

Bioclin

BIOLISA PSA TOTAL

K096

INSTRUÇÕES DE USO

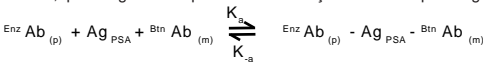
FINALIDADE

Teste para determinação quantitativa de Antígeno Específico de Próstata Total (PSA), em soro humano, por Enzimaimunoensaio em Microplaca.

PRINCÍPIO DE AÇÃO

Metodologia: Enzimaimunoensaio ou imunoenzimétrico

Nesta metodologia, o calibrador de PSA, amostra de paciente ou controle, é primeiramente pipetado a uma microcavidade revestida com streptavidina. Anticorpos monoclonais biotinizados e anticorpos conjugados a enzimas (diretamente contra epitópos diferentes e distintos de PSA) são adicionados e misturados. A reação entre os vários anticorpos anti-PSA e o PSA natural formam um complexo sanduíche solúvel, que se ligam a streptavidina. A interação é ilustrada pela seguinte equação:



Onde:

${}^{\text{Biot}}\text{Ab}_{(\text{m})}$ = Anticorpo monoclonal biotinizado (Quantidade excessiva)

Ag_{PSA} = Antígeno nativo (Quantidade variável)

${}^{\text{Enz}}\text{Ab}_{(\text{p})}$ = Anticorpo policlonal marcado com enzima (Quantidade excessiva)

${}^{\text{Enz}}\text{Ab}_{(\text{p})} - \text{Ag}_{\text{PSA}} - {}^{\text{Biot}}\text{Ab}_{(\text{m})}$ = Complexo Sanduíche antígeno-anticorpo

K_{+a} = razão constante de associação

K_{-a} = razão constante de dissociação

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

O uso de várias referências de padrões de variáveis níveis de antígeno Prostático específico (PSA) permite a construção de uma curva de atividade e concentração. Da comparação da curva, a concentração de PSA de uma amostra desconhecida pode ser encontrada.

REAGENTES

REAGENTES (KIT PARA 96 TESTES)

1) Padrões referência (A – F)

Seis (6) frascos (A – F) de Padrões referência de antígeno PSA em diferentes concentrações, em solução de tampão pH 7,4 e azida sódica:

A= 0,0 ng/mL

B= 5 ng/mL

C= 10 ng/mL

D= 25 ng/mL

E= 50 ng/mL

F= 100 ng/mL

2) Conjugado (E)

Anticorpo-enzima, Antígeno IgG de rato biotinizado em tampão, corante e conservante. Armazenar a 2-8 °C.

3 - Placa Sensibilizada (↓)

Estocar entre 2 e 8° C.

4 - Lavagem concentrada (♣)

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

5 - Substrato A (S[▲])

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

6 - Substrato B (S[●])

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

7 - Solução de parada

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

APRESENTAÇÃO

REAGENTES	96 TESTES	192 TESTES
1 - Padrões Referência	6 Frascos A-F x 1,0 mL	6 Frascos A-F x 1,0 mL
2 - Conjugado	1 Frasco x 13 mL	2 Frascos x 13 mL
3 - Placa sensibilizada	1 Placa 96 testes	2 Placas x 96 testes
4 - Lavagem Concentrada	1 Frasco x 20 mL	1 Frasco x 20 mL
5 - Substrato A	1 Frasco x 7 mL	2 Frascos x 7 mL
6 - Substrato B	1 Frasco x 7 mL	2 Frascos x 7 mL
7 - Solução de Parada	1 Frasco x 8 mL	2 Frascos x 8 mL

EQUIPAMENTOS E INSUMOS OPERACIONAIS

Materiais e insumos operacionais

- 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 25 µL e 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, ions 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 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

O sangue deve ser coletado em tubo venal sem aditivos ou barreira de gel. Deixar o sangue coagular. Centrifugar a amostra para separar o soro das células.

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

As amostras devem ser de soro ou plasma e as precauções e tipos usuais de punção venosa devem ser observadas na coleta. Para uma comparação acurada de valores estabilizados normais, a amostra de soro deve ser obtida pela manhã. As amostras podem ser conservadas sob refrigeração, entre 2 e 8°C pelo período máximo de 5 (cinco) dias. Se as amostras não puderem ser analisadas nesse período, congelar e armazenar a temperatura de -20°C por até 30 dias. Evitar congelamento e descongelamento repetitivos. Quando o teste for duplicado, é necessário 0,050 mL de amostra.

DESCRIÇÃO DO PROCESSO

PREPARO DOS REAGENTES DE TRABALHO

1) Solução de lavagem:

Diluir o conteúdo do frasco nº 4 (Lavagem Concentrada (♣)) 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, soros de referência (padrões) 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 0,025 mL (25 µL) dos padrões, controle e amostra em suas respectivas microcavidades.
- 3) Pipetar 0,100 mL (100 µL) do Conjugado enzima-anticorpo biotinizado em todas as microcavidades. Homogeneizar gentilmente por 20 a 30 segundos
- 4) Incubar por 30 minutos à 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 usada para determinar a concentração de PSA em amostras desconhecidas (pacientes).

Preparo da curva de calibração

Para determinar a concentração de PSA para cada amostra desconhecida, colocar a média das absorvâncias das duplicadas de cada amostra desconhecida no eixo vertical do gráfico (papel milimetrado). Encontrar o ponto de interseção na curva, e ler a concentração (em ng/mL) no eixo horizontal do gráfico (as duplicadas desconhecidas podem ser medidas como indicado). No exemplo a seguir, a média de absorvância (1,142) intercepta a curva-padrão (23,6 ng/mL) com a concentração de PSA. (Ver Figura 1).

EXEMPLO 1

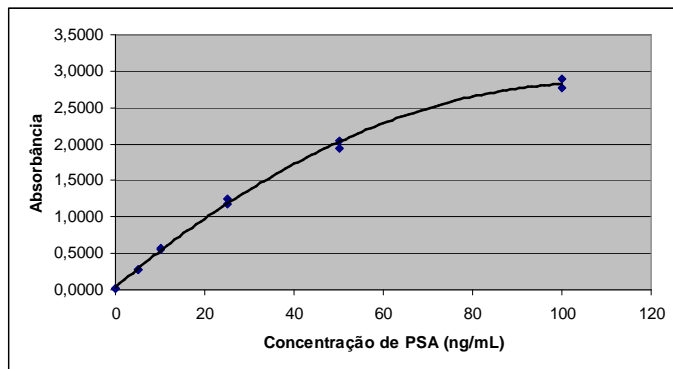
Padrões	Microcavidade	Absorvância
A (0 ng/mL)	1	0,019
	2	0,019
B (5,0 ng/mL)	3	0,279
	4	0,273
C (10,0 ng/mL)	5	0,567
	6	0,559
D (25,0 ng/mL)	7	1,248
	8	1,179
E (50,0 ng/mL)	9	2,051
	10	1,947
F (100,0 ng/mL)	11	2,892
	12	2,775

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

Parâmetros do Controle de Qualidade:

Absorbância Máxima (250 ng/mL) = > 1,5

Figura 1



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 resposta da curva-padrão. A adição da solução de substrato inicia uma reação cinética, a qual se finda com a adição da solução Stop. Entretanto, a adição do substrato e da solução Stop deve ser processada na mesma sequência para eliminar qualquer desvio de tempo durante a reação.

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

Falhas no processo de lavagem podem gerar resultados incorretos.

Amostra(s) hemolisadas ou altamente lipimizadas não devem ser usadas similarmente.

Amostras de paciente com concentração de PSA acima de 100 ng/mL devem ser diluídas (por exemplo 1/10 ou maior) 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).

Cada componente em um teste deve ser do mesmo número de lote e estocado sob condições idênticas.

B. Interpretação

Se for usado um programa computador para interpretar os resultados do teste, é imprescindível que o valor dos calibradores caia dentro de uma margem de erro de 10 % em relação aos resultados tanto de calibradores, quanto de amostras.

O PSA é elevado no início da hipertrofia da próstata (BPH). Clinicamente, um valor elevado de PSA sozinho não é um valor diagnóstico como um teste específico para câncer e deve ser usado em conjunto com outras manifestações (observações) clínicas e procedimentos diagnósticos (biópsia da próstata). Determinações de PSA livre podem ajudar na observação para discriminação de BPH e condições de câncer de próstata (5).

CONTROLE INTERNO DE QUALIDADE

Cada laboratório deve estabelecer valores de referência para os controles em níveis baixo, normal e elevado para monitorar a performance do teste.

VALORES DE REFERÊNCIA

Valores normais para o KIT BIOLISA PSA em ng/mL

Homens saudáveis < 4 ng/mL

DESEMPENHO DO PRODUTO

Exatidão

COMPARAÇÃO DE MÉTODOS E ESPECIFICIDADE METODOLÓGICA

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

Foram utilizadas 48 amostras de população normal, com prostatite, com abscesso prostático e câncer de próstata.

A equação de regressão linear obtida foi $y = 0,9593x + 0,3736$ e o coeficiente de correlação 0,9949.

Com estes resultados pode-se concluir que os kits apresentam 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)	1,74	55,30	0,40
Desvio Padrão (ng/mL)	0,08	2,62	0,02
Coefficiente de Variação (%)	4,74	4,73	4,88

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)	1,84	58,05	0,40
Desvio Padrão (ng/mL)	0,09	2,43	0,01
Coefficiente de Variação (%)	4,83	4,18	2,50

Sensibilidade

A sensibilidade do Kit Biolisa PSA Total é de 0,012 ng. Isto é equivalente a uma amostra contendo 0,5 ng/mL de concentração de PSA.

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 reações cruzadas de PSA com determinadas substâncias, foram avaliadas com adição de interferentes em um padrão, em várias concentrações. As reações cruzadas foram calculadas pela razão entre uma dosagem de substância interferente e a dosagem de PSA necessária para produzir a mesma absorbância.

Substância	Reações Cruzadas
Ácido Acetilsalicílico	100 µg/mL
Ácido Ascórbico	100 µg/mL
Cafeína	100 µg/mL
CEA	10 µg/mL
AFP	10 µg/mL
CA-125	10.000 U/mL
hCG	1000 IU/mL
hLH	10 IU/mL
hTSH	100 mIU/mL
hPRL	100 µg/mL

SIGNIFICADO CLINICO

O antígeno Prostático específico (PSA) é uma variedade de proteína com quimiotripsina (1,2). A proteína é uma simples glicoproteína em cadeia com peso molecular de 28,4kDA (3). O nome do PSA deriva da observação que é um antígeno normal da próstata mas não foi encontrado em outro tecido normal ou maligno.

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 tem sido usados em maior escala do que a o Fosfatase Ácida Prostática (PAP) no diagnóstico e tratamento de pacientes devido à sensibilidade aumentada.

NÚMERO DE TESTES

96 / 192 TESTES

BIBLIOGRAFIA:

- 1) Christensson A., Laurell C.B., Lilja H., Eur J. Biochem, 194, 755-63 (1990).
- 2) Watt K.W., et al., Proc Nat Acad Sci USA, 83, 3166-70 (1986).
- 3) Chen Z., Prestigiacomo A., Stamey T., Clin Chem., 41, 1273-82 (1995).
- 4) Wild D., The Immunoassay Handbook., Stockton Press (1994) p452.
- 5) Junker R., Brandt B., Zechel C., Assmann G., Clin Chem., 43, 1588-94 (1997).

GARANTIA DA 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

Número de registro do kit Biolisa PSA Total na ANVISA: 10269360157

Revisão: Junho/11