

INTENCIÓN DE USO

El equipo fPSA está diseñado principalmente para la determinación de la concentración de PSA libre en suero humano.

INTRODUCCIÓN DEL ENSAYO

El antígeno humano específico de la próstata (PSA) es una serina proteinasa 33 kD que, en el suero humano, es predominante alfa 1 antichymotrypsin (PSA-ACT) y alfa 2-macroglobulina (PSA-AMG). Se encuentran también pequeñas cantidades de alfa-1-antitripsina y alfa tripsina inhibidor vinculado a los PSA. Cualquier PSA restante es en la forma libre (f-PSA). Los métodos actuales para la detección de cáncer de próstata en los hombres utilizan la detección de la forma principal de PSA-ACT. Los niveles de 4.0 ng/ml o superiores son fuertes indicadores de la posibilidad de cáncer. Sin embargo, los niveles elevados del suero PSA también se han atribuido a la hiperplasia prostática benigna y prostatitis, llevando a un gran porcentaje de resultados falsos positivos en las distintas evaluaciones. Una solución potencial a este problema consiste en la determinación de los niveles de PSA libre (f-PSA). Los estudios preliminares han sugerido que el porcentaje de PSA libre es menor en pacientes con cáncer de próstata que aquellos con hiperplasia prostática benigna. Por lo tanto, la medición de PSA libre del suero en conjunto con PSA total, puede mejorar la especificidad de cáncer de próstata en la proyección realizada a los hombres seleccionados, los cuales tengan niveles elevados de suero total PSA, que posteriormente podrían reducir las biopsias de próstata innecesarias con efectos mínimos sobre las tasas de detección del cáncer.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

La prueba de PSA es un inmunoensayo de fase sólida de dos sitios. Un anticuerpo está revestido en la superficie de los micropocillos y el otro anticuerpo está marcado con peroxidasa de rábano picante, el cual se utiliza como un trazador. Las moléculas PSA presentes en el suero o en la solución estándar son "comprimidas" entre los dos anticuerpos. Tras la formación revestida de anticuerpo-antígeno y anticuerpo-enzima compleja, se deben quitar las etiquetas del anticuerpo-enzima por medio del lavado. La actividad ligada con la peroxidasa de rábano picante en los micropozos es posteriormente ensayada agregando los reactivos del sustrato y siendo sometidos a las reacciones de Quimioluminiscencia. La intensidad de la luz emitida desde el respectivo micropozo es proporcional a la cantidad de enzima presente, y está directamente relacionada con la cantidad de antígeno PSA en la muestra. Por lo tanto, por referencia a una serie de normas de PSA, las muestras deben ser analizadas todas de la misma manera, y deben ser cuantificadas las concentraciones de PSA en las muestras desconocidas.

MATERIALES SUMINISTRADOS

1. Placa con 96 micropocillos recubiertos con anticuerpo anti-fPSA
2. Diluyente de la muestra, 12.0 ml
3. Reactivo conjugado enzimático, 22.0 ml
4. Estándares de referencia de fPSA, contiene 0, 0.1, 0.5, 2.0, 5.0 y 10.0 ng/ml, líquido, listo para su uso.
5. Buffer de lavado concentrado 50X, 15.0 ml
6. Reactivo A en Quimioluminiscencia, 6.0 ml
7. Reactivo B en Quimioluminiscencia, 6.0 ml

MATERIALES REQUERIDOS PERO NO SUMINISTRADOS

1. Agua destilada.
2. Pipetas de precisión, 0.05 ml, 0.1 ml, 0.2 ml
3. Puntas de pipetas desechables.
4. Tubo de vidrio o frascos para mezclar el reactivo A y B.
5. Lector para micropocillos.
6. Mezclador Vórtex o equivalente.
7. Papel absorbente.
8. Papel para gráfica.

PREPARACIÓN DEL REACTIVO

1. A todos los reactivos se le debe permitir alcanzar la temperatura ambiente (18-25°C) antes de su uso. Se deben mezclar de manera suave antes de su uso. No provocar espuma.
2. Para preparar la solución de sustrato, se debe realizar una mezcla 1:1 del Reactivo A con el Reactivo B antes de su uso. Mezclar con suavidad para asegurar una mezcla completa. Desechar el exceso sobrante después de su uso.
3. Diluir 1 volumen de Buffer de lavado (50X) con 49 volúmenes de agua destilada. Por ejemplo, diluir 15 ml de lavado tampón (50X) en 735 ml de agua destilada para preparar 750 ml de Buffer de lavado (1X). Mezclar bien antes de su uso.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

1. Asegurar el número deseado de micropocillos recubiertos en el soporte. Dispensar 100 µl de estándares, muestras y controles de fPSA dentro de los micropocillos adecuados.
2. Dispensar 100 µl de buffer del ensayo. Mezclar completamente durante 30 segundos. Es muy importante tener la mezcla completa en este paso.
3. Incubar a una temperatura de 37°C durante 60 minutos.
4. Retire la mezcla de incubación sacudiendo el contenido de la placa en un recipiente de desechos.
5. Enjuague y sacuda 5 veces los pocillos con buffer de lavado (1X).
6. Acomode los micropocillos sobre el papel absorbente para quitar las gotas de agua residual.
7. Dispensar 200 µl del reactivo conjugado enzimático dentro de cada uno de los micropocillos. Mezclar bien.
8. Incubar a una temperatura de 37°C durante 60 minutos.
9. Remover todos los contenidos y lavar el plato como se describe en el paso 4,5 y 6 anteriormente.
10. Dispensar 100 µl de solución de sustrato de Quimioluminiscencia en cada micropozo. Mezclar suavemente durante 5 segundos.
11. Se debe leer 5 min más tarde, se deberán leer los micropozos mediante un lector de micropocillos de Quimioluminiscencia. (Entre 5 y 20 minutos después de la dosificación de los sustratos).

NOTAS IMPORTANTES

1. El procedimiento de lavado es fundamental. El insuficiente lavado producirá mala precisión y lecturas falsamente elevadas.
2. Si hay burbujas en los micropocillos, se crearán lecturas falsas. Utilice agua destilada para eliminar las burbujas antes de añadir el sustrato.

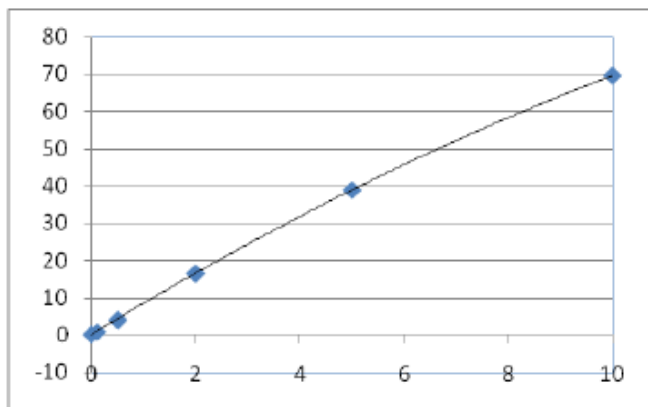
CÁLCULO DE RESULTADOS

1. Calcular el promedio de las unidades relativas de luz de cada una de las lecturas realizadas (RLU) para cada conjunto de estándares de referencia, controles y muestras.
2. Se recomienda utilizar un software especial, el cual sea adecuado para calcular los resultados. El mejor ajuste para la curva utilizada en los ensayos es la regresión cuadrática o la 4° regresión de parámetro. Si el software no está disponible, se deberá construir una curva estándar mediante la representación de la media (RLU) obtenida para cada referencia estándar contra la concentración de CA 15-3 en mIU/ml sobre papel milimetrado lineal. Se debe colocar los valores de RLU en el eje vertical (y) y la concentración en el eje horizontal (x).
3. Usando el valor promedio de absorbancia para cada una de las muestra, se deberá determinar la correspondiente concentración de fPSA en ng/ml de la curva estándar.

EJEMPLO DE CURVA ESTÁNDAR

A continuación se muestran los resultados de un funcionamiento estándar típico. Esta curva estándar, tiene un único objetivo, el cual es solamente ilustrar y no debe utilizarse para calcular ciertas incógnitas. Se requiere las corridas del ensayo junto con una curva estándar cada vez. El cálculo de los valores de las muestras se deben basar en la curva particular, que a su vez se debe ejecutar al mismo tiempo.

fPSA (ng/ml)	RLU
0.0	0.16
0.1	0.89
0.5	3.91
2.0	16.4
5.0	38.9
10.0	69.6



VALORES ESPERADOS Y SENSIBILIDAD

Para los niveles totales de PSA entre 3.0 y 4.0 ng/ml, utilizando un punto de corte del 19% para el porcentaje de PSA libre daría lugar a la detección del 90% de todos los cánceres.

Para los niveles totales de PSA entre 4.1 y 10.0 ng/ml, el punto de corte más apropiado para el PSA libre es del 24%. En este punto de corte, se detectaría el 95% de los cánceres.

PSA Libre > 27% con baja probabilidad de cáncer de próstata.

La concentración mínima detectable de fPSA en este ensayo se estima en 0.05 ng/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.* 1991; 37:1618-1625.
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.* 1991; 51:222-226.
4. Catalona WJ, Smith DS, Ratliff TL, Basler JW. Detection of organ- confined prostate cancer is increased through prostate-specific antigen-based screening. *JAMA.* 1993; 270:948-954.
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.* 1987; 317:-909-916.
6. Catalona et al. Percentage of Free Serum PSA and Prostate Cancer
7. Detection. *JAMA.* 1995; 274, No. 15: 1214-1220.
8. Catalona WJ, Smith DS, Ratliff TL, et al. Measurement of prostate- specific antigen in serum as a screening test for prostate cancer. *N Engl J Med.* 1991; 324:1156-1161. Erratum: *J Med.* 1991; 325:1324.
9. Carter HB, Pearson JD, Metter J, et al. Longitudinal evaluation of prostate-specific antigen levels in men with and without prostate disease. *JAMA.* 1992; 267:2215-2220.