

FINALIDADE

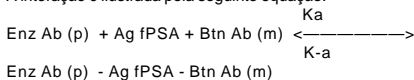
Teste para determinação quantitativa da concentração de Antígeno Específico Prostático Livre (fPSA) em soro humano por ensaio enzimaimunoensaio em microplaca. Somente para uso diagnóstico *in vitro*.

PRINCÍPIO DA AÇÃO

Metodologia: Enzimaimunoensaio ou imunoenzimétrica.

Nesta metodologia, a amostra do paciente ou controle é primeiramente adicionada a uma microcavidade revestida com estreptavidina. Em seguida, adiciona-se o Conjugado Enzimático Policlonal e Anticorpos Biotina monoclonal (diretamente contra epitopos diferentes e distintas de fPSA) e a reação é homogeneizada. A reação entre os vários anticorpos de PSA e as formas nativas de PSA formam um complexo sanduíche que se liga com a estreptavidina que reveste a microcavidade.

A interação é ilustrada pela seguinte equação:



Onde:

Btn Ab (m) = Anticorpo monoclonal biotilado

(Quantidade em excesso)

Ag fPSA = Antígeno nativo (Quantidade variável)

Enz Ab (p) = Anticorpo policlonal marcado com enzima (Quantidade em excesso)

Enz Ab (p) - Ag fPSA - Btn Ab (m) = Complexo Sanduíche antígeno-anticorpo

Ka = razão constante de associação

K-a = razão constante de dissociação

Após completado o período de incubação exigido, o conjugado anticorpo-enzima-fPSA é separado do conjugado enzima-fPSA solto por aspiração ou decantação. A atividade da enzima presente na superfície da microcavidade é quantificada pela reação com um substrato próprio para produzir cor.

O uso de vários padrões de referência com vários níveis de antígeno prostático específico (fPSA) permite a construção de uma curva dose-resposta de atividade e concentração. Da comparação da curva, uma atividade de amostra desconhecida pode ser encontrada com concentração de PSA.

REAGENTES

1- Padrões de referência (A - F)

Seis (6) frascos (A-F) de Padrões de referência contendo antígeno de PSA Livre (fPSA) em diferentes concentrações, em solução de tampão pH 7,4 e azida sódica.

A= 0,0 ng/mL

B= 0,5 ng/mL

C= 1,0 ng/mL

D= 2,5 ng/mL

E= 5,0 ng/mL

F= 10,0 ng/mL

2- Enzima-Conjugado fPSA (E)

Anticorpo marcado com enzima, IgG monoclonal de rato biotilado, corante e azida sódica. Armazenar a 2-8°C.

3- Placa Revestida de Estreptavidina (↓)

Estocar entre 2 e 8°C.

4- Solução de lavagem concentrada (♠)

Solução de fosfato salina pH 7,4 e azida sódica. Estocar entre 2 e 30°C.

5- Substrato A (S^A)

Tetrametilbenzidina (TMB). Estocar entre 2 e 8°C.

6- Substrato B (S^B)

Solução de Peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Estocar entre 2 e 8°C.

7- Solução de parada (P)

Ácido Clorídrico (HCl) 1N. Estocar entre 2 e 30°C.

APRESENTAÇÃO

| REAGENTES | 96 TESTES |
|--|--------------------------|
| 1- Padrões de Referência | 6 Frascos (A-F) x 1,0 mL |
| 2- Enzima-Conjugado fPSA | 1 Frasco x 13 mL |
| 3- Placa sensibilizada acondicionada em embalagem de alumínio, com sílica (anti-umidade) | 1 x 96 poços |
| 4- Solução de lavagem Concentrada | 1 Frasco x 20 mL |
| 5- Substrato A | 1 Frasco x 7 mL |
| 6- Substrato B | 1 Frasco x 7 mL |
| 7- Solução de parada | 1 Frasco x 8 mL |

EQUIPAMENTOS E INSUMOS OPERACIONAIS

Materiais contidos no Kit:

-Reagentes descritos no quadro anterior,

-Instruções de uso (manual).

Materiais necessários, mas não contidos no kit:

- 1) Pipeta(s) com capacidade de dispensar volumes de 50 µl, com precisão maior que 1,5%.
- 2) Repipetador(es) para dispensagens repetitivas de volumes de 100 µl e 300 µl, com precisão maior que 1,5% (opcional) ou pipeta multicanal.
- 3) Lavadora de microplaca (opcional) ou pipetas para lavagem das microcavidades.
- 4) Leitora de ELISA com capacidade de absorvância em 450 / 630 nm de comprimento de onda.
- 5) Pipetas com volumes reguláveis (200 µl a 1000 µl) para diluição do Substrato.
- 6) Tubos de ensaio para a diluição do Substrato A e B.
- 7) Papel absorvente para secar as microcavidades.
- 8) Embalagem plástica ou cobertura de microplaca para os passos de incubação.
- 9) Cronômetro ou relógio.
- 10) Frasco para estocar a solução de lavagem.
- 11) Água destilada ou deionizada.
- 12) Ferramentas de Controle de Qualidade.

CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO E TRANSPORTE

A temperatura de armazenamento deverá ser de 2 a 8°C. O transporte em temperaturas entre 15 e 30°C não deverá exceder a 72 (setenta e duas) horas. Não congelar. Manter ao abrigo da luz e evitar umidade.

CUIDADOS ESPECIAIS

- 1 - Somente para uso diagnóstico *in vitro*;
- 2 - Seguir com rigor a metodologia proposta para a obtenção de resultados exatos;
- 3 - Recolocar as tiras de microcavidades não utilizadas no invólucro de alumínio, vedar e estocar a 2-8°C.
- 4 - A água utilizada na limpeza do material deve ser recente e isenta de contaminantes;
- 5 - Colunas deionizadoras saturadas liberam água alcalina, íons diversos e agentes oxidantes e redutores, que podem alterar de forma significativa os resultados;
- 6 - O descarte do material utilizado deverá ser feito obedecendo-se os critérios de biossegurança de acordo com a legislação vigente.
- 7 - Toda matéria-prima do produto é testado e deve ser não reagente para HBsAg, Anti-HIV 1&2 e Anti-HCV. Entretanto, esses testes não oferecem total segurança da ausência de agentes infecciosos. A manipulação manual de todo produto que contém soro humano é potencialmente capaz de transmitir doenças. Portanto, é preciso tomar os devidos cuidados de biossegurança na manipulação desses produtos.
- 8 - Pipetar os reagentes sempre na mesma ordem para minimizar a diferença de tempo de reação entre as microcavidades.
- 9 - Por medida de proteção, pode-se cobrir a placa durante a reação. Caso opte por este procedimento, é necessário que seja estabelecido como rotina.

AMOSTRAS

As precauções e tipos usuais de punção venosa devem ser observadas na coleta das amostras. Para melhor parâmetro de comparação com valores normais, colher a amostra à primeira hora da manhã. Colher em tubo sem aditivos. Separar as células vermelhas por centrifugação e usar o soro obtido para o ensaio de PSA LIVRE.

Amostra(s) hemolizadas ou altamente lipêmicas não devem ser usadas.

As amostras podem ser conservadas sob refrigeração, entre 2 e 8°C, pelo período máximo de cinco (5) dias. Se as amostras não puderem ser analisadas dentro de cinco dias, podem ser estocadas por até 30 dias a temperatura de -20°C (freezer). Se o ensaio for feito em duplicata, o volume necessário de amostra é de 0,100 mL.

DESCRIÇÃO DO PROCESSO

PREPARO DOS REAGENTES DE TRABALHO

1) Solução de lavagem:

Diluir o conteúdo do frasco n° 4 (Solução de Lavagem Concentrada (S)) em 1000 mL de água destilada ou deionizada. Estocar em temperatura ambiente até a validade impressa no frasco original.

2) Substrato – Solução de trabalho

Determinar a quantidade necessária de cavidades a serem utilizadas para preparo de uma quantidade adequada. Preparar a solução misturando partes iguais de Substrato A e Substrato B.

Para cada microcavidade (teste):

50 µl de Substrato A + 50 µl de Substrato B

Por exemplo: misture 1 mL de Substrato A e 1 mL de Substrato B para duas tiras de 8 microcavidades (16 testes).

PREPARAR IMEDIATAMENTE ANTES DO USO.

Usar no máximo, até uma (1) hora após preparo.

TÉCNICA

Antes de começar o ensaio, colocar todos os reagentes, amostras, padrões de referência e controles para estabilizarem em temperatura ambiente (15 - 30 °C).

- 1) Separar as microcavidades a serem utilizadas considerando: Padrões, controles e amostras (podendo ser testados em duplicata.)
- 2) Dispensar 0,050 mL (50 µl) do padrão apropriado, controle e amostra em suas respectivas microcavidades.
- 3) Adicionar 0,100 mL (100 µl) do reagente Enzima fPSA em cada microcavidade. Homogeneizar a placa por 20 a 30 segundos para misturar. Cobrir.
- 4) Incubar por 60 minutos em temperatura ambiente
- 5) Descartar o conteúdo das microcavidades por aspiração (Lavadora), ou decantação;
- 6) Pipetar aproximadamente 300 µl de solução de lavagem **previamente preparada** em todas as microcavidades. (Vide PREPARO DOS REAGENTES DE TRABALHO).
- Decantar ou aspirar (lavadora), para um total de cinco (5) ciclos de lavagem. Para a garantia da secagem da placa, bater em papel absorvente.
- 7) Pipetar 0,100 mL (100 µl) do Substrato **previamente preparado** em todas as microcavidades. (Vide PREPARO DOS REAGENTES DE TRABALHO).
- 8) Incubar por quinze (15) minutos em temperatura ambiente, ao abrigo da luz.
- 9) Pipetar 0,050 mL (50 µl) de solução de parada em todas as microcavidades. Homogeneizar gentilmente por 15 a 20 segundos.
- 10) Ler a absorvância de cada microcavidade em 450/630 nm em uma leitora de ELISA. Os resultados podem ser lidos em até trinta (30) minutos após a adição da solução de parada.

DESCRIÇÃO DOS CÁLCULOS

Uma curva de calibração é utilizada para determinar a concentração de PSA livre das amostras.

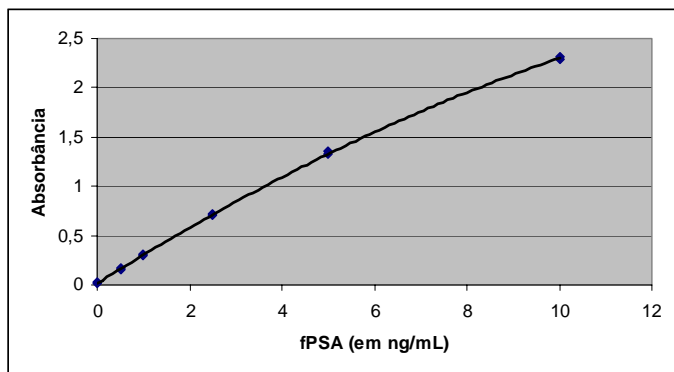
Registrar a absorvância obtida na leitora de microplaca como discriminado no Exemplo 1.

Plotar as absorvância de padrões de referência versus a concentração de fPSA correspondente em ng/mL em papel milimetrado (não fazer a média das referências antes de traçar a curva).

EXEMPLO 1

| Identificação | Cavidade | Abs | Média Abs | Valor ng/mL |
|---------------|----------|-------|-----------|-------------|
| A | A1 | 0,019 | 0,020 | 0 ng/mL |
| | B1 | 0,022 | | |
| B | C1 | 0,167 | 0,164 | 0,5 ng/mL |
| | D1 | 0,161 | | |
| C | E1 | 0,300 | 0,302 | 1,0 ng/mL |
| | F1 | 0,304 | | |
| D | G1 | 0,701 | 0,707 | 2,5 ng/mL |
| | H1 | 0,714 | | |
| E | A2 | 1,353 | 1,337 | 5,0 ng/mL |
| | B2 | 1,321 | | |
| F | C2 | 2,286 | 2,3 | 10,0 ng/mL |
| | D2 | 2,314 | | |

Os dados apresentados no Exemplo 1 e Figura 1 são somente para ilustrar e **não devem** ser usados em lugar da curva de calibração preparada para cada teste.



LIMITAÇÃO DO PROCESSO

A. Performance do ensaio

É importante que o tempo de reação em cada microcavidade seja observado constantemente para a reprodução dos resultados. Pipetar as amostras não deve levar mais que 10 (dez) minutos para evitar desvio do teste. Se mais de 1 (uma) placa for usada, é recomendável repetir a curva dose-resposta. A adição da solução de substrato inicia uma reação cinética, a qual se finda com a adição da solução de parada. Entretanto, a adição do substrato e da solução de parada deve ser processada na mesma seqüência para eliminar qualquer desvio de tempo durante a reação.

Leitoras de Elisa medem verticalmente. Não tocar na base das microcavidades.

Amostras de paciente com concentração de fPSA acima de 100 ng/mL devem ser diluídas (por exemplo 1/10 ou mais) com soro feminino normal (PSA = 0 ng/mL) e re-testadas. A concentração de amostra é obtida multiplicando-se o resultado pelo fator de diluição (10).

B. Interpretação

Se for usado um programa de computador para interpretar os resultados do teste, é necessário que o valor dos calibradores caia dentro de 10% das concentrações assinaladas.

Um valor de fPSA é elevado no início da hiperplasia benigna da próstata. Clinicamente, um valor elevado de fPSA isolado não contém um valor diagnóstico para um teste específico de diagnóstico diferencial de hiperplasia benigna e de câncer de próstata. A relação fPSA/PSA é um marcador melhor e deve ser utilizado em conjunto com outras observações clínicas e procedimentos diagnóstico (biópsia da próstata).

Quando o valor de PSA total estiver entre 4-10 ng/mL a relação fPSA/PSA é útil no diagnóstico diferencial da hiperplasia benigna de próstata e o câncer prostático. Dependendo da relação a probabilidade pode ser determinada conforme a tabela a seguir:

$$\frac{fPSA \times 100}{PSA \text{ TOTAL}} \%$$

| Relação fPSA/PSA | Probabilidade de câncer |
|------------------|-------------------------|
| 0 - 10% | 55% |
| 10 - 15% | 28% |
| 15 - 20% | 25% |
| > 20% | 10% |

CONTROLE INTERNO DE QUALIDADE

Cada laboratório deve testar os controles em níveis baixo, normal e elevado para monitorar o desempenho do teste. Estes controles devem ser tratados como amostras e os valores determinados em todo o procedimento do teste.

Parâmetros do Controle de Qualidade

A absorbância D.O do calibrador F deve ser $\geq 1,3$

VALORES DE REFERÊNCIA

Valores Normais para o Kit BIOLISA fPSA

Homens saudáveis $\leq 1,3$ ng/mL.

DESEMPENHO DO PRODUTO

Exatidão

COMPARAÇÃO DE MÉTODOS E ESPECIFICIDADE METODOLÓGICA

O BIOLISA- PSA LIVRE foi comparado com outro método ELISA disponível comercialmente.

Foram utilizadas 48 amostras de população com história clínica e não clínica em concentrações baixa, normal e elevada. A equação de regressão linear encontrada foi $y = 0,968x + 0,0599$ e o coeficiente de correlação 0,9902.

Com estes resultados pode-se concluir que o kit apresenta boa especificidade metodológica.

Precisão

REPETIBILIDADE

Foram realizadas 20 dosagens consecutivas com 3 amostras, obtendo-se os seguintes resultados:

| | Amostra 1 | Amostra 2 | Amostra 3 |
|------------------------------|-----------|-----------|-----------|
| Concentração (ng/mL) | 0,62 | 6,94 | 13,73 |
| Desvio Padrão (ng/mL) | 0,02 | 0,30 | 0,54 |
| Coefficiente de Variação (%) | 3,91 | 4,38 | 3,93 |

REPRODUTIBILIDADE

Foram realizadas 20 dosagens sucessivas com três amostras, durante 3 dias consecutivos, obtendo-se os seguintes resultados :

| | Amostra 1 | Amostra 2 | Amostra 3 |
|------------------------------|-----------|-----------|-----------|
| Concentração (ng/mL) | 0,64 | 6,98 | 14,03 |
| Desvio Padrão (ng/mL) | 0,03 | 0,20 | 0,28 |
| Coefficiente de Variação (%) | 4,13 | 2,84 | 2,02 |

Sensibilidade

A sensibilidade teórica ou o valor mínimo de detecção calculado pela interpolação da média mais três desvios padrão ou 20 replicatas do padrão PSA 0 ng/mL é de 0,052 ng/mL.

Linearidade

A reação é linear até a concentração do ponto mais alto da curva de calibração. Para amostras com valores superiores, diluir a mesma com Cloreto de Sódio 0,85%, repetir a dosagem e multiplicar o resultado obtido pelo fator de diluição.

Especificidade

As substâncias a seguir não interferem com o desempenho da determinação de fPSA. Estas substâncias foram adicionadas a um "pool" de soros em concentrações 10-100 vezes acima do normal.

| Composto | Concentração Adicionada |
|------------------------|-------------------------|
| AFP | 10 µg/mL |
| Atropina | 100 µg/mL |
| Ácido acetilsalicílico | 100 µg/mL |
| Ácido ascórbico | 100 µg/mL |
| Caféina | 100 µg/mL |
| Dexametasona | 10 µg/mL |
| Flutamida | 100 µg/mL |
| hCG | 100 µg/mL |
| hLH | 100 µg/mL |
| Methotrexate | 100 µg/mL |
| Prolactina | 100 µg/mL |
| TSH | 100 µg/mL |

SIGNIFICADO CLINICO

O PSA é liberado da próstata normal e aparece em concentrações baixas no soro de homens saudáveis. Estudos com transcriptase reversa PCR demonstraram que o PSA também está expresso em baixas concentrações nas células do sangue periférico e de outros tecidos (4). Concentrações altas podem ser detectadas em pacientes com câncer de próstata avançado (5). Portanto, o PSA é aplicado como marcador tumoral para o monitoramento clínico de câncer de próstata avançado (6). No entanto, concentrações aumentadas de PSA no soro também ocorrem em pacientes com hiperplasia benigna da próstata (7). Logo, o objetivo é diferenciar claramente entre a hiperplasia benigna de próstata e o câncer avançado de próstata no laboratório clínico para poupar os pacientes de procedimentos de diagnóstico invasivos, tais como, uma biópsia da próstata.

No soro humano o PSA ocorre em duas formas: PSA livre (fPSA) e PSA complexado. A maior forma é a complexa do PSA e α 1-antiquimiotripsina (ACT). A fração de fPSA demonstrou ser substancialmente menor em pacientes com câncer de próstata avançado que em pacientes com hiperplasia benigna de próstata. Portanto, doseamentos combinados de fPSA e PSA Total (tPSA) podem levar a uma melhor discriminação entre a hiperplasia benigna e o câncer avançado de próstata. Alguns estudos mais recentes também demonstraram que a relação fPSA/tPSA é útil no diagnóstico diferencial entre a hiperplasia benigna e o câncer avançado de próstata.

O PSA foi encontrado em câncer de próstata metastático, maligno e benigno. Sendo o câncer da próstata a segunda maior doença maligna masculina, a detecção de níveis elevados de PSA é considerada de grande importância no diagnóstico precoce. Os níveis de PSA do soro têm sido usados em maior escala do que a Fosfatase Ácida Prostática (PAP) no diagnóstico e tratamento de pacientes devido à sensibilidade aumentada (4).

NÚMERO DE TESTES

96 TESTES

BIBLIOGRAFIA

- Christensson A., Laurell C.B., Lilja H., Eur J. Biochem, 194, 755-63 (1990).
- Watt K.W., et al., Proc Nat Acad Sci USA, 83, 3166-70 (1986).
- Chem Z., Prestigiacomo A., Stamey T., Clin Chem., 41, 1273-82 (1995).
- Wild D., The Immunoassay Handbook, Stockton Press (1994) p452.
- Junker R., Brandt B., Zechel C., Assmann G., Clin Chem., 43, 1588-94 (1997).
- Prestigiacomo AF, Stamey TA. Physiological variations of serum prostate antigen in the (4-10 ng/mL) range in male volunteer. J. Urol. 1996; 115: 1977-80.
- Stamey TA, McNeal JE, Yemoto CM, Sigal BM, Johstone IM. Biological determinants of cancer progression in men with prostate cancer. JAMA 1999; 281: 1395-1400.
- Chen Z, Prestigiacomo A, Stamey T. Purification and characterization of Prostate Specific Antigen (PSA) Complexed to Alfa-1 Anticymotrypsin Potencial Reference Material for International Standardization of PSA ImmunoAssays. Clin. Chem. 1995; 419: 1273-1282.
- Hotton GL, Bahson RR Datt M, Cfnam KM, Catalone WJ and Landenson JH. Differences in values obtained with two assays of Prostate Specific Antigen. J. Uro., 1988, 139: 762-72.
- Stenman UH, Leinonen J, Aftah H, Ranniko S, Tuhtanen K and Aftahan O. A complex between prostatic specific antigen and alfa-1-anticymotrypsin is the major form of prostate specific antigen in serum of patients with prostate cancer; assay of complex improves clinical sensitivity for cancer. Cancer Res. 1991. 51:222-26.

GARANTIA DE QUALIDADE

Antes de serem liberados para consumo, todos os reagentes **Bioclin** são testados pelo Departamento de Controle de Qualidade. A qualidade dos reagentes é assegurada até a data de validade mencionada na embalagem de apresentação, desde que armazenados e transportados nas condições adequadas.

DADOS DO FABRICANTE

QUIBASA QUÍMICA BÁSICA Ltda
Rua Teles de Menezes, 92 - Santa Branca
CEP 31565-130 - Belo Horizonte - MG - Brasil
Tel.: (31) 3439.5454 - Fax (31) 3439.5455
e-mail bioclin@bioclin.com.br
CNPJ: 19.400.787/0001-07 - Indústria Brasileira

ATENDIMENTO AO CONSUMIDOR

Serviço de Assessoria ao Cliente Tel.: 0800 0315454.
e-mail: sac@bioclin.com.br

ANVISA: 10269360169

Revisão: Abril/09