

**ANTÍGENO PROSTÁTICO ESPECÍFICO
(PSA) ENZIMA INMUNOENSAYO
KIT DE PRUEBAS**

**Inmunoensayo enzima para la determinación
cuantitativa
del antígeno prostático específico
(PSA) en suero humano**

**PARA USO INVESTIGACIONAL
Conservar de 2-8°C**

USO

Para la determinación cuantitativa de la concentración de antígeno de cáncer PSA en suero humano.

INTRODUCCION

El antígeno prostático específico humano (PSA) es una serina proteasa, una glicoproteína de cadena única con un peso molecular de aproximadamente 34.000 daltons conteniendo el 7% de hidratos de carbono en peso. PSA es inmunológicamente específico para el tejido de la próstata, que está presente en condiciones normales, hiperplásicos benignos y tejido prostático maligno, en el carcinoma de próstata metastásico, y también en el líquido prostático y el plasma seminal. El PSA no está presente en ningún otro tejido normal obtenido de los hombres, ni es producido por el cáncer de mama, pulmón, colon, recto, estómago, páncreas o la tiroides. Además, es funcional e inmunológicamente diferente de la fosfatasa ácida prostática (PAP). Elevadas concentraciones séricas de PSA han sido reportadas en pacientes con cáncer de próstata, hipertrofia prostática benigna, o la inflamación de otros tejidos genitourinarios adyacentes, pero no en hombres aparentemente sanos, hombres con la próstata no carcinoma, mujeres aparentemente sanas, o las mujeres con cáncer. Los informes han sugerido que el nivel sérico de PSA es uno de los marcadores tumorales más utilizados en oncología. Puede servir como un marcador preciso para evaluar la respuesta al tratamiento en pacientes con cáncer de próstata. Por lo tanto, la medición de las concentraciones séricas de PSA puede ser una herramienta importante en el control de los pacientes con cáncer de próstata y en la determinación del potencial y real efectividad de la cirugía u otros tratamientos. Estudios recientes también indican que los niveles de PSA puede mejorar la detección precoz del cáncer de próstata cuando se combina con el examen digital rectal (DRE).

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

La prueba de PSA ELISA se basa en el principio de una fase sólida enzima inmunoensayo. El sistema de ensayo utiliza un anticuerpo de cabra anti-PSA dirigido contra PSA intacta para la inmovilización en fase sólida (en los pocillos de microtitulación). Un anticuerpo monoclonal anti-PSA conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) está en la solución de anticuerpo conjugado enzimático. La muestra se deja reaccionar primero con el anticuerpo de cabra inmovilizado a temperatura ambiente durante 60 minutos. Los pocillos se lavan para

eliminar cualquier antígeno no unido. El anticuerpo monoclonal conjugado anti-PSA-HRP reacciona con el antígeno inmovilizado durante 60 minutos a temperatura ambiente, dando lugar a las moléculas de PSA se intercalen entre la fase sólida y los anticuerpos ligados a enzimas. Los pocillos se lavan con agua para eliminar los anticuerpos marcados no consolidados. Una solución del reactivo TMB es añadida y se incuba a temperatura ambiente durante 20 minutos, resultando en el desarrollo de un color azul. El desarrollo del color se detiene con la adición de la solución de stop cambiándolo a color amarillo. La concentración de PSA es directamente proporcional a la intensidad del color de la muestra. La absorbancia se mide espectrofotométricamente a 450nm.

REACTIVOS

Materiales suministrados en el kit:

- Placas de microtitulación cabra anti-PSA recubiertas con 96 pocillos.
- Búfer de cero, 7 ml.
- El estándar de referencia contiene 0, 2, 4, 15, 60 y 120 ng/ml PSA, liofilizado. 1 juego.
- Enzima conjugada de reactivos, 12 ml.
- TMB reactivo (un paso), 11 ml.
- Solución de Stop (1N HCl), 11 ml.

Materiales necesarios pero no suministrados:

- Pipetas de precisión: 50µl, 100µl y 1.0 ml.
- Puntas de pipeta desechable.
- Agua destilada.
- Mezclador Vortex o equivalente.
- Papel absorbente o papel toalla.
- Papel cuadriculado.
- Un lector de placas de microtitulación con un ancho de banda de 10nm o menos, y un rango de densidad óptica de 0-2 DO o mayor a 450nm.

RECOLECCIÓN DE MUESTRAS Y PREPARACIÓN

El suero debe ser preparado a partir de una muestra de sangre entera obtenida por técnicas médicas aceptables. Este kit es solo para uso con muestras de suero sin aditivos.

ALMACENAMIENTO DEL KIT Y LOS INSTRUMENTOS

Los kits de prueba sin abrir se deben almacenar a 2-8 °C a su recepción y la placa de microlitro debería ser guardada en una bolsa sellada con desecantes para minimizar la exposición a la humedad del aire. Kits de prueba abiertos son estables hasta la fecha de caducidad indicada, siempre y cuando se almacenen como se describió anteriormente. Un lector de placas de microtitulación con un ancho de banda de 10nm o menos, y un rango de densidad óptica de 0-2 DO o mayor a 45 nm de longitud de onda es aceptable para su uso en la medición de absorbancia.

PREPARACION DE LOS REACTIVOS

1. Todos los reactivos deben estar a temperatura ambiente (18-25°C) antes de su uso.
2. Reconstituir cada estándar liofilizado con 1.0 ml de agua destilada. Deje el material reconstituido durante al

menos 20 minutos y mezcle suavemente. Estándares reconstituidos permanecen estables durante un máximo de 30 días cuando se almacenan selladas a 2-8 ° C.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

1. Asegure el número deseado de pocillos cubiertos en el soporte.
2. Dispense 50µl de estándares, muestras y controles en los pocillos apropiados.
3. Dispense 50µl de buffer cero en cada pocillo.
4. Mezclar bien durante 30 segundos. Es muy importante tener una mezcla completa en esta configuración.
5. Incube a temperatura ambiente (18-25°C) durante 60 minutos.
6. Retire la mezcla de incubación vaciando el contenido de la placa en un recipiente de residuos.
7. Enjuague y vacíe los pocillos de microtitulación 5 veces con **agua destilada o deionizada. (Por favor, no use el agua del grifo).**
8. Escurra los pocillos enérgicamente sobre papel absorbente o toallas de papel para remover todas las gotas de agua.
9. Dispense 100µl de reactivo conjugado de enzima en cada pocillo. Mezclar suavemente durante 10 segundos.
10. Incube a temperatura ambiente (18-25°C) durante 60 minutos.
11. Retire la mezcla de incubación vaciando contenido de la placa en un recipiente de residuos.
12. Enjuague y vacíe los pocillos de microtitulación 5 veces con **agua destilada o deionizada. (Por favor, no use el agua del grifo).**
13. Escurra los pocillos enérgicamente sobre papel absorbente para eliminar las gotas de agua.
14. Dispense 100µl de reactivo TMB en cada pocillo. Mezclar suavemente durante 10 segundos.
15. Incubar a temperatura ambiente durante 20 minutos.
16. Detenga la reacción agregando 100µl de solución de stop cada pocillo.
17. Mezclar suavemente durante 30 segundos. **Es importante asegurarse de que todo el color azul cambie a amarillo por completo.**
18. Usando un lector de placas de microlitro, lea la densidad óptica a 450nm dentro de los **próximos 15 minutos.**

CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

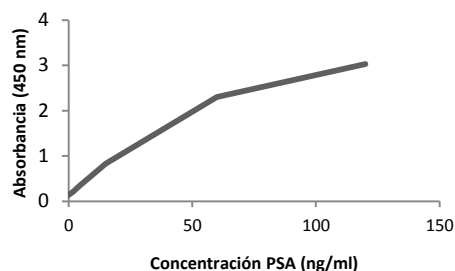
1. Calcule los valores de absorbancia promedio (A450) para cada conjunto de normas de referencia, controles y muestras.
2. Construya una curva estándar al trazar la absorbancia media obtenida para cada estándar de referencia contra su concentración en ng/ml en el papel gráfico lineal, con la absorbancia en el eje vertical (Y) y la concentración en el eje horizontal (X).
3. Usando el valor de absorbancia media para cada muestra, determine la concentración correspondiente de PSA en ng/ml a partir de la curva estándar.

EJEMPLO DE LA CURVA ESTÁNDAR

Los resultados de una corrida estándar típica con lecturas de densidad óptica a 450nm se muestran en el eje (Y) contra las concentraciones de PSA se muestra en el eje (X). Esta curva estándar es con el propósito de ilustración, y no debe ser utilizado para el cálculo de

incógnitas. Cada usuario debe obtener sus propios datos y curva estándar.

PSA (ng/ml)	Absorbancia (450nm)
0	0.141
2	0.219
4	0.320
15	0.832
60	2.300
120	3.031



VALORES Y SENSIBILIDAD

En hombres sanos se espera que los valores de PSA por debajo de 4 ng/ml. La concentración mínima detectable de PSA en este ensayo se estima en 1 ng/ml.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

1. Resultados confiables y reproducibles serán obtenidos cuando el procedimiento de ensayo se lleva a cabo con una completa comprensión de las instrucciones del paquete y con el cumplimiento de 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. Muestras de suero demostrando lipemia, hemólisis o turbidez no deben ser utilizados con este examen.
4. Los resultados obtenidos de la utilización de este equipo sólo deben usarse como complemento de otros procedimientos de diagnóstico e información disponible para el médico.

ATLAS MEDICAL

REVISION A (11.09.2005)