

PSAL

(Antígeno Prostático Específico Libre)

Nota:

El valor medido de PSAL de la muestra de un paciente puede variar según el procedimiento de prueba utilizado. Por lo tanto, el resultado del laboratorio siempre debe contener una declaración sobre el método de prueba PSAL utilizado. Los valores de PSAL determinados en muestras de pacientes mediante diferentes procedimientos de prueba no pueden compararse directamente entre sí y podrían ser la causa de interpretaciones médicas erróneas. Si hay un cambio en el procedimiento de prueba de PSAL utilizado durante el seguimiento de la terapia, los valores de PSAL obtenidos al cambiar al nuevo procedimiento deben confirmarse mediante mediciones paralelas con ambos métodos.

Uso Previsto:

La prueba de PSA libre es un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) para la determinación cuantitativa in vitro del antígeno prostático específico libre (PSAL) en suero humano.

Resumen:

El PSA es una glicoproteína serina proteasa de cadena sencilla de 32 kDa con una especificidad similar a la quimotripsina producida por el epitelio secretor de la glándula prostática. licuefacción del coágulo seminal. 2 Normalmente, solo niveles bajos de PSA están presentes en el torrente sanguíneo, y el aumento de las concentraciones séricas indica patología prostática, incluida la hiperplasia prostática benigna y el cáncer de próstata. La determinación de PSA ahora se usa ampliamente para la detección y el tratamiento de pacientes con cáncer de próstata y se considera el marcador serológico superior para el cáncer de próstata.³

Se ha demostrado que el PSA forma complejos estables con diferentes antiproteasas y la porción dominante del PSA en el suero del paciente se presenta en complejo con α 1-antiquimotripsina (PSA-ACT).⁴ Sin embargo, existen grandes variaciones en la relación entre el PSA libre y el complejo PSA-ACT. entre diferentes individuos. Varios estudios han encontrado que la proporción de PSA libre es mayor en la enfermedad prostática benigna en comparación con el cáncer de próstata.^{4,5} El EIA de PSA libre es un ensayo para la determinación específica de PSA libre sin reactividad cruzada con el complejo PSA-ACT.⁶

Principio de Prueba:

Duración total de la prueba: 80 minutos.

- Se combinan la muestra, los micropocillos recubiertos con anticuerpos específicos de PSA y el anticuerpo monoclonal anti-PSA marcado con enzima.
- Durante la incubación, se permite que el PSA libre presente en la muestra reaccione simultáneamente con los dos anticuerpos, lo que da como resultado que las moléculas de PSA libre queden intercaladas entre la fase sólida y los anticuerpos ligados a enzimas.
- Después del lavado, se genera un complejo entre la fase sólida, el PSA libre dentro de la muestra y los anticuerpos ligados a enzimas por reacciones inmunológicas.
- Luego se agrega la solución de sustrato y este complejo la cataliza, lo que da como resultado una reacción cromogénica. La reacción cromogénica resultante se mide como absorbancia.
- La absorbancia es proporcional a la cantidad de PSA libre en la muestra.

Materiales Proporcionados:

- Microplaca recubierta, 8 x 12 tiras, 96 pocillos, recubierta previamente con anticuerpo monoclonal específico de PSA de ratón.
- Calibradores, 6 viales, 1 mL cada uno, listos para usar; con concentraciones indicadas en cada envase.
- Conjugado enzimático, 1 vial, 11 ml de anticuerpo monoclonal anti-PSA marcado con HRP (peroxidasa de rábano picante) en tampón Tris-NaCl que contiene BSA (albúmina de suero bovino). Contiene 0,1% de conservante ProClin300.
- Sustrato, 1 vial, 11mL, listo para usar, (tetrametilbencidina) TMB.
- Solución de parada, 1 vial, 6,0 mL de ácido sulfúrico 1 mol/L.
- Concentrado de solución de lavado, 1 vial, 25 ml (concentrado 40X), solución de lavado PBS-Tween.
- Inserto: 1 copia.
- Tapa Placa: 1 pieza.

Materiales Requeridos (Pero no provistos):

- Lector de microplacas con capacidad de absorción de longitudes de onda de 450 nm y 620 nm.
- Lavador de microplacas.
- Incubadora.
- Sacudidor de platos.
- Micropipetas y micropipetas multicanal que suministran 50 μ l con una precisión superior al 1,5 %.
- Papel absorbente.
- Agua destilada

Precauciones y Advertencias:

- Sólo para uso diagnóstico in vitro.
- Tome las precauciones normales requeridas para el manejo de todos los reactivos de laboratorio.
- La eliminación de todos los materiales de desecho debe realizarse de acuerdo con las pautas locales.

- No utilice reactivos más allá de la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.
- No mezcle ni utilice componentes de kits con diferentes códigos de lote.
- Todos los desechos de muestras y reacciones deben considerarse potencialmente biopeligrosos. La manipulación de las muestras y los residuos de la reacción debe realizarse de acuerdo con las normativas y directrices locales.
- La solución de parada contiene ácido sulfúrico, que puede causar quemaduras graves. En caso de contacto con los ojos, lávese inmediata y abundantemente con agua y acúdate a un médico.
- Los ácidos neutralizados y otros desechos líquidos deben descontaminarse agregando un volumen suficiente de hipoclorito de sodio para obtener una concentración final de al menos 1,0%. Puede ser necesaria la exposición a hipoclorito de sodio al 1,0 % durante 30 minutos para garantizar una descontaminación eficaz.
- Algunos reactivos contienen 0,05 % o 0,1 % de ProClin 300 que puede causar sensibilización por contacto con la piel, por lo que debe evitarse. Los reactivos y sus recipientes deben desecharse de forma segura. En caso de ingestión, acúdate inmediatamente al médico y muéstrele la etiqueta o el envase.
- El sustrato tiene un efecto irritante sobre la piel y las mucosas. En caso de posible contacto, lavar los ojos con abundante agua y la piel con jabón y abundante agua. Lave los objetos contaminados antes de reutilizarlos. Si es inhalado, lleve a la persona al aire libre.
- Para obtener información sobre las sustancias peligrosas incluidas en el kit, consulte la Hoja de datos de seguridad de materiales (MSDS), que está disponible a pedido.
- No fume, beba, coma ni se aplique cosméticos en el área de trabajo.
- No pipetear con la boca. Use ropa protectora, guantes desechables y protección para los ojos y la cara al manipular muestras y reactivos. Lávese las manos después de su uso.
- Si alguno de los reactivos entra en contacto con la piel o los ojos, lavar abundantemente la zona con agua.

Almacenamiento y Estabilidad:

- Almacenar a 2-8°C.
- Selle y devuelva los reactivos no utilizados a 2-8°C, en cuyas condiciones se mantendrá la estabilidad durante 2 meses o hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta, lo que ocurra primero.

Recolección y Preparación de Muestras:

- Se recomienda suero humano para este ensayo.
- Tapar y almacenar las muestras a 18-25°C por no más de 8 horas. Estable durante 7 días a 2-8°C y 1 mes a -20°C. Congelar una sola vez.
- No utilice muestras inactivadas por calor.
- Los sedimentos y los sólidos en suspensión en las muestras pueden interferir con el resultado de la prueba, por lo que se deben eliminar mediante centrifugación. Asegúrese de que se haya formado completamente el coágulo en las muestras de suero antes de la centrifugación.
- Evite muestras muy hemolíticas, lipémicas o turbias.

Control de Calidad:

Cada laboratorio debe tener controles de ensayo a niveles en el rango bajo, normal y elevado para monitorear el rendimiento del ensayo. Los controles deben tratarse como desconocidos y los valores deben determinarse en cada procedimiento de prueba realizado. El requisito de control recomendado para este ensayo es utilizar un control de veracidad por separado y analizarlos junto con las muestras en la misma serie. El resultado es válido si los valores de control se encuentran dentro de los rangos de concentración impresos en las etiquetas.

Solución de Lavado (Dilución 40X):

Agregue agua desionizada al concentrado de solución de lavado concentrado 40X. Diluya 25 ml de solución de lavado concentrada con 975 ml de agua desionizada hasta un volumen final de 1000 ml. Estable durante 2 meses a temperatura ambiente.

Procedimiento de Prueba:

Asegúrese de que las muestras, los calibradores y los controles de los pacientes estén a temperatura ambiente (18-25°C) antes de la medición. Mezcle todos los reactivos invirtiéndolos suavemente antes de usarlos.

- Utilice solo el número de pocillos necesarios e identifique los pocillos de las microplacas para cada calibrador y muestra que vaya a analizar.
- Agregue 25 μ L de calibradores o muestras a cada pocillo.
- Agregue 100 μ L de conjugado enzimático a cada pocillo.
- Agite suavemente la microplaca durante 30 segundos para mezclar.
- Cubra la placa con una tapa para placas e incuba a 37°C durante 60 minutos.
- Desechar el contenido de la microplaca por decantación o aspiración. Si se decanta, golpee y seque la placa con papel absorbente.
- Agregue 350 μ L de solución de lavado, decante (golpee y seque) o aspire. Repita 4 veces adicionales para un total de 5 lavados. Se puede utilizar un lavador automático de tiras de microplacas. Al final del lavado, invierta la placa y saque la solución de lavado residual sobre papel absorbente.
- Agregue 100 μ L de sustrato a cada pocillo.
- Cubra e incuba a temperatura ambiente (18-25°C) en la oscuridad para que reaccione durante 20 minutos. No agite la placa después de agregar el sustrato.
- Agregue 50 μ L de solución de parada a cada pocillo.
- Agite durante 15 a 20 segundos para mezclar el líquido dentro de los pocillos. Es importante asegurarse de que el color azul cambie a amarillo por completo.
- Lea la absorbancia de cada pocillo a 450 nm (usando de 620 a 630 nm como longitud de onda de referencia para minimizar las imperfecciones de los pocillos) en un lector de microplacas. Los resultados deben leerse dentro de los 30 minutos posteriores a la adición de la solución de parada.

Cálculo:

- Registre la absorbancia obtenida de la impresión del lector de microplacas.
- Calcule la absorbancia media de cualquier medición duplicada y utilice la media para el siguiente cálculo.
- Grafique el logaritmo común de absorbancia frente a la concentración en ng/mL para cada calibrador.
- Dibuje la curva que mejor se ajuste a través de los puntos trazados en papel cuadrículado lineal. Se sugiere el método punto a punto para generar una curva de calibración.

Limitaciones e Interferencias:

- La prueba no se ve afectada por ictericia (bilirrubina < 1000 µmol/L o < 58 mg/dL), hemólisis (Hb < 1,0 mmol/L o < 1,61 g/dL), lipemia (Intralipid < 1500 mg/dL) y biotina (< 200 nmol/L o < 49 ng/mL).
- No se observó interferencia de factores reumatoideos hasta una concentración de 1500 UI/mL.
- No hay efecto de gancho de dosis alta en concentraciones de PSA libre de hasta 5000 ng/mL.
- Se realizaron pruebas in vitro en 28 productos farmacéuticos de uso común. No se encontraron interferencias con el ensayo.
- El nivel de PSA libre por sí solo no debe utilizarse como prueba de la presencia o ausencia de una enfermedad maligna. Los resultados de la prueba deben interpretarse solo junto con otras investigaciones y procedimientos en el diagnóstico de enfermedades y el manejo de pacientes. La prueba de PSA libre no debe reemplazar ningún examen clínico establecido.
- Los calibradores del kit Free PSA ELISA no deben utilizarse para estudios de recuperación de Free PSA. Para los estudios de recuperación, se recomienda utilizar una muestra de pacientes muy elevada.
- Los pacientes que han recibido anticuerpos monoclonales de ratón para diagnóstico o terapia pueden desarrollar HAMA (anticuerpos humanos anti-ratón). HAMA puede producir valores falsamente altos o falsamente bajos en inmunoensayos que utilizan anticuerpos monoclonales de ratón. Es posible que se requiera información adicional para el diagnóstico.
- Para fines de diagnóstico, los resultados siempre deben evaluarse junto con el historial médico del paciente, el examen clínico y otros hallazgos.

Rango de Medición:

0,01-20 ng/mL (definido por el límite inferior de detección y el máximo de la curva maestra). Los valores por debajo del límite de detección inferior se notifican como < 0,01 ng/mL. Los valores por encima del rango de medición se notifican como > 40 ng/mL (o hasta 200 ng/mL para muestras diluidas 20 veces).

Límite Inferior de Detección:

0,01 ng/mL

El límite de detección representa el nivel de analito más bajo que se puede distinguir de cero. Se calcula como el valor que se encuentra dos desviaciones estándar por encima del estándar más bajo (calibrador maestro, estándar 1 + 2 SD, estudio de repetibilidad, n = 18).

Límite de blanco (LoB) y límite de detección (LoD)

LoB = 0,006 ng/mL LoD = 0,008 ng/mL

Tanto el límite de blanco como el límite de detección se determinaron de acuerdo con los requisitos EP17-A del CLSI (Instituto de estándares clínicos y de laboratorio).

El límite de blanco es el valor del 95 por ciento de n ≥ 60 mediciones de muestras sin analito en varias series independientes. El Límite de Blanco corresponde a la concentración por debajo de la cual se encuentran muestras libres de analito con una probabilidad del 95 %.

El límite de detección se determina en función del límite de blanco y la desviación estándar de las muestras de baja concentración. El Límite de Detección corresponde a la concentración de analito más baja que se puede detectar (valor por encima del Límite de Blanco con una probabilidad de 95%).

Valores Esperados:

Las mediciones de PSA libre se pueden usar junto con una prueba equimolar como PSAT ELISA (BL167733) para PSA total a fin de generar la proporción de PSA libre/PSA total. Se analizaron muestras de suero de 45 hombres diagnosticados objetivamente con hiperplasia prostática benigna (BPH) y 67 hombres diagnosticados con cáncer de próstata (PCa) usando PSAT ELISA y PSAL ELISA:

Diagnosis (n)	PSAL/PSAT			PSAL/PSAT	
	Media	Max.	Min.	Media	Int. Conf. 95%
BPH (54)	0.18	0.05	0.43	0.20	(0.17-0.23)
PCa(87)	0.09	0.02	0.55	0.11	(0.09-0.15)

La elección de un punto de corte para ser utilizado en la práctica clínica depende de la aplicación clínica, es decir, si se desea optimizar la sensibilidad o la especificidad. A continuación, se muestran las sensibilidades (% PCa detectado correctamente) y las especificaciones (% BPH detectado correctamente) para diferentes puntos de corte de la relación PSAL/PSAT:

PSAL/PSAT cut-off	Especificidad Clínica (BPH > cut-off)			Especificidad Clínica (PCa ≤ cut-off)		
	n	%	95% Confianza	n	%	95% Confianza
0.25	16 (54)	29.6	(17-45)	80(87)	92.0	(84-96)
0.15	40 (54)	74.0	(55-86)	76(87)	87.3	(75-90)
0.09	50 (54)	92.6	(83-98)	39(87)	44.8	(30-52)

Se recomienda que cada laboratorio investigue la transferibilidad de los valores esperados anteriores a su propia población de pacientes y al rendimiento del ensayo.

Datos de Rendimiento Específicos:

Los datos de rendimiento representativos se dan a continuación. Los resultados obtenidos en laboratorios individuales pueden diferir.

Precisión:

La precisión se determinó usando reactivos, sueros humanos agrupados y controles en un protocolo modificado (EP5-A) del CLSI (Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio): 2 veces al día durante 20 días (n = 40). Los siguientes resultados fueron obtenidos:

Muestra	Reproducibilidad			Precisión Intermedia		
	Media ng/mL	SD ng/mL	CV %	Media ng/mL	SD ng/mL	CV %
Suero 1	0.45	0.03	6.4	0.48	0.04	8.1
Suero 2	2.76	0.14	5.2	2.68	0.17	6.2
Suero 3	5.84	0.29	4.9	6.05	0.35	5.8
PC Universal 1	1.05	0.06	5.8	1.03	0.05	5.3
PC Universal 2	3.77	0.16	4.3	3.84	0.17	4.5

*Reproducibilidad = Precisión dentro de la ejecución.

Comparación de Métodos:

Una comparación del ensayo de PSA libre (y) con el PSA libre de Roche Cobas (x) usando muestras clínicas arrojó las siguientes correlaciones: Número de muestras medidas: 156

Regresión Lineal.

y = 0,9884x - 0,0197

r = 0,9822

Las concentraciones de la muestra estaban entre aprox. 0 y 20 ng/mL.

Especificidad Analítica:

El ELISA de PSA libre se basa en dos anticuerpos monoclonales de ratón, dirigidos contra dos epitopos distintos expuestos en PSA libre. Esta combinación de anticuerpos proporciona un ensayo específico para PSA libre que muestra < 1 % de reactividad cruzada con el complejo PSA-ACT.

Sensibilidad Funcional:

0,05 ng/mL

La sensibilidad funcional es la concentración de analito más baja que se puede medir de forma reproducible con un CV de precisión intermedia del 20 %.

Referencias:

1. Wang MC, Valenzuela LA, Murphy GP, Chu TM (1979). Purificación de un antígeno prostático específico humano. Invest Urol 17: 159-163.
2. Lilja H. (1985). Una proteasa de serina similar a la calicreína en el líquido prostático escinde la proteína predominante de la vesícula seminal. J Clin Invest 76: 1899-1903.
3. Haese A., Becker C., Diamandis E. y Lilja H., (2002) Adenocarcinoma of the Prostate In: "Tumor Markers. Fisiología, Patobiología, Tecnología y Aplicaciones Clínicas". Eds. Diamandis et al., AACC Press, Washington, págs. 193-238.
4. Lilja H., Christensson A., Dahlén U., Matikainen M-T., Nilsson O., Pettersson K., Lövgren T. (1991). El antígeno prostático específico en suero se presenta predominantemente en forma de complejo con α1-antiquimotripsina. Clin Chem 37: 1618-1625.
5. Christensson A., Björk T., Nilsson O., Dahlén U., Matikainen M-T., Cockett ATK, Abrahamsson PA, Lilja H. (1993). Antígeno prostático específico en suero complejo con α1-antiquimotripsina como indicador de cáncer de próstata. J Urología 150: 100-105.
6. Nilsson O., Peter A. Andersson I., Nilsson K., Grundström B. y Karlsson B. Determinantes antigénicos del antígeno prostático específico (PSA) y desarrollo de ensayos específicos para diferentes formas de PSA. Br J Cancer 75(6):789-797, 1997

