

INDICACIONES DE USO

Ensayo inmunoabsorbente para la detección cuantitativa del antígeno libre de la próstata en suero humano o plasma.

Agente de diagnóstico in vitro, para uso exclusivo de laboratorio clínico o de gabinete.

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.

DESCRIPCIÓN

La prueba PSA Libre EIA está basada en un ensayo de dos fases inmunoabsorbente vinculados a las enzimas de fase sólida. El sistema de ensayo utiliza un anticuerpo anti-PSA Libre monoclonal en la superficie de los micropozos y otro anticuerpo monoclonal unido con peroxidasa y es utilizado como rastreador. Las moléculas de PSA Libres en la solución estándar o suero son atrapadas como sándwich entre los dos anticuerpos. Después de la formación del complejo cubierto anticuerpo-antígeno-anticuerpo-enzima, los restantes rastreadores anticuerpo-enzimas son removidos por lavado. La actividad peroxidasa adherida a las paredes es evaluada por una reacción colorimétrica. La intensidad de color formada es proporcional a la concentración de PSA libre presente en la muestra.

MATERIALES PROVISTOS	96 Pruebas
1. 1 placa con 96 pozos.	1
2. Estándares, 6 viales.	0.5ml.
3. 1 enzima conjugada, 1 vial.	12 ml.
4. Solución TMB: 1 vial.	12ml.
5. Solución de Frenado: 1 vial.	12ml.
6. Solución de Lavado Concentrado 20X: 1 vial.	25ml

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 450 nm de longitud de onda con una banda de amplitud de 10 nm o menor y un rango de densidad óptica de 0-2 OD o mayor.
5. Papel absorbente o toalla de papel.
6. Papel cuadrulado.

ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

1. Almacene el kit a una temperatura de entre 2°C a 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.

ADVERTENCIAS 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.

PREPARACIÓN 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 475 ml de agua destilada o desionizada al frasco de (25 ml a 20x)

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

Previo al ensayo, permita que todos los reactivos alcancen la temperatura ambiente (18-26°C). Mezcle suavemente los reactivos antes de su uso.

1. Corte el número de pozos a utilizar. Cierre y selle el resto de los micropocillos no utilizados y refrigérelos a 2-8°C.
2. Vierta 50 µl de estándares de f-PSA, especímenes y controles en los pozos apropiados.
3. Vierta 100 µl de conjugado enzimático anti-f-PSA en todos los pocillos. Agite el platillo por 30 segundos.
4. Cubra e incube a temperatura ambiente por 60 minutos (18-26°C).
5. Retire el líquido de los pocillos. Enjuague y lave los pocillos tres veces con 300 µl de solución de lavado de 1X. Golpee la placa de los micropocillos sobre el papel absorbente para remover las gotas de agua residuales.
6. Vierta 100 µl de sustrato TMB en todos los pocillos.
7. Cubra e incube a temperatura ambiente por 15 minutos.
8. Frene la reacción agregando 50 µl de solución de frenado a cada pozo. Sacuda gentilmente para facilitar el mezclado de la solución.

9. Lea la densidad óptica a 450 nm con un lector de placa de micro valoración en un plazo de 15 minutos después de haber agregado la solución de frenado.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

Previo al ensayo, permita que todos los reactivos alcancen la temperatura ambiente (18-26°C). Mezcle suavemente los reactivos antes de su uso.

1. Corte el número de pozos a utilizar. Cierre y selle el resto de los micropocillos no utilizados y refrigérelos a 2-8°C.
2. Vierta 50 µl de estándares de f-PSA, especímenes y controles en los pozos apropiados.
3. Vierta 100 µl de conjugado enzimático anti-f-PSA en todos los pocillos. Agite el platillo por 30 segundos.
4. Cubra e incube a temperatura ambiente por 60 minutos (18-26°C).
5. Retire el líquido de los pocillos. Enjuague y lave los pocillos tres veces con 300 µl de solución de lavado de 1X. Golpee la placa de los micropocillos sobre el papel absorbente para remover las gotas de agua residuales.
6. Vierta 100 µl de sustrato TMB en todos los pocillos.
7. Cubra e incube a temperatura ambiente por 15 minutos.
8. Frene la reacción agregando 50 µl de solución de frenado a cada pozo. Sacuda gentilmente para facilitar el mezclado de la solución.
9. Lea la densidad óptica a 450 nm con un lector de placa de micro valoración en un plazo de 15 minutos después de haber agregado la solución de frenado.

CÁLCULO DE RESULTADOS

La curva estándar se construye de la siguiente manera:

1. Compruebe el valor estándar de f-PSA en cada vial estándar. Este valor puede variar de lote a lote. Asegúrese de verificar el valor de cada kit. Véase el ejemplo de la norma adjunta.
2. Para construir la curva estándar, trazara la absorbancia para el estándar de f-PSA (eje vertical) frente a las concentraciones estándar de f-PSA en IU/ml (eje horizontal) en un papel gráfico lineal. Dibuje la mejor curva a través de los puntos.
3. Utilice el valor de absorbancia de los controles y de cada muestra desconocida para determinar la concentración correspondiente de f-PSA desde la curva estándar.

Ejemplo de la curva estándar:

f-PSA (ng/ml)	Absorbancia (450 nm)
0	0.02
1.0	0.14
2.0	0.26
5.0	0.57
10.0	1.13
20.0	2.22

VALORES ESPERADOS Y SENSIBILIDAD

Como se explica en la introducción, el parámetro de diagnóstico importante no es el nivel de PSA libre, sino más bien la proporción de PSA libre y el PSA total. El porcentaje de PSA libre ofreció la mayor ventaja a la prueba de PSA total cuando los valores de PSA total fueron de entre 3.0 y 10.0 ng/ml. Para una muestra de un paciente dado, diferentes kits de pruebas comerciales de PSA total y PSA libre pueden dar diferentes valores. Los usuarios deben tener esto en cuenta al calcular el porcentaje. La siguiente información proviene de las Referencias 6, 7, 10, 11, 13, 14-17. Para los niveles de PSA total entre 3.0 y 4.0 ng/ml, utilizando un punto de corte del 19%, el porcentaje de PSA libre daría como resultado la detección de un 90% de todos los cánceres. Para los niveles totales de PSA entre 4.1 y 10.0 ng/ml, el punto de corte más adecuado para PSA libre es del 24%. En este punto de corte, el 95% de los cánceres son detectados. Con respecto a los niveles de PSA libre y el volumen de la próstata; la información disponible es más limitada. Catalona et al fueron los primeros en demostrar la importancia del tamaño de la próstata en la selección del valor de corte para el porcentaje de f-PSA.

En su estudio, los hombres con cáncer de próstata y un volumen prostático de 400 cc o menos, tenían una mediana a la proporción de PSA total de 0.092 (9.2%), un valor estadísticamente inferior al 0,159 (15.9%) encontrado para los pacientes con cáncer de próstata y una glándula mayor de 40,0 cc. Yemoto et al, en un estudio reciente de 200 hombres, no mostró correlación entre el porcentaje de f-PSA y volumen prostático. Varios estudios han demostrado una relación inversa entre el porcentaje de PSA libre y PSA total. Esta observación sugiere que los niveles de PSA más altos son comúnmente asociados con valores de porcentaje de PSA libre menor, y estos hombres con mayor frecuencia tienen cáncer de próstata más agresivo o avanzado.

PERFORMANCE

1. Correlación con un kit Elisa de referencia.

Un total de 60 muestras de suero fueron analizadas utilizando el presente kit ELISA y otro kit de referencia. Fueron obtenidos los siguientes resultados:

Correlación	Pendiente	Intercepción
0.99	0.79	0.011

2. Sensibilidad

La sensibilidad de este kit es de **0.1 ng/ml**.

LIMITACIONES DE LA PRUEBA

1. Se obtendrán resultados fiables y reproducibles cuando el procedimiento de ensayo se lleve a cabo con una comprensión completa de las instrucciones del inserto y con la observancia de las buenas prácticas de laboratorio.
2. El procedimiento de lavado es crítico. Un lavado insuficiente producirá una mala precisión y lecturas de absorbancia falsamente elevadas.
3. Los resultados obtenidos por el uso de este kit deben utilizarse sólo como un complemento de otros procedimientos de diagnóstico y la información disponible para el médico.

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.