



ES

EIA CanAg PSA Libre

REF

350-10

IVD

CE₀₁₉₇

Instrucciones de uso. 2009-11

EN	EXPLANATION OF SYMBOLS
BG	ОБЯСНЕНИЕ НА СИМВОЛИТЕ
CS	VÝZNAM SYMBOLŮ
DA	SYMBOLFORKLARING
DE	ERKLÄRUNG DER SYMBOLE
EL	ΕΠΕΞΗΓΗΣΗ ΤΩΝ ΣΥΜΒΟΛΩΝ
ES	SIGNIFICADO DE LOS SÍMBOLOS
ET	SÜMBOLITE SELGITUS
FR	EXPLICATION DES SYMBOLES
HR	OBJAŠNJENJE SIMBOLA
HU	JELMAGYARÁZAT
IT	SPIEGAZIONE DEI SIMBOLI
LT	SIMBOLIŲ PAAIŠKINIMAI
LV	SIMBOLU SKAIDROJUMS
NL	VERKLARING DER SYMBOLEN
NO	SYMBOLFORKLARING
PL	OBJAŚNIENIE SYMBOLI
PT	EXPLICAÇÃO DOS SÍMBOLOS
RO	SEMNIȚAȚIA SIMBOLURILOR
RU	ОБОЗНАЧЕНИЯ
SE	SYMBOLFÖRKLARING
SK	VÝZNAM SYMBOLOV
SL	RAZLAGA SIMBOLOV
SR	OBJAŠNJENJE SIMBOLA
TR	SEMBOLLERİN AÇIKLAMALARI



Use By/Годно до/Použitelné do/
Holdbar til/Verwendbar bis/
Ημερομηνία λήξης/Feche
de caducidad/Kölblük kuni/
Utiliser jusque/Rok valjanosti/
Felhasználható/Utilizzare entro/
Sunautoti iki/Izlietot līdz/Houdbaar
tot/Brukes innen/Użyç przed/
Prazo de validade/Expirã la/
Использовать до/Använd före/
Použite né do/ Uporabno do/
Upotrebljivo do/Son Kullanna Tarihi

LOT

Batch code/Номер на партида/
Číslo šarže/Lotnummer/
Chargenbezeichnung/Αριθμός
Παρτίδας/Código de lote/Partii
kood/Code du lot/Kod serije/
Sarzsám/Codice del lotto/
Partijos kodus/Partijas kods/Lot
nummer/Partikode/Kod partii/
Código do lote/Număr de lot/
Номер лота/Lotnummer/Číslo
šarže/Številka serije/Kod partije/
Parti Kodu



Date of manufacture/Дата на производство/Datum výroby/
Produktionsdato/Herstellungsdatum/
Ημερομηνία παραγωγής/Fecha de fabricación/Valmistamise kuupäev/
Date de fabrication/Datum proizvodnje/
Gyártási idő/Data di produzione/
Pagaminimo data/Ražošanas datums/
Productiedatum/Fremstillingsdato/
Data produkcji/Data de fabrico/Data fabricației/Дата производства/
Tillverkningsdatum/Dátum výroby/Datum izdelave/Datum proizvodnje/Üretim tarihi



Temperature limitation/
Температурни граници/
Теплотни омеzeи/
Temperaturbegrænsning/
Temperaturbegrenzung/
Περιορισμοί θερμοκρασίας/
Limites de temperatura/
Temperatuuri piirang/
Limite de température/
Temperaturno ograničenje/
Hőmérsékletre vonatkozó korlátozás/
Limiti di temperatura/
Temperatūriniai apribojimai/
Temperatūras ierobežojums/
Temperaturbepèrking/
Temperaturbegrensninger/
Temperaturey graniczne/
Limite de temperatura/
Limite de temperatură/
Температурный режим/
Temperaturbegrænsning/
Теплотне обмеження
Omejitve temperature/
Temperaturno ograničenje/
Sıcaklık sınırlaması/

IVD

In Vitro Diagnostic Medical Device/
Медицински уред за диагностика
ин витро/Лéкаřský přístroj pro diagnostiku in vitro/Medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik/In-vitro-Diagnostikum/
Ιατροτεχνολογικό προϊόν για διάγνωση
In Vitro/Dispositivo médico para diagnóstico in vitro/In vitro diagnostiline meditsiineasead/Dispositif médical de diagnostic in vitro/Diagnostički medicinski uređaj In Vitro/In vitro orvosdiagnosztikai eszköz/Dispositivo medico per test diagnostici in vitro/In Vitro Diagnostinė Medicinos Priemonė/
Medicinska ierīce in vitro diagnostikai/
In vitro-diagnostisch medisch instrument/
In vitro diagnostisk medisinsk utstyr/
Wyrób medyczny do diagnostyki in vitro/
Dispositivo Médico de Diagnóstico In Vitro/Dispozitiv medical pentru diagnostic in vitro/Только для диагностики In Vitro/Endast för in vitro-diagnostik/
Zdravotnička pomôcka na diagnostiku in vitro/In vitro diagnostični pripomoček/
Diagnostički medicinski uređaj In Vitro/<96> testleri için yeterlilik içerir



Contains sufficient for <96> tests/Съдържа достатъчно количество за тестове <96>/Lze použít pro <96> testů/Ineholder tilstrækkeligt/Inhalt ausreichend für <96> Prüfungen/Πεξεχόμενο επαρκές για «96» εξετάσεις/Contenido suficiente para <96> ensayos/Kogusest piisab <96> testi läbiviimiseks/Contenu suffisant pour «96» tests/Sadržaj dovoljno za <96> testova/A doboz tartalma <96> vizsgálat elvégzéséhez elegendő/Contenuto sufficiente per «96» saggi/Turiny's skirtas atlikti <96> tyrimus/Saturs pietiekams <96> testiem/Inhoud voldoende voor «96» testen/til «96» test/ Tilstrækkelig innhold for <96> prøver/
Wystarczy na wykonanie <96> testów/
Conteúdo suficiente para «96» ensaios/
Conținut suficient pentru 96 de teste/
Содержит достаточные количества для «96» определений/Innehåller tillräckligt till «96» antal tester/Obsah postačuje na tento počet testov: <96>/Vsebina zadostuje za <96> testov/Sadržina dovoljna za <96> testova/<96> testleri için yeterlilik içerir

REF

Catalogue number/Каталожен номер/
Katalogové číslo/Katalognummer/
Bestellnummer/Αριθμός καταλόγου/
Número de catálogo/Katalogoi number/
Numéro de catalogue/Kataloški broj/
Katalógusszám/Numero di catalogo/
Katalogo numeris/Numurs katalogā/
Catalogusnummer/Katalognummer/
Numer katalogowy/Número do catálogo/
Număr de catalog/Номер по каталогу/
Produktnummer/Katalógové číslo/
Kataloška številka/Kataloški broj/
Katalog numarası



Consult Instructions for Use/
Прочетете инструкцията за
употреба/Konzultujte s návodem
k použití/Se brugsanvisning/Siehe
Gebrauchsanweisung/Συμβουλευτείτε
της Οδηγίες σχετικά με τη χρήση/
Consulte las instrucciones de uso/
Vt kasutusjuhendit/Consulter le mode
d'emploi/Pročítajte upute za uporabu/
Olvassa el a használati utasítást/
Consultare le istruzioni per l'uso/Dél
naudojimo žiūrėkite instrukcijas/Izlasiet
lietošanas instrukciju/Raadpleeg de
instructies voor gebruik/Les instruksene
for bruk/Sprawdzić w instrukcji użycia/
Consulte as Instruções de Utilização/
Consultați instrucțiunile de utilizare/
Обратитесь к инструкции по
применению/Se bruksanvisning/
Prečítajte si návod na používanie/
Pročitajte uputstvo za upotrebu/
Kullanım Talimatlarını Bakınız



Contents of kit/Съдържание на набора/
Obsah sady/Kittets indhold/Inhalt des
Kits/Περιεχόμενα του κιτ/Contenido
del kit/Komplekt sisaldab/Contenu du
kit/Sadržaj opreme/A készlet tartalma/
Contenuto del kit/Rinkinio turinys/
Komplekta saturs/Inhoud van de set/
Settets innhold/Zawartość zestawu/
Conteúdo do kit/Conținutul setului/
Компоненты набора/Kit innehåll/
Obsah súpravy/Vsebina kompleta/Sadržaj
opreme/Kitin içindekiler



Biological risks/Биологическа
опасност/Biológická rizika/Biologisk
fare/Biologische Gefahren/Biológikoi
kínđvnoi/Riesgos biológicos/
Biolooigilised ohud/Risques biologiques/
Biolóškli rizici/Biológiai kockázatok/Rischi
biologici/Biologinis pavojus/Biológiskais
risks/Biologische risico's/Biologiske
risikoer/Zagrozenie biologiczne/Riscos
biológicos/ Biologisk risk/Pericole
biologice/Биологическая опасность/
Biologicky rizikové/Biologické riziká/
Biolóškli rizici/Biyolojik riskler



Human/C човешки производ/Lidské/
Human/Human/δείγματα αναφοράς/
Humano/Inimpãritolu/Humaine/Ljudskog
porjekla/Humãn/Origine Umana/
Žmogaus kilmės/Cilvēku izcelsmes/
Human/Menneske/Ludzka/Humano/
Origine umãnã/Человеческого
происхождения/Human/Ludské/
Humanega izvora/Ljudskog porekla/İnsan



From mouse/C миши производ/Myši/
Fra mus/der Maus/από ποντίκι/de ratón/
Hiirtelt/De souris/Mišijeg porjekla/
Egérbõl/Murino/Pelès kilmės/No peles/
Van muizen/Fra mus/Mysia/Do rato/De
la șoareci/Мышиного происхождения/
Från mus/Myšije/Mišjega izvora/Mišijeg
porekla/Fareden



Bovine/C говежди производ/
Hovëzi/Bovin/Rind/από βοοειδή/
Bovino/Veistelt/Bovine/Rogate stoke/
Szarvasmarha/Bovina/Jauçio/No
liellopa/Bovien/Bovini/Wolowy/Bovino/
Origine bovinã/крупного рогатого
скота/Från ko/Hovëdzje/Rogaveja
izvora/Rogate krupne stoke/Bovin



Reconstitute with/Разтваряне с/
Rozfeđe pomoci/Rekonstitues med/
Rekonstituieren mit/Ανασύσταση με/
Reconstituir con/Lahjendamine/
Reconstituer avec/Rekonstituiraite s/
Feloldáshoz/Ricostituire con/LT/Atškaidīt
ar/Reconstituie me/Rekonstituerees
med/Odtworzyć za pomocą/Reconstituir
com/A se reconstitui cu/Растворить в/
Rekonstituera med/Rozriedte pomocou/
Rekonstituiraite z/s/ Ponadto formiranje
sa/Yeniden oluřturulur



Manufacturer/Производитель/Výrobce/
Producent/Hersteller/Κτασκευαστής/
Fabricante/Tootja/Fabricant/Proizvođač/
Gyártó/Fabbricante/Gamintojas/
Ražotājs/Fabrikant/Produsent/
Producent/Fabricante/Producător/
Производитель/Тилverkare/ Výrobca/
Izdevalavec/Proizvođač/Üretici

EIA CanAg PSA Libre

Instrucciones de uso

Kit de ensayo inmunométrico enzimático
Para 96 determinaciones

USO PREVISTO

El kit EIA CanAg PSA Libre está destinado a la determinación cuantitativa de PSA (antígeno prostático específico) libre en suero humano.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN DEL ENSAYO

El PSA es una glucoproteína serina proteasa monocatenaria de 32 kDa, con especificidad quimotripsinoide, producida por el epitelio secretor de la glándula prostática (1). El PSA se secreta normalmente en el líquido seminal y desempeña un papel funcional en la escisión de las proteínas de las vesículas seminales y la licuefacción del coágulo seminal (2). En el torrente circulatorio se detectan normalmente bajos niveles de PSA; el aumento de dichas concentraciones indica patología prostática, incluyendo hiperplasia prostática benigna y cáncer prostático. Actualmente la determinación del PSA se utiliza ampliamente para el diagnóstico y tratamiento de pacientes con cáncer prostático y se considera el mejor marcador serológico de este tipo de cáncer (3).

Se ha demostrado que el PSA forma complejos estables con diferentes antiproteasas, y la porción dominante del PSA en el suero de los pacientes aparece en forma de complejo con la α_1 -antiquimotripsina (PSA-ACT) (4). Sin embargo, se han observado grandes variaciones entre el PSA libre y el complejo PSA-ACT entre diferentes individuos. En varios estudios se ha observado que la proporción de PSA libre es superior en la hiperplasia prostática benigna que en el cáncer prostático (4, 5). El EIA CanAg PSA Libre es un ensayo para la determinación específica del PSA libre sin reactividad cruzada con el complejo PSA-ACT (6).

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

El EIA CanAg PSA Libre es un inmunoensayo en fase sólida no competitivo basado en la técnica de sándwich directa. Los calibradores, los controles y las muestras del paciente se incuban junto con el anticuerpo monoclonal anti-PSA libre biotinilado y el anticuerpo monoclonal anti-PSA marcado con peroxidasa de rábano (HRP) en microtiras revestidas con estreptavidina. Después del lavado, se añade reactivo tamponado sustrato/cromógeno (peróxido de hidrógeno y 3, 3', 5, 5'-tetrametilbenzidina) a cada pocillo y se deja que se produzca la reacción enzimática. Si hay antígeno, durante la reacción enzimática se desarrollará un color azul. La intensidad del color es proporcional a la cantidad de PSA libre presente en las muestras.

Dicha intensidad se determina en un espectrofotómetro de microplacas a 450 nm.

Se construyen curvas de calibración para cada ensayo representando el valor de absorbancia frente a la concentración de cada calibrador. Finalmente, se leen las concentraciones de PSA libre de las muestras de los pacientes a partir de la curva de calibración.

REACTIVOS

- Cada kit EIA CanAg PSA Libre contiene reactivos para 96 determinaciones.
- La fecha de caducidad del kit viene indicada en la etiqueta de la parte externa de la caja.
- No use el kit después de la fecha de caducidad.
- No mezcle reactivos de diferentes lotes de kits.
- Conserve el kit a una temperatura de 2 °C a 8 °C. No lo congele.
- La estabilidad de los reactivos abiertos se resume en la tabla siguiente, siempre que no estén contaminados, que se conserven en los recipientes originales nuevamente cerrados y que se manipulen como se indica. Vuelva a dejarlos a una temperatura de 2 °C a 8 °C inmediatamente después de su uso.

Componente	Cantidad	Conservación y estabilidad después de la primera apertura
------------	----------	---

MICROPLA

Microplaca	1 Placa	2–8 °C hasta la fecha de caducidad indicada en la placa
-------------------	---------	---

12 x 8 pocillos recubiertos con estreptavidina. Después de abrir el envase, devuelva inmediatamente las tiras no utilizadas a la bolsa de aluminio con desecante. Vuelva a cerrarla cuidadosamente para mantenerlas secas.

Calibradores de PSA libre	6 viales	2–8 °C hasta la fecha de caducidad indicada en los viales
----------------------------------	----------	---

CAL	PSA	0	0 µg/L	1 x 0,75 mL
-----	-----	---	--------	-------------

CAL	PSA	0,3	0,3 µg/L	1 x 0,75 mL
-----	-----	-----	----------	-------------

CAL	PSA	1	1 µg/L	1 x 0,75 mL
-----	-----	---	--------	-------------

CAL	PSA	2	2 µg/L	1 x 0,75 mL
-----	-----	---	--------	-------------

CAL	PSA	5	5 µg/L	1 x 0,75 mL
-----	-----	---	--------	-------------

CAL	PSA	10	10 µg/L	1 x 0,75 mL
-----	-----	----	---------	-------------

PSA libre humano en una solución salina tamponada con Tris-HCl que contiene albúmina sérica bovina, un colorante amarillo inerte y metilisotiazolona (MIT) al 0,01% como conservante. Listo para su uso.

Controles de PSA libre	2 viales	2-8 °C hasta la fecha de caducidad indicada en los viales
-------------------------------	----------	---

CONTROL	FPSA	1	1 x 0,75 mL
---------	------	---	-------------

CONTROL	FPSA	2	1 x 0,75 mL
---------	------	---	-------------

PSA libre humano en una solución salina tamponada con Tris-HCl que contiene albúmina sérica bovina y metilisotiazolona (MIT) al 0,01% como conservante. Listo para su uso.

Componente	Cantidad	Conservación y estabilidad después de la primera apertura
------------	----------	---

BIOTIN	Anti-FPSA
---------------	------------------

Anti-PSA libre con biotina	1 x 15 mL	2–8 °C hasta la fecha de caducidad indicada en el vial
-----------------------------------	-----------	--

Anticuerpo monoclonal anti-PSA libre de ratón marcado con biotina, aproximadamente 1,5 µg/mL. Contiene solución salina tamponada con fosfato (pH 7,2), albúmina sérica bovina, inmunoglobulina bovina, agentes bloqueantes, Tween 20, un colorante azul inerte y metilisotiazolona (MIT) al 0,01% como conservante. Listo para su uso.

CONJ	Anti-FPSA
-------------	------------------

Marcador, anti-PSA libre con HRP	1 x 0,75 mL	2–8 °C hasta la fecha de caducidad indicada en el vial
---	-------------	--

Solución de reserva de anticuerpo monoclonal anti-PSA de ratón con HRP, aproximadamente 20 µg/mL. Contiene conservantes. Para mezclar con anti-PSA libre con biotina antes de su uso.

SUBS	TMB
-------------	------------

Sustrato TMB de HRP	1 x 12 mL	2–8 °C hasta la fecha de caducidad indicada en el vial
----------------------------	-----------	--

Contiene peróxido de hidrógeno tamponado y 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB). Listo para su uso.

STOP

Solución de parada	1 x 15 mL	2–8 °C hasta la fecha de caducidad indicada en el vial
---------------------------	-----------	--

Contiene ácido clorhídrico 0,12 M. Listo para su uso.

Componente	Cantidad	Conservación y estabilidad después de la primera apertura
WASHBUF 25X		
Concentrado de lavado	1 x 50 mL	2–8 °C hasta la fecha de caducidad indicada en el frasco

Solución salina tamponada con Tris-HCl y estabilizada con Tween 20. Contiene Germall II como conservante. Para diluir con agua 25 veces antes de usar.

Indicaciones de inestabilidad

La solución de sustrato TMB de HRP debe ser incolora o ligeramente azulada. Un color azul indica que el reactivo se ha contaminado y debe desecharse.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Para uso diagnóstico in vitro.

- Sólo para uso profesional.
- Consulte la publicación número 88-8395 (CDC) del U.S. Department of Health and Human Services (Bethesda, Md., EEUU) sobre procedimientos de seguridad en el laboratorio, o la correspondiente normativa local o nacional.
- Manipule todas las muestras de pacientes como potencialmente infecciosas.
- Siga las directrices locales para la eliminación de todos los materiales de desecho.

Advertencia

Los materiales usados en la preparación del reactivo original humano han sido analizados y se ha comprobado que no reaccionan con los anticuerpos anti-VIH-1/2, el anticuerpo anti-VCH y el antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg). Puesto que ningún método puede descartar completamente la presencia de enfermedades transmitidas por la sangre, la manipulación y la eliminación de los reactivos originales humanos de este producto deben realizarse como si fueran potencialmente infecciosos.

RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

El kit EIA CanAg PSA Libre está diseñado para utilizarse con suero. Recoja la sangre mediante venopunción y separe el suero según los procedimientos habituales. Las muestras se pueden conservar entre 2 °C y 8 °C durante 24 horas y a -20 °C durante 12 meses. Para periodos más largos, guarde las muestras a -70 °C o menos. Las muestras no se guardarán en un congelador con sistema antiestancamiento. Deje que las muestras congeladas se descongelen lentamente, a ser posible entre 2 °C y 8 °C, durante una noche, y lleve las muestras a temperatura ambiente antes del análisis.

Pueden esperarse niveles altos de PSA libre después de la manipulación prostática. Por tanto, se recomienda que la sangre se extraiga antes del tacto rectal. Después de la manipulación quirúrgica de la próstata, como la biopsia con aguja o la resección transuretral, se recomienda esperar ≥ 6 semanas antes de la extracción de sangre para la determinación del PSA libre (7). Cabe tener en cuenta que se ha demostrado que el tratamiento con finasterida de la HPB reduce los niveles de PSA libre (7).

PROCEDIMIENTO

Materiales necesarios pero no suministrados con el kit

1. Agitador de microplacas

La agitación debe ser entre moderada y vigorosa. Agitación longitudinal de aproximadamente 200 golpes/min; 700-900 oscilaciones/min.

2. Lavador de microplacas

El lavador automático de placas debe ser capaz de realizar 1 y 6 ciclos de lavado con un volumen de llenado mínimo de 350 μ L por pocillo y ciclo de lavado.

Se recomienda el lavador manual de tiras Nunc Immuno-8, si no se utiliza un lavador automático de microplacas.

3. Espectrofotómetro de microplacas

Con una longitud de onda de 450 nm y un rango de absorbancia de 0 a 3,0.

4. Pipetas de precisión

Con puntas de plástico desechables para administrar volúmenes de microlitros y mililitros.

Una pipeta de 8 canales o una pipeta dispensadora con puntas de plástico desechables para la administración de 100 μ L son útiles, pero no esenciales.

5. Agua destilada o desionizada

Para la preparación de la solución de lavado.

Notas del procedimiento

1. Es necesaria la total comprensión de las instrucciones que figuran en este prospecto para garantizar un uso adecuado del kit EIA CanAg PSA Libre. Los reactivos suministrados con el kit están pensados para su uso como una unidad integral. No mezcle reactivos idénticos de kits con números de lote diferentes. No use los reactivos del kit después de la fecha de caducidad impresa en la parte exterior de la caja.
2. Debe dejarse que los reactivos alcancen la temperatura ambiente (20 °C a 25 °C) antes de su uso. El ensayo sólo debe realizarse a temperaturas de entre 20 °C y 25 °C para obtener resultados exactos. Las muestras congeladas deben llevarse a temperatura ambiente lentamente y deben mezclarse suave pero concienzudamente después de la descongelación.
3. Antes de comenzar a pipetear los calibradores, los controles y las muestras de los pacientes, es aconsejable marcar las tiras para poder identificar claramente las muestras durante y después del ensayo.
4. El requisito de un lavado eficaz y profundo para la separación del antígeno unido y no unido y los reactivos de los complejos anticuerpo-antígeno unidos a la fase sólida es uno de los pasos más importantes en un EIA. A fin de garantizar un lavado eficaz, compruebe que todos los pocillos estén totalmente llenos con solución de lavado hasta el borde superior durante cada ciclo de lavado, que la solución de lavado se administre con una velocidad de dispensación adecuada, que la aspiración de los pocillos entre y después de los ciclos de lavado sea completa y que los pocillos estén vacíos. Si queda líquido en los pocillos, invierta la placa y déle golpes suaves contra papel absorbente.
 - Lavador automático de tiras: siga las instrucciones del fabricante para efectuar una limpieza y un mantenimiento apropiados y realice el número necesario de ciclos de lavado antes y después de cada paso de la incubación. Es muy recomendable utilizar el modo de procesamiento *strip* (tira) y el modo de lavado *overflow* (desbordamiento) con un volumen de dispensación de 800 µL. El dispositivo de aspiración/lavado no debe dejarse de pie con la solución de lavado durante períodos prolongados, ya que las agujas podrían obstruirse, lo que provocaría una mala dispensación y aspiración de líquido.
5. La solución de sustrato TMB de HRP es muy sensible a la contaminación. Para una estabilidad óptima de la solución de sustrato TMB de HRP, vierta la cantidad necesaria del vial en un reservorio limpiado cuidadosamente o, mejor, a en bandeja de plástico desechable, para evitar la contaminación del reactivo. Utilice siempre puntas de pipeta de plástico desechables limpias (o puntas de pipeta dispensadora).
6. Utilice siempre puntas de pipeta de plástico desechables limpias, así como una técnica de pipeteado preciso adecuada al manipular muestras y reactivos. Evite la contaminación sujetando la punta de la pipeta ligeramente por encima de la parte superior del pocillo y evitando tocar la tira de plástico o la superficie del líquido. Usar una técnica de pipeteado adecuada es especialmente importante al manipular la solución de sustrato TMB de HRP.

Preparación de los reactivos**Estabilidad del reactivo preparado**

Solución de lavado

2 semanas a 2-25 °C en un recipiente cerrado

Vierta los 50 mL del concentrado de lavado en un recipiente limpio y diluya 25 veces añadiendo 1.200 mL de agua destilada o desionizada para conseguir una solución de lavado tamponada.

Solución de anticuerpo

3 semanas a 2-8 °C

Prepare la cantidad necesaria de solución de anticuerpo mezclando 50 µL de marcador, anti-PSA libre con HRP, con 1 mL de anti-PSA libre con biotina por tira (véase la tabla siguiente y la hoja de protocolo).

Número de tiras**Marcador, anti-PSA libre con HRP (µL)****Anti-PSA libre con biotina (mL)**

1	50	1
2	100	2
3	150	3
4	200	4
5	250	5
6	300	6
7	350	7
8	400	8
9	450	9
10	500	10
11	550	11
12	600	12

Asegúrese de usar un frasco limpio de plástico o vidrio para preparar la solución de anticuerpo.

Alternativa: vierta el contenido del marcador, anti-PSA libre con HRP, en el vial de anti-PSA libre con biotina y mezcle suavemente. Compruebe que todo el marcador se transfiera al vial de anti-PSA libre con biotina.

Nota: la solución de anticuerpo es estable durante 3 semanas a temperatura de 2 °C a 8 °C. No prepare más solución de anticuerpos que la que se usará en este período y compruebe que se conserva adecuadamente.

Hoja de protocolo

EIA CanAg PSA Libre REF **350-10**

Prepare los componentes directamente antes de utilizarlos. Use las condiciones de agitación indicadas en las instrucciones.

Paso		Procedimiento																															
1.	Prepare la solución de lavado	WASHBUF 25X	Diluya 50 mL de concentrado de lavado con 1.200 mL de agua destilada o desionizada.																														
	Prepare la solución de anticuerpos	CONJ Anti-FPSA BIOTIN Anti-FPSA	Mezcle 50 µL de marcador, anti-PSA libre con HRP, con 1 mL de anti-PSA libre con biotina por tira:																														
		<table border="1"><thead><tr><th>N.º de tiras</th><th>Marcador, HRP anti-PSA libre (µL)</th><th>Anti-PSA libre con biotina (mL)</th></tr></thead><tbody><tr><td>1</td><td>50</td><td>1</td></tr><tr><td>2</td><td>100</td><td>2</td></tr><tr><td>3</td><td>150</td><td>3</td></tr><tr><td>4</td><td>200</td><td>4</td></tr><tr><td>5</td><td>250</td><td>5</td></tr><tr><td>6</td><td>300</td><td>6</td></tr><tr><td>7</td><td>350</td><td>7</td></tr><tr><td>8</td><td>400</td><td>8</td></tr><tr><td>9</td><td>450</td><td>9</td></tr></tbody></table>	N.º de tiras	Marcador, HRP anti-PSA libre (µL)	Anti-PSA libre con biotina (mL)	1	50	1	2	100	2	3	150	3	4	200	4	5	250	5	6	300	6	7	350	7	8	400	8	9	450	9	
N.º de tiras	Marcador, HRP anti-PSA libre (µL)	Anti-PSA libre con biotina (mL)																															
1	50	1																															
2	100	2																															
3	150	3																															
4	200	4																															
5	250	5																															
6	300	6																															
7	350	7																															
8	400	8																															
9	450	9																															

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

Realice cada determinación por duplicado para los calibradores, los controles y las muestras de los pacientes. Debe elaborarse una curva de calibración con cada ensayo. Todos los reactivos y muestras deben llevarse a temperatura ambiente (20 °C a 25 °C) antes de su uso.

1. Para empezar, prepare la solución de lavado y la solución de trabajo del marcador. Es importante usar recipientes limpios. Siga las instrucciones cuidadosamente.
2. Transfiera el número necesario de tiras de microplacas a un soporte de tiras. (Devuelva inmediatamente las tiras no utilizadas a la bolsa de aluminio con desecante y vuelva a cerrarla cuidadosamente.) Lave cada tira una vez con la solución de lavado. No lave más tiras de las que puedan manejarse en 30 minutos.
3. Pipetee 50 µL de los calibradores de PSA libre (CAL 0, 0,3, 1, 2, 5, 10), los controles (C) y las muestras de los pacientes (desconocidos o "desc.") en los pocillos de tiras de acuerdo con el esquema siguiente:

	1	2	3	4	5	6	7 etc.
A	CAL 0	CAL 5	Desc. 1				
B	CAL 0	CAL 5	Desc. 1				
C	CAL 0,3	CAL 10	Desc. 2				
D	CAL 0,3	CAL 10	Desc. 2				
E	CAL 1	C1	Etc.				
F	CAL 1	C1					
G	CAL 2	C2					
H	CAL 2	C2					

4. Añada 100 µL de solución de anticuerpo a cada pocillo, usando una pipeta de precisión de 100 µL (o una pipeta de precisión de 100 µL de 8 canales). Evite la contaminación sujetando la punta de la pipeta ligeramente por encima de la parte superior del pocillo y evitando tocar la tira de plástico o la superficie del líquido.
5. Incube el marco con las tiras durante 1 hora (\pm 10 min) a temperatura ambiente (20 °C a 25 °C), con agitación constante de la placa usando un agitador de microplacas.
6. Lave cada tira 6 veces, usando el procedimiento de lavado descrito en las Notas del procedimiento, punto 4.
7. Añada 100 µL de sustrato TMB de HRP a cada pocillo usando el mismo procedimiento de pipeteado que en el punto 4. La solución de sustrato TMB de HRP debe añadirse a los pocillos con la mayor rapidez posible y el tiempo entre la adición al primer pocillo y al último no debe superar los 5 minutos.

8. Incube durante 30 min (\pm 5 min) a temperatura ambiente, agitando constantemente. Evite la luz directa del sol.
9. Añada 100 μ L de solución de parada. Mezcle y lea la absorbancia a 450 nm en un espectrofotómetro de microplacas dentro de los 15 minutos siguientes a la adición de la solución de parada.

Rango de medición

El kit EIA CanAg PSA Libre mide concentraciones entre 0,03 y 10 μ g/L. Si se esperan concentraciones de PSA por encima del rango de medición, se recomienda diluir las muestras con suero humano normal antes del análisis. **NOTA:** el suero empleado para la dilución debe medirse también para determinar la concentración de PSA libre endógeno (véase "Cálculo de los resultados").

Control de calidad

Los controles 1 y 2 de PSA libre deben utilizarse para la validación de cada serie de ensayos. Los rangos de los resultados esperados están indicados en las etiquetas de los viales. Si se obtienen valores fuera del rango especificado, deberán revisarse completamente los reactivos y el funcionamiento del lector y repetirse el análisis. Cada laboratorio puede asimismo preparar sus propios grupos de suero con diferentes niveles, que pueden utilizarse como controles internos para garantizar la precisión del ensayo.

Material de referencia

Puede emplearse como estándar de referencia el 1^{er} International Standard 96/668. Los valores de los calibradores y controles de PSA se asignaron de acuerdo con una serie de estándares de referencia internos cuyos valores son trazables hasta el 1^{er} International Standard.

CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

Si se usa un lector de espectrofotómetro de microplacas con programa de cálculo incorporado, consulte el manual del lector de placas y cree un programa usando la concentración indicada en las etiquetas de cada uno de los calibradores de PSA libre. Para el cálculo automático de los resultados de PSA libre, se recomienda usar cualquiera de los métodos siguientes:

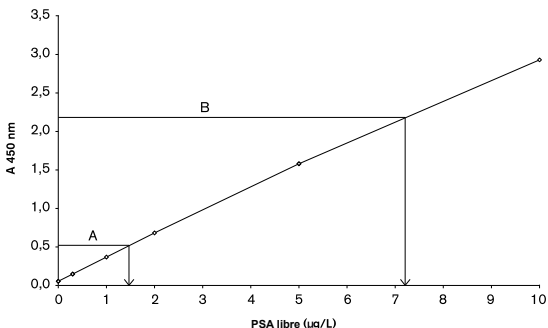
- Método de ajuste de la curva spline cúbica. El calibrador 0 debe estar incluido en la curva con el valor 0 μ g/L.
- Método de ajuste de la curva spline suavizada. El calibrador 0 debe usarse como blanco de la placa.
- Interpolación con evaluación punto a punto. El calibrador 0 debe estar incluido en la curva con el valor 0 μ g/L.
- Método de ajuste de la curva cuadrática. El calibrador 0 debe estar incluido en la curva con el valor 0 μ g/L.

Nota: no debe usarse una regresión lineal o paramétrica de grado 4.

Para la evaluación manual, se construye una curva de calibración representando los valores de absorbancia (A) para cada calibrador de PSA libre frente a la concentración de PSA libre correspondiente (en $\mu\text{g/L}$) (véase la figura más abajo). Las concentraciones de PSA libre desconocidas pueden leerse después a partir de la curva de calibración usando el valor de absorbancia medio de cada muestra de paciente.

Ejemplo de resultados

Muestra			Valores del calibrador	Valor de la abs. media (A)	PSA libre ($\mu\text{g/L}$)
CAL	PSA	0	0 $\mu\text{g/L}$	0,054	
CAL	PSA	0,3	0,3 $\mu\text{g/L}$	0,148	
CAL	PSA	1	1 $\mu\text{g/L}$	0,369	
CAL	PSA	2	2 $\mu\text{g/L}$	0,683	
CAL	PSA	5	5 $\mu\text{g/L}$	1,580	
CAL	PSA	10	10 $\mu\text{g/L}$	2,930	
Muestra A				0,522	1,480
Muestra B				2,181	7,147



Ejemplo (no use esta curva o la tabla anterior para determinar los resultados reales del ensayo).

Cálculo de resultados con muestras diluidas

Si las muestras en un análisis inicial dan valores de PSA libre superiores a 10 µg/L, deben diluirse 1/10 con suero humano normal y reanalizarse para obtener la concentración exacta de PSA libre. **NOTA:** la muestra empleada para la dilución debe medirse también para determinar la concentración de PSA libre endógeno.

La concentración de PSA libre de la muestra no diluida se calcula de la siguiente manera:

$$\text{Dilución a 1/10: } 10 \times ([\text{PSA libre}]_{\text{Muestra diluida}} - (0,9 \times [\text{PSA libre}]_{\text{Suero masculino normal}}))$$

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

No deberá utilizarse únicamente el nivel de PSA libre como signo de la presencia o ausencia de enfermedad maligna. Los resultados de la prueba sólo deben interpretarse junto con los resultados de otras investigaciones y procedimientos en el diagnóstico de las enfermedades y la asistencia a los pacientes. La prueba de PSA libre no debe sustituir a ninguna exploración clínica establecida.

Los calibradores del kit EIA CanAg PSA Libre no deben emplearse en estudios de recuperación de PSA libre. Para los estudios de recuperación se recomienda utilizar una muestra de paciente muy elevada.

Los anticuerpos anti-reactivo (anticuerpos humanos anti-ratón (HAMA) o anticuerpos heterófilos) en la muestra del paciente pueden interferir ocasionalmente con el ensayo, aunque se incluyan agentes bloqueantes específicos en el tampón.

VALORES ESPERADOS

Las determinaciones de PSA libre pueden utilizarse junto con una prueba equimolar, como el EIA CanAg PSA (340-10) para el PSA total a fin de obtener el cociente PSA libre/PSA total. Se analizaron las muestras de 52 varones diagnosticados objetivamente de hiperplasia prostática benigna (HPB) y 77 varones diagnosticados de cáncer prostático (CaP) mediante EIA CanAg PSA y EIA CanAg PSA Libre:

Diagnóstico (n)	PSA libre/PSA total			PSA libre/PSA total	
	Mediana	Mín.	Máx.	Media	(intervalo de confianza del 95%)
HPB (52)	0,18	0,04	0,42	0,19	(0,17–0,21)
CaP (77)	0,09	0,02	0,53	0,12	(0,10–0,14)

La elección de un punto de corte para su uso en la práctica clínica depende de la aplicación clínica, es decir, si se desea optimizar la sensibilidad o la especificidad. Las sensibilidades (% de CaP correctamente detectados) y las especificidades (% de HPB correctamente detectados) para diferentes puntos de corte del cociente PSA libre/PSA total se presentan a continuación:

PSA libre/ PSA total punto de corte	Especificidad clínica (HPB > punto de corte) (intervalo de confianza del 95%)			Sensibilidad clínica (CaP ≤ punto de corte) (intervalo de confianza del 95%)		
	n	%		n	%	
0.23	14 (52)	27	(16–41)	69 (77)	90	(81–95)
0.16	36 (52)	69	(55–81)	64 (77)	83	(73–91)
0.08	48 (52)	92	(81–98)	30 (77)	39	(28–51)

Se recomienda que cada laboratorio investigue la transferibilidad de los valores esperados descritos para su propia población de pacientes y rendimiento analítico (7).

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Precisión

La precisión total se calculó según la directriz EP5-A (8) del NCCLS usando 4 niveles de suero humano agrupado congelado que contenía antígeno PSA libre humano añadido y 6 combinaciones de reactivos diferentes del kit EIA CanAg PSA Libre. Cada muestra se pipeteó aleatoriamente ($n = 2/\text{análisis}$) y se analizó dos veces cada día durante 20 días.

Muestra	Duplicados	Media µg/L	Intraensayo DE (µg/L)	Intraensayo CV (%)	Interdía DE (µg/L)	Interdía CV %
PSA libre 1	80	0,38	0,01	1,9	0,01	3,0
PSA libre 2	80	1,44	0,02	1,6	0,04	2,6
PSA libre 3	80	3,46	0,05	1,6	0,08	2,3
PSA libre 4	80	6,91	0,09	1,3	0,12	1,8

Límite de detección

El límite de detección del kit EIA CanAg PSA Libre es $< 0,03 \mu\text{g/L}$, definido como la concentración correspondiente a la media de los valores de absorbancia del calibrador 0 de PSA libre más 2 desviaciones estándar, según la fórmula:

$$\frac{2 \times \text{DE CAL 0}}{\text{DO CAL 0,3} - \text{DO CAL 0}} \times 0,3 \mu\text{g/L}$$

Recuperación

Se prepararon muestras de suero enriquecidas añadiendo alícuotas de muestras con PSA libre alto a muestras de suero normales de varón. La recuperación del antígeno estuvo en \pm el 15% de los valores esperados. **Nota: no** se realizaron estudios de recuperación con los calibradores del kit.

Efecto de gancho

No se ha observado efecto de gancho con muestras hasta de 5.000 µg/L.

Linealidad

Se diluyeron de forma seriada las muestras de los pacientes con suero humano normal de varones y se analizaron.

Los valores obtenidos estuvieron en \pm el 10% de los valores esperados.

Especificidad

El EIA CanAg PSA Libre se basa en dos anticuerpos monoclonales de ratón, PSA30 y PSA66, dirigidos contra dos epítopos distintos expuestos en PSA libre. Esta combinación de anticuerpos representa un ensayo específico para el PSA libre con una reactividad cruzada $< 1\%$ con el complejo PSA-ACT(6). Se siguió la directriz EP7-P (9) del NCCLS para determinar posibles fuentes de interferencia. Se estudiaron las siguientes sustancias y concentraciones y se observó que no interfieren con la prueba.

	Concentración sin interferencia significativa ($\pm 10\%$)
Lipemia (Intralipid®)	10 mg/mL
Bilirrubina no conjugada	0,4 mg/mL
Hemoglobina	5 mg/mL

Comparación de métodos

El EIA CanAg PSA Libre (n.º prod. 350-10) se comparó con el EIA CanAg PSA de dos etapas (330-10). Se determinaron 127 muestras de suero de varones con valores que oscilaron entre 0 y 9 µg/L y los análisis de regresión lineal de los resultados dieron:

$$[\text{PSA libre}]_{\text{N.º prod. 350-10}} = 1,02 \times [\text{PSA libre}]_{\text{N.º prod. 330-10}} - 0,06 \quad r = 0,99$$

GARANTÍA

Los datos de rendimiento aquí presentados se obtuvieron usando el procedimiento de ensayo indicado. Cualquier cambio o modificación del procedimiento no recomendado por Fujirebio Diagnostics puede afectar a los resultados, en cuyo caso Fujirebio Diagnostics rechaza todas las garantías expresas, implícitas u obligatorias, incluida la garantía implícita de comerciabilidad e idoneidad para el uso.

BIBLIOGRAFÍA

1. Wang MC, Valenzuela LA, Murphy GP, Chu TM (1979). Purification of a human prostate specific antigen. *Invest Urol* 17: 159–163.
2. Lilja H. (1985). A kallikrein-like serine protease in prostatic fluid cleaves the predominant seminal vesicle protein. *J Clin Invest* 76: 1899–1903.
3. Haese A., Becker C., Diamandis E., and Lilja H., (2002) Adenocarcinoma of the Prostate In: „Tumor Markers. Physiology, Pathobiology, Technology, and Clinical applications“. Eds. Diamandis et al., AACCC Press, Washington, pp. 193-238.
4. Lilja H., Christensson A., Dahlén U., Matikainen M-T., Nilsson O., Pettersson K., Lövgren T. (1991). Prostate-specific antigen in serum occurs predominantly in complex with α_1 -antichymotrypsin. *Clin Chem* 37: 1618–1625.
5. Christensson A., Björk T., Nilsson O., Dahlén U., Matikainen M-T., Cockett ATK, Abrahamsson PA, Lilja H. (1993). Serum prostate specific antigen complexed to α_1 -antichymotrypsin as an indicator of prostate cancer. *J Urology* 150: 100–105.
6. Nilsson O., Peter A. Andersson I., Nilsson K., Grundström B., and Karlsson B. Antigenic determinants of prostatespecific antigen (PSA) and development of assays specific for different forms of PSA. *Br J Cancer* 75(6):789–797, 1997.
7. Price C. P., Allard J., Davies G., Dawney A., J Duffy M., France M., Mandarin G., Milford Ward A., Patel B., Sibley P. and Sturgeon C. (2001) Pre-and post-analytical factors that may influence use of serum prostate specific antigen and its isoforms in a screening programme for prostate cancer. *Ann Clin Biochem*; 38: 188–216.
8. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices. Approved Guideline EP5-A (1999).
9. National Committee for Clinical Laboratory Standards, National Evaluation Protocols for Interference Testing, Evaluation protocol Number 7, Vol. 6, No 13, August (1986).



CanAg[®] es una marca registrada de Fujirebio Diagnostics AB

Fujirebio Diagnostics AB

Elof Lindälv's gata 13

SE-414 55 Gotemburgo

Suecia

Teléfono + 46 31 85 70 30

Fax + 46 31 85 70 40

info@fdab.com

www.fdab.com

