo del color es frenado con la adición de HCl 3N, cambiando el color a amarillo. La concentración de PSA es directamente proporcional a la intensidad del color de la muestra de prueba. La absorbancia es medida espectrofotométricamente a 450nm.

REACTIVOS Y MATERIAL SUMINISTRADO

1. Micropozos recubiertos con MAb PSA	12x8x1
2. Estándares de PSA: 6 viales (listos para uso)	0.5 ml
3. Enzima conjugada PSA: 1 frasco (listo para su uso)	12 ml
4. Sustrato TMB : 1 frasco (listo para su uso)	12 ml
5. Solución de Paro : 1 frasco (listo para su uso)	12 ml
6. Buffer de Lavado Concentrado (20X)	25 ml

MATERIALES REQUERIDOS PERO NO PROVISTOS

1. Agua destilada o desionizada.
2. Pipetas de precisión.
3. Puntas de pipetas desechables.
4. Lector Microelisas con lente a 450nm de longitud de onda con una banda de amplitud de 10nm o menor y un rango de densidad óptica de 0-2 OD o mayor.
5. Papel absorbente o toalla de papel.
6. Papel cuadrículado.

ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

1. Almacene el kit a 2 - 8°C.
2. Mantenga las tiras de los pocillos selladas en la bolsa de aluminio.
3. Todos los compuestos son estables hasta su fecha de expiración siempre y cuando las condiciones de almacenaje sean estrictamente llevadas a cabo como aquí se indica.
4. No exponga los reactivos al calor, luz solar o intensa luz eléctrica.

CUIDADOS Y PRECAUCIONES

1. Potencial de los materiales de riesgo biológico: Los calibradores contienen componentes de origen humano, que se han sido probados y encontrados no reactivos para el antígeno de superficie de hepatitis B y anticuerpos contra el VIH Aprobado por la FDA. Sin embargo no hay método de prueba que puede ofrecer completa seguridad de que el virus VIH, Hepatitis B u otros agentes infecciosos estén presentes. Estos reactivos deben ser manejados según el Nivel de Bioseguridad 2, como se recomienda en los Centros para el Control de Enfermedades / Institutos Nacionales de Salud manuales. "Bioseguridad en laboratorios microbiológicos y biomédicos" 1984.
2. No pipetee con la boca. No fume, coma, o beba en el área donde maneje este equipo.
3. Los componentes en este equipo son para uso como una unidad integral. Los componentes de diferentes lotes no se deben mezclar.
4. Es recomendable que los estándares, controles y muestras de suero se corran por duplicado.
5. Para obtener óptimos resultados, debe apegarse estrictamente al protocolo. Pipeteado exacto y preciso, así como después de la hora exacta y requerimientos de temperatura prescritos son esenciales. Cualquier desviación de este puede resultar en datos no válidos.

RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA

1. Recolecte sangre por venopunción y separe el suero de inmediato.
2. En caso de no llevar a cabo el examen inmediatamente, refrigere la muestra a (2-8° C) por cinco días. En caso de exceder dicho plazo, congele a -20° C hasta un mes.
3. Evite múltiples ciclos de congelamiento-descongelamientos de la muestra.
4. Previo al ensayo, la muestra deberá ser debidamente descongelada y mezclada.
5. Evite utilizar muestras con exceso de lípidos.

PREPARACION DEL REACTIVO

1. Todos los reactivos deberán ser traídos a la temperatura ambiente (18°-25°C) antes de su uso.
2. Preparar solución de lavado a 1x adicionando 475ml de agua destilada o desionizada al frasco de (25ml a 20x).

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

1. Asegure el número deseado.
2. Vierta 25 µl de estándares, especímenes, y controles en los pozos apropiados.
3. Vierta 100 µl de Enzima conjugada en cada micropozo.
4. Mezcle perfectamente por 30 segundos.
5. Cubra e Incube a temperatura ambiente (18°-26° C) por 60 minutos.
6. Retire la mezcla de incubación y lave en tres tiempos con 300 µl de solución de lavado (1X). Golpetee los pozos sobre el papel absorbente o toallas de papel para remover todas las gotas residuales.
7. Vierta 100 µl de Sustrato TMB en cada pozo. Mezcle suavemente por 5 segundos.
8. Incube a temperatura ambiente (18°-26°) por 15 minutos. .
9. Agrega 50 µl de solución Stop a cada pozo. Mezcle suavemente
10. Utilizando un lector de placa de micro valoración, lea la densidad óptica a 450nm dentro de un plazo de 15 minutos.

EL PUNTO DE LAVADO DE MICROPOZOS ES CRITICO YA QUE UN POBRE LAVADO DARA COMO RESULTADO IMPRECISION Ó LECTURA ELEVADA FALSA DE LA PRUEBA.

Nota:

1. Se recomienda no correr más de 32 Micro pozos en cada ensayo. Si se pipetea de manera manual, se recomienda no prolongar este proceso más allá de 3 minutos.
2. Se recomienda –mas no se requiere- la duplicación de todos los estándares y especímenes.

CALCULO DE RESULTADOS

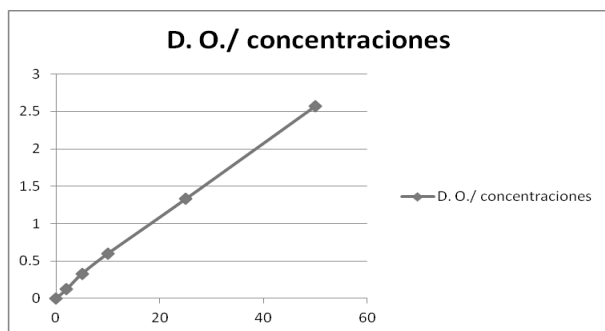
1. Calcule los valores de absorbancia promedio (A450) para cada juego de estándares de referencia, control, y muestras.
2. Elabore una curva estándar al trazar la absorbancia media obtenida para cada estándar de referencia comparada con su concentración en ng/ml sobre el papel cuadrícula, con valores de absorbancia sobre el eje Y o vertical y la concentración sobre el eje X u horizontal.
3. Utilizando el valor de absorbancia media para cada muestra, determine la concentración correspondiente de PSA en ng/ml desde la curva estándar.

EJEMPLO DE CURVAS ESTANDAR

Resultados de una corrida estándar típica con lecturas de densidad óptica a 450nm mostradas en el eje Y contra las concentraciones de prolactina mostradas en el eje X. Esta curva estándar es con el propósito de ilustrar solamente, y no debe ser utilizada para hacer cálculos desconocidos.

Cada usuario debe obtener sus propios datos y curva estándar.

PSA (ng/ml)	0	2	5	10	25	50
ABS (450 nm)	.001	0.12	0.33	0.60	1.33	2.57



VALORES ESPERADOS Y SENSIBILIDAD

Se espera de los hombres saludables que tengan valores de PSA debajo de 4ng/ml. La concentración mínima detectable de PSA en este ensayo se calcula que deba ser 0.032ng/ml.

REFERENCIAS

1. Christensson A, Bjork T, Nilsson O, et al. Serum Prostate Specific Antigen Complexed to α 1-Antichymotrypsin As An Indicator of Prostate Cancer. J. of Urol. 150:100-105; 1993.
2. Lilja H, Christensson A, Dahlen U, et al. Prostate-specific antigen in serum occurs predominantly in complex with α 1- antichymotrypsin. Clin Chem 37:1618-1625, 1991.
3. Stenman U-H, Leinonen J, Alfthan H, Rannikko S, Tuhkanen K, Alfthan O. A complex between prostate-specific antigen and α 1- antichymotrypsin is the major form of prostate-specific antigen in serum of patients with prostate cancer: assay of the complex improves clinical sensitivity for cancer. Cancer Res. 51:222-226, 1991.
4. Catalona WJ, Smith DS, Ratliff TL, Basler JW. Detection of organ-confined prostate cancer is increased through prostate-specific antigen-based screening. JAMA. 270:948-954, 1993.
5. Stamey TA, Yang N Hay AR, McNeal JE, Freiha, FS, Redwine E. Prostate-specific antigen as a serum marker for adenocarcinoma of the prostate. N Engl J Med. 317:- 909-916, 1987.
6. Junker R, Brandt B, Zechel C, and Assmann, G. Comparison of Prostate-specific antigen (PSA) measured by four combinations of free-PSA and total
7. Luderer AA, Chen Y-T, Soriano TF, et al. Measurements of the proportion of free to total prostate-specific antigen improves diagnostic performance of prostate-specific antigen in the diagnostic gray zone of total prostate-specific antigen. Urology 46:187- 194, 1995.
8. Carter HB, Pearson JD, Metter J, et al. Longitudinal evaluation of prostate-specific antigen levels in men with and without prostate disease. JAMA. 267:2215-2220, 1992.