

fPSA

Análisis ELISA para la determinación cuantitativa del Antígeno Prostático Específico libre en suero humano

Presentación

[REF] 52035 96 determinaciones Estuche Completo
[IVD]

Uso previsto

El Antígeno Prostático Específico (PSA) es una glicoproteína (serine proteasa) con un peso molecular de 28,4 kDa¹, sintetizada por las células epiteliales prostáticas. PSA no se detecta sólo en hombres pero también en mujeres sufriendo de un cáncer de mama (30-40%). Valores elevados de PSA se encuentran en prostatitis, hiperplasias prostáticas benignas (BPH) y en cánceres prostáticos malignos o metastáticos (PCA). Como el cáncer prostático es el maligno del hombre segundo en frecuencia, la detección de un nivel elevado de PSA es de gran importancia en el diagnóstico temprano. Por su alta sensibilidad, el valor de PSA en suero ha resultado ser más útil en el diagnóstico y tratamiento de pacientes que la fosfatasa prostática ácida (PAP)².

En el suero humano, el PSA existe como molécula libre o compleja que se pueden detectar con métodos inmunológicos. Con este ELISA, se determina el contenido del PSA libre (fPSA).

La fracción de fPSA ha resultado ser sustancialmente más baja en pacientes con PCA no tratado que en pacientes que sufren de BPH³. Por eso, la determinación del PSA total (tPSA) y del fPSA puede conducir a una diferenciación mejor entre BPH y PCA.

Principio - Sandwich EIA -

El análisis fPSA ELISA está basado en la clásica técnica ELISA sandwich haciendo uso del sistema de alta afinidad Biotina-Estreptavidina. Se recubren micropocillos ELISA con Estreptavidina. En la primera etapa de incubación, se mezclan muestras, calibradores o controles y el conjugado enzimático-anticuerpo (anticuerpos monoclonales anti-PSA biotinados y anticuerpos marcados con peroxidasa) para formar el complejo sandwich que se fija a la superficie de los micropocillos por la interacción de la biotina con la estreptavidina inmovilizada. Al final de la incubación, el exceso de conjugado y antígenos no fijados son eliminados por lavado. Se agrega TMB/Sustrato, se forma un color azul que se transforma a amarillo después de parar la reacción. La intensidad del color es directamente proporcional a la concentración de fPSA en la muestra.

La absorbancia de los calibradores y muestras se determina haciendo uso de un lector de micropocillos ELISA (HUMAREADER/HUMAREADER PLUS). La concentración en la muestra se evalúa por medio de una curva de calibración la cual se obtiene haciendo uso de calibradores de suero con concentraciones de fPSA conocidas.

Reactivos y contenidos

[MIC]	12	Tiras de Micropocillos en portatira. Tiras (divisibles) de 8 pocillos, recubiertos con estreptavidina	
[CAL]	A - F 6x2,0ml	Calibradores (tapa blanca) listos para usar, en suero humano Concentraciones de fPSA: 0 (A), 0,5 (B), 1,0 (C), 2,5 (D), 5,0 (E), y 10,0 (F) ng/ml	
[CON]	13 ml	Conjugado enzimático-anticuerpo (tapa blanca) listo para usar, coloreado verde pH 7,45 ± 0,1 anticuerpos monoclonales de ratón anti-fPSA, anticuerpos marcados con peroxidasa (cabra)	
[WS]	20 ml	Solución de Lavado (tapa negro) Concentrado para aprox. 1000 ml Buffer MOPS salino	pH 8,8 ± 0,4 5 mmol/l
[SA]	7,0 ml	Reactivo Sustrato A (tapa amarilla) 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) Buffer Acetato de Sodio	pH 3,5 ± 0,1 1 g/l 0,05 mol/l
[SB]	7,0 ml	Reactivo Sustrato B (tapa azul) Peróxido de Urea Hidrógeno Buffer Acetato de Sodio	pH 4,5 ± 0,1 0,8 g/l 0,05 mol/l
[STOP]	7,5 ml	Solución de Parada (tapa roja) Acido sulfúrico	0,5 mol/l
	1	Tira adhesiva	

Agentes preservantes: Concentración total < 0,04 %

Notas de seguridad

No ingerir los reactivos. Evitar el contacto con los ojos, piel y membranas mucosas. Todas las muestras de pacientes y **[CAL]** del estuche deberán ser manipulados como posibles agentes infecciosos. **[CAL]** han sido encontrado negativos para HBsAg y anticuerpos contra VHC y VIH 1 + 2 en los donantes. Usar ropa protectora y guantes desechables según las buenas prácticas de laboratorio (GLP).

Todos los materiales contaminados con muestras o **[CAL]** deben inactivarse por métodos aprobados (autoclavado o tratamiento químico) según las regulaciones aplicables.

[STOP] irrita los ojos, la piel y las membranas mucosas. En caso de contacto, lavar intensamente con abundante agua y consultar un médico.

Estabilidad

Los reactivos son estables hasta las fechas de caducidad señaladas en las etiquetas individuales cuando se almacenan a 2...8°C.

Después de abiertos, los reactivos deben almacenarse a 2...8°C y utilizarse dentro de 60 días (ver "Nota").

[MIC]

- están selladas en un envase de aluminio con un desecante.
- Antes de abrir, las tiras deben estar a **temperatura ambiente**.
- Las tiras no utilizadas deberán ser devueltas al envase con cierre y almacenadas con el desecante. Las tiras almacenadas de esta manera a 2...8°C pueden ser usadas hasta la fecha de caducidad (ver "Nota").
- No tocar el anillo superior o el fondo de los micropocillos con los dedos.

Preparación de reactivos

Todos los reactivos deben estar a **temperatura ambiente** (15...25°C) antes del uso. Los reactivos que no están en uso deberían siempre estar almacenados a 2...8°C.

Solución de trabajo de Lavado [WASH]

- **Una ligera turbidez que puede aparecer en el concentrado [WS] se disuelve completamente durante la dilución.**
- Diluir **[WS]** a 1000 ml con agua deionizada fresca en un envase apropiado. Enjuagar el envase varias veces.
- Estabilidad: **60 días a 15...25°C.**

Solución de trabajo Sustrato [SUB]

- **Para un uso prolongado:** preparar cantidad necesaria mezclando porciones iguales de **[SA]** y **[SB]**. Usar solamente un envase plástico limpio previamente enjuagado con agua desionizada.
- **Utilizar dentro de 30 días:** Verter el contenido de un frasco de **[SA]** en un frasco de **[SB]** y mezclar. Almacenar de 2...8°C.
- ¡Manipular **[SUB]** cuidadosamente y **evitar la contaminación!** ¡No utilizar si es de color azul!
- Almacenar la solución protegida de la luz intensa.
- Estabilidad: **30 días a 2...8°C.**

Muestra

Suero

Las muestras deben obtenerse antes de una intervención clínica¹⁰.

No usar muestras hiperlipémicas o hemolizadas.

Las muestras pueden almacenarse por 5 días a 2...8°C, o por hasta 30 días a -20°C. **Congelar y descongelar solamente una vez.** Al descongelar una muestra debe ser homogeneizada. Eliminar el material particulado por centrifugación o filtración.

Procedimiento

Seguir el procedimiento exactamente como se describe.

Notas de uso

- U1:** No mezclar o usar componentes de diferentes números de lote. No mezclar tapas de envases. No usar reactivos después de sus fechas de caducidad.
- U2:** No usar reactivos que pueden ser contaminados o que tienen aspecto diferente o olen diferentemente que normal.
- U3:** Notar el reparto **[CAL]**, las muestras y los controles cuidadosamente en la hoja provista en el estuche.
- U4:** **[MIC]** - sacar el número requerido y colocarlos firmemente en el portatiras.
- U5:** **Analizar** cada **[CAL]**, control o muestra **en duplicado. Pipetearlos en el fondo** de los micropocillos.
- U6:** **Siempre deben agregarse los reactivos en el mismo orden y tiempo para minimizar diferencias en los tiempos de reacción entre los micropocillos.** Es importante para obtener resultados reproducibles. El pipeteo de las muestras no debería exceder de 10 minutos. De lo contrario pipetear la curva **[CAL]** en las posiciones indicadas en la mitad del intervalo de la serie. Si se emplea más de una placa, repetir la curva de calibración.
- U7:** Evitar/remover burbujas de aire antes de las incubaciones y lecturas de absorbancia.
- U8:** **[SUB]** inicia y **[STOP]** termina una reacción cinética. **Evitar la luz intensa** durante el desarrollo del color.
- U9:** **[MIC]** - **Después de cada pipeteo agitar** suavemente durante 20-30 sec. sin verter las soluciones para asegurar una buena mezcla. Si disponible, mezclar en un mezclador de pocillos (p.ej. HUMAREADER/HUMAREADER PLUS).

Procedimiento de lavado

El procedimiento de lavado es crítico. Un lavado insuficiente producirá una mala precisión o absorbancias falsamente elevadas.

L1: Remover las tiras adhesivas, aspirar el contenido, agregar [WASH], aspirar después de aproximadamente 30 sec. de enjuague y repetir el lavado dos veces.

L2: En el caso de lavadores automáticos, se deben cebar con [WASH] y lavar los pocillos además 3 veces. Asegurarse que el lavador llene los pocillos completamente y los aspire eficientemente después de 30 sec. (líquido remanente: < 15 µl).

L3: Después del lavado, remover el líquido remanente invirtiendo los micropocillos sobre papel absorbente.

Esquema de pipeteo

Los reactivos y las muestras deberían estar a temperatura ambiente antes del uso.		
Etapa 1	Pocillo [µl]	
	A1...D2 Calibrador	E2... Muestra
[CAL] A-F; en duplicado	50	--
Muestras, Controles; en duplicado	--	50
[CON]	100	100
Mezclar y cubrir [MIC] con tira adhesiva		
Incubar por 60 min a 20...25°C		
Lavar 3 veces como se describe (ver L1 – L3)		
[WASH]	300	300
Etapa 2		
[SUB]	100	100
Incubar por 15 min a 20...25°C (ver U8)		
[STOP]	50	50
Mezclar cuidadosamente		
Medir la absorbancia a 450 nm lo más pronto posible o dentro de 10 min. después de terminar la reacción usando una longitud de onda de referencia de 630-690 nm (si está disponible).		

Validación del análisis

Los resultados son válidos si se cumplen los siguientes criterios:

- 1) Absorbancia máxima ([CAL] F) D.O. $\geq 1,5$
- 2) El control debe analizarse a 3 concentraciones:

Concentración de fPSA a 80% de D.O. $\text{max} = 7,7 \pm 1,9 \text{ ng/ml}$

Concentración de fPSA a 50% de D.O. $\text{max} = 4,4 \pm 1,1 \text{ ng/ml}$

Concentración de fPSA a 20% de D.O. $\text{max} = 1,5 \pm 0,5 \text{ ng/ml}$

Cálculo

La curva dosis respuesta se usa para interpolar la concentración de fPSA en muestras desconocidas.

1. [CAL] - Graficar la absorbancia de cada duplicado contra la correspondiente concentración de fPSA en ng/ml sobre papel milimetrado lineal (no promediar los duplicados de los calibradores antes de graficar).
2. Trazar la mejor curva a través de los puntos del gráfico.
3. Para determinar la concentración de fPSA en una muestra desconocida (S), localizar el promedio de absorbancia de los duplicados sobre el eje vertical del gráfico, hallar el punto de intersección sobre la curva y leer la concentración (en ng/ml) desde el eje horizontal del gráfico. Ver la ilustración.

Interpretación de resultados

En el sangre, el PSA se encuentra sobre todo en un complejo con el inhibidor de proteasa antitrombina (ACT)⁴. Este complejo PSA-ACT es típicamente la forma más prevalente en la circulación de pacientes que sufren de cáncer prostático (PCA), presenta aprox. el 85% del PSA total (tPSA) presente. En un 12-15% de los pacientes que sufren de PCA, el fPSA resuelta ser la forma más prevalente⁵.

En un número de estudios se ha encontrado que el fPSA es mucho más aumentado en pacientes sufriendo de hiperplasia prostática benigna (BPH) que en pacientes con PCA⁵. Por eso, se ha propuesto realizar una interpretación combinada del valor de tPSA, especialmente en el rango de 4 hasta 10 ng/ml de tPSA, y del cociente de fPSA y tPSA para mejorar el diagnóstico y la diferenciación entre PCA y BPH respectivamente^{6,7,8}.

Estas figuras pueden variar perceptiblemente, si se usan pruebas de origen diferente para la determinación del tPSA y del fPSA, debido a las variaciones posibles de las especificidades del anticuerpo respectivo. Las figuras antedichas son solamente válidas para la combinación de las pruebas HUMAN PSA ELISA y HUMAN fPSA ELISA.

Limitaciones

La terapia hormonal de un cáncer prostático puede alterar la expresión de PSA. Por lo tanto un resultado bajo de PSA que sigue un tratamiento de un cáncer

prostático puede no reflejar exactamente la presencia de tejido residual o de la reactivación de la enfermedad¹¹. Toda la historia relevante del paciente y los datos clínicos deben ser considerados antes de tomar cualquier decisión crítica.

Valores esperados

	Nivel de fPSA (n = 122)
Hombres sanos, con próstata normal ($\leq 4 \text{ ng/ml tPSA}$)	$\leq 0.8 \text{ ng/ml}$

La probabilidad para PCA aumentará, si el nivel de tPSA sobrepasa los 4 ng/ml y si el cociente de porcentaje de fPSA/tPSA está debajo del 25%^{7,8,9}.

fPSA / tPSA	Probabilidad de PCA
$\leq 10\%$	55%
10-15%	28%
15-20%	25%
$> 20\%$	10%

Cada laboratorio debería establecer sus propios valores esperados utilizando la instrumentación, los métodos de colección de sangre y los técnicos de análisis que se emplean normalmente en dicho laboratorio.

Características de la ejecución

La prueba HUMAN fPSA ELISA tiene una sensibilidad analítica de 0,05 ng/ml de muestra.

Las muestras con una concentración de fPSA de más de 10 ng/ml deben diluirse (1+9) con suero normal ([CAL] A) y ser reanalizadas.

Multiplicar el resultado por 10.

El análisis se estandarizó según el estándar 1° IS de la OMS no. 96/670.

Los datos típicos de ejecución de la prueba pueden ser encontrados en el informe de verificación, accesible vía

www.human.de/data/gb/vr/el-fpsa.pdf

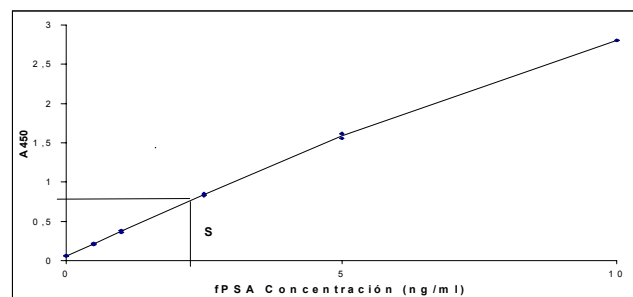
www.human-de.com/data/gb/vr/el-fpsa.pdf

Nota

Los componentes del estuche son estables hasta la fecha de caducidad aún después de abiertos. Sin embargo, la posibilidad de una contaminación está directamente relacionada con el número de tomas del reactivo. Por lo tanto, el límite de 60 días en viales abiertos se fijó por razones de seguridad.

La manipulación debería siempre estar de acuerdo con las buenas prácticas de laboratorio (GLP*). ¡Los criterios de validación del análisis deben cumplirse siempre!

(*Esto incluye: Colocar la tapa debida en el vial y cerrarlo firmemente / Sacar de los viales de stock solamente los reactivos necesarios para la corrida si entraran en contacto con otras soluciones contaminantes como lo son las muestras, etc. / Las soluciones de stock siempre deben regresarse a 2...8°C si no se usan.)



Referencias

1. Chen, Z. *et al.*, Clin. Chem. **41**, 1273-1282 (1995)
2. Wild, D., The Immunoassay Handbook, Stockton Press, 449 (2001)
3. Stamey, T.A. *et al.*, JAMA **281**, 1395-1400 (1999)
4. Zhou, A.M. *et al.*, Clin. Chem. **39**, 2483-2491 (1993)
5. Lijla, H. *et al.*, Clin. Chem. **37**, 1618-1624 (1991)
6. Junker, R. *et al.*, Clin. Chem. **43**, 1588-1594 (1997)
7. Gann, P.H. *et al.*, J. Urol. **167**, 2427-2434 (2002)
8. Lein M., Cancer Invest. **16**, 45-49 (1998)
9. Thomas, L., Clinical Laboratory, TH-Books, Lamerz Rolf, 982-986 (1998)
10. Stamey, T.A. *et al.*, N. Engl. J. Med. **317**, 909-916 (1987)
11. Morgan, W.R. *et al.*, J. Urol. **145**, 319-323 (1991)

EL-fPSA
INF 5203501 E
05-2005-2



Human