

SERATEC® PSA SEMIQUANT

Art.-Nr. PSM400F

Test de diagnóstico in vitro de uso profesional forense para la detección de fluido seminal mediante la determinación semicuantitativa de PSA (Antígeno próstata específico).

Uso aconsejado

El Test PSA SEMIQUANT de SERATEC® es indicado para la detección rápida de PSA en fluido seminal. La interpretación es visual por la visualización de la línea del test en el caso de una muestra de PSA positiva. Si se requiere, la intensidad de la línea del test puede ser correlacionada con la intensidad de un estándar interno el cual está ajustado a semejar la intensidad de color de la línea del resultado del test a 4 mg PSA/ml.

Introducción

El PSA (Antígeno próstata específico) es una glicoproteína producida en la próstata y secretada en el fluido seminal. El PSA es una de las proteínas principales del fluido seminal con concentraciones de 0,2 a 3 mg/ml. Su función principal es licuar el fluido seminal. Esta gran cantidad y de hecho el que el PSA se encuentre solamente a muy bajas concentraciones en el fluido vaginal femenino (0,4-0,9 ng/ml y 0,0-1,25 ng/ml respectivamente)^{2,3} hace del PSA un interesante marcador en ciencias forenses para la detección incluso de pequeñas cantidades de fluido seminal. Las ventajas de una determinación de PSA son:

- La detección de esperma es posible en casos donde no deben encontrarse espermatozoides (por ejemplo hombres vasectomizados).
- Pequeñas cantidades de esperma pueden ser registradas. Estudios de MACALUSO y otros (1999) indican, que una cantidad de sólo 10 microlitros de esperma incrementa la concentración de PSA en el fluido vaginal 200 veces.
- El PSA tiene una buena estabilidad. En un frotis vaginal es detectable hasta 14-47 horas después del coito.⁵ También en manchas de 30 años de antigüedad, el PSA puede ser recuperado a concentraciones detectables.¹
- El PSA es un marcador, el cual es más específico que el test de fosfatasa ácida.

El test será afectado, en su evidencia, por el hecho de que otros fluidos del cuerpo humano como sangre u orina pueden también contener PSA. Visto que la concentración de PSA en suero humano es normalmente bajo (<4 ng/ml) y está elevado solamente en el caso de enfermedades prostáticas hasta 200 ng/ml, la cantidad de PSA en orina de hombres sanos muestran en algunos casos valores de 800ng/ml. (valor estimado).⁴

En caso de duda, una diferenciación entre fluido seminal y orina puede ser posible por la determinación de concentraciones de PSA. El más alto grado de dilución en orina de hombres con un resultado positivo de PSA reportado es 1:200. Por otro lado, muestras de semen generalmente dan resultados positivos de PSA incluso a factores de dilución de 1: 200.000, esto es a 1000 veces mayor a la mas alta dilución.⁴ Estudios indican que niveles bajos de PSA son detectables en la orina de chicos de 11 años.⁴ Ver la referencia #6 para un listado de otros fluidos corporales que contienen PSA.

Normalmente las concentraciones de PSA en los otros fluidos corporales son bajas, por tanto una interferencia con la interpretación del resultado del test es prácticamente imposible trabajando con materiales diluidos/extraídos.

Descripción del test

Originalmente el test PSA SEMIQUANT SERATEC® fue desarrollado para la determinación de PSA en suero para permitir la detección de niveles elevados de PSA que podrían ser una indicación de cáncer de próstata. Para la detección de semen, el test es usado generalmente como test cualitativo. En casos especiales, sin embargo, puede ser de ayuda estimar la cantidad de PSA en la muestra correlacionando la intensidad de la línea de resultado del test con la del estándar interno.

Principio del test

El test PSA SEMIQUANT SERATEC®, es un inmunoensayo cromatográfico (CIA) para la determinación semi-cuantitativa rápida de PSA en fluidos corporales. Contiene 2 anticuerpos monoclonales murinos anti PSA como componentes activos. Uno de estos anticuerpos está inmovilizado en la zona del test de la membrana. La

zona control y la zona del estándar interno (entre zona control y zona del test) contiene anticuerpos policlonales anti ratón obtenidos en cabra. La cantidad de anticuerpo de estándar interno está ajustada a la intensidad de color de la línea, la cual es igual a la intensidad de color de la línea del test a una concentración de PSA de 4 ng/ml.

Un bloque de fibra de vidrio en la parte baja de la membrana es utilizado para la carga de la muestra y la transmisión a un segundo bloque de fibra con un segundo anticuerpo monoclonal murino anti PSA marcado en oro y desecado. El PSA de la muestra se unirá al anticuerpo marcado con oro y formará un complejo PSA-anti PSA marcado con oro.

A través del efecto de capilaridad de la membrana, la mezcla de reacción incluyendo el complejo es transportado hacia arriba con el fluido. En cualquier caso, el anticuerpo coloreado anti PSA marcado con oro se unirá al anticuerpo anti ratón en la zona control y la zona del estándar interno desarrollando dos líneas rojas (una en la zona control y otra en la región del estándar interno). Estas dos líneas son independientes de la existencia de PSA en la muestra e indican solamente que la ejecución del test ha sido correcto. Si la muestra contiene PSA, el complejo PSA-anti PSA marcado con oro se unirá al anticuerpo monoclonal inmovilizado de la zona de resultado del test que reconoce otro epitopo en la molécula de PSA (complejo sandwich). La unión se muestra por la formación de una línea adicional. Así en una muestra **positiva para PSA**, aparecerán **tres líneas** coloreadas en la ventana de resultados. La línea que aparece en medio (estándar interno) correlaciona con la cantidad de 4 ng/ml de PSA. En algunos casos puede ser de utilidad estimar la cantidad de PSA en la muestra comparando la línea de resultado del test con la línea del estándar interno.

Materiales

Materiales suministrados: 40 tests individuales precintados por kit, pipetas de plástico, 50 mL solución tampón y el protocolo de instrucciones de uso.

Materiales requeridos pero no suministrados: reloj avisador

Almacenaje y Estabilidad

El test es estable hasta la fecha de caducidad indicada en la bolsa sellada. Los tests pueden almacenarse a temperatura ambiente o refrigerados (+4 a +30°C). El test debe mantenerse en la bolsa sellada hasta su uso.

Características Cualitativas

Sensibilidad

El test es capaz de detectar PSA en su rango de concentración de al menos 2ng/ml PSA hasta 100microgramos/ml PSA. Tener en cuenta que muestras que contienen menos de 2 ng PSA/ml pueden también producir resultados positivos débiles, así que 0,5 ng PSA/ml son en la mayoría de los casos aún detectados con el test. A concentraciones >_500 microgramos/ml el resultado del test está afectado por un exceso de PSA resultando un efecto HOOK.

Preparaciones de Referencia

Las características cualitativas del test son confirmados en un test final de control de calidad usando el siguiente estándar WHO: Antígeno Próstata Específico (90:10), Primer Standard Internacional, NIBSC código 96/670.

Características de la Realización

Las características de la realización siguientes han sido observadas a una concentración de 2ng PSA/ml (límite de detección garantizada del test PSA SEMIQUANT SERATEC®).

Sensibilidad Diagnóstica	100%
Especificidad Diagnóstica	100%
Valor Predictivo positivo	100%
Valor Predictivo negativo	100%
Reproducibilidad	100%

Para la discriminación de los rangos de concentración de <y>_ 4 ng/ml PSA, como es requerido para el diagnóstico de carcinoma de próstata, las características de realización del test fueron evaluados en dos estudios clínicos independientes.

El listado siguiente nos muestra la media de los dos resultados:

Sensibilidad Diagnóstica	90,0%
Especificidad Diagnóstica	88,7%
Valor predictivo positivo	83,3%
Valor predictivo negativo	96,5%
Reproductibilidad	90,2%

Especificidad

El test nos muestra que no tiene reactividad cruzada con otras proteínas del fluido seminal. Un Inmunoblot con fluido seminal usando los anticuerpos PSA respectivos resultó solamente una línea reactiva en el peso molecular del PSA. No se ha observado reactividad cruzada con fluido seminal de otros mamíferos (perro, gato, caballo, toro, cerdo) 1 excepto para el fluido seminal de primates. No se ha observado reactividad cruzada con suero sanguíneo.

Suero sanguíneo de hembras con un contenido de PSA por debajo del límite de reacción, no se observó reactividad.

Tener en cuenta que en casos raros en muestras extremadamente hemolíticas con un color rojo oscuro puede resultar una línea de resultado del test débil que se vuelve más débil a medida que pasa el tiempo. Muestras con un ligero color rojizo debido a células sanguíneas hemolizadas no causa la formación de una línea de resultado del test.

Procedimiento del test

Precauciones

Fluido seminal y todos los materiales que han estado en contacto con él deben ser manipulados y dispuestos como potencialmente capaces de transmitir infección. Evitar el contacto con la piel utilizando guantes y el atuendo apropiado en el laboratorio.

El test y todos los materiales que han estado en contacto con fluido seminal deben pasarse por el autoclave antes de tirarse.

- Uso exclusivo para diagnóstico In Vitro.
- No utilizar los tests después de la fecha de caducidad o si la bolsa ha sido dañada.
- El test se compone de materiales potencialmente infecciosos (p.ej: anticuerpos). Estos materiales no causan peligro si el equipo es usado de acuerdo con las instrucciones.
- No abrir las bolsas hasta que se esté preparado para realizar el ensayo.

Manipulación y recolección de muestras.

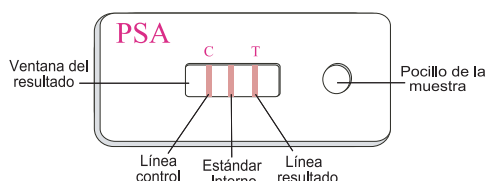
El fluido seminal debe ser diluido al menos 1:500 antes de utilizarse debido a su extremadamente alto contenido de PSA. Para la dilución, soluciones tampón estándar a un rango de pH neutro (preferencial: 1 M Tris salino pH=8.2) pueden ser utilizados.

Manchas de semen o torundas pueden ser extraídas con tampón, mediante incubación en un agitador durante 2h a 4°C. El PSA contenido en el sobrenadante es separado, centrifugado durante 3 minutos a 13.000g y – si es necesario- diluido. Es utilizado como muestra para realizar el test. Partículas de tejido no interfieren con el resultado del test.

NOTA!

- Una alta viscosidad de la muestra puede interferir con la capilaridad.
- Evitar muestras altamente hemolíticas con un color rojo intenso.
- Las muestras deben estar alrededor de un pH neutro (entre pH5-9).
- Permitir que las muestras alcancen la temperatura ambiente antes de iniciar el test.

Inicio del ensayo



- Llevar el equipo del test a temperatura ambiente. Sacarlo de la bolsa protectora y marcar el equipo del test para su identificación.
- Añadir 5 gotas (aprox. 200 microlitros) de muestra en el pocillo de muestra. Reservar la muestra sobrante para el caso que fuera necesario realizar diluciones adicionales.

- Leer el resultado después de 10 minutos de incubación a temperatura ambiente. No debe haber fluido sobrante en el pocillo de la muestra en ese momento. Si se desea estimar la cantidad de PSA comparando con el estándar interno mantener estrictamente los 10 minutos. De otra forma las intensidades del estándar interno y el resultado puede cambiar resultando unas lecturas incorrectas.

Interpretación de resultados

Muestras con **PSA negativo** (por debajo del límite de detección) mostrarán **2 líneas** en la ventana de resultados, sin embargo muestras con **PSA positivo** mostrarán **3 líneas**:

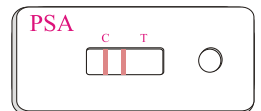
Línea del resultado del test (T): refleja la concentración de PSA en la muestra y es visible solamente en muestras con PSA positivo.

Estándar Interno: La intensidad del color correlaciona con una concentración de aproximadamente 4 ng/ml de PSA.

Línea Control (C): Control para ver posibles errores en el procedimiento y de integridad de los componentes.

Resultado negativo (Inexistencia de PSA o en concentraciones por debajo al límite de detección).

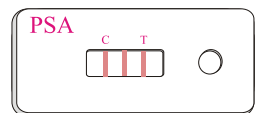
La línea del resultado del test (T) no es detectable. La aparición de la línea del estándar interno y la del Control (C) confirman la validez del test. En este caso es bastante seguro que la muestra no contiene fluido seminal.



Nota: Asegurarse que la dilución de la muestra se encuentra dentro de los rangos de detección de concentración de PSA. Concentraciones de PSA muy bajas (por ej.: debido a una insuficiente extracción) o muy altas (por ej.: debido a una insuficiente dilución; 500 microgramos/ml, resulta un efecto Hook) interfieren con la formación del resultado del test.

Resultado positivo (PSA detectable)

Aparecen la línea de resultado del test (T), la del estándar interno y la de Control (C). En este caso es bastante seguro que la muestra contiene fluido seminal.



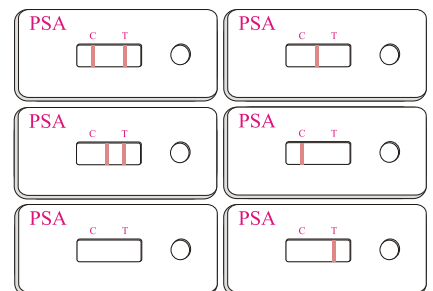
Nota: Si existe el riesgo de mezcla de PSA de diferentes fluidos corporales y fluido seminal se deberá intentar conseguir unos resultados más precisos realizando más altas diluciones.

Resultado invalidado

Las líneas del estándar interno y del control (C) no son detectables. El test debe ser invalidado y repetir el ensayo con un nuevo cassette.

Nota:

Si la muestra contiene grandes cantidades de PSA es posible que la intensidad de color de la línea control sea solamente débil.



Referencia bibliográficas sugeridas

- ¹Hochmeister et al. (1999) Evaluation of Prostate- Specific Antigen (PSA) Membrane Test Assays for the Forensic Identification of Seminal Fluid: J Forensic Sci Vol 44: 1057-1060
- ²Lawson et al. (1998) Objective markers of condom failure. Sex Transm Dis 25: 427-423
- ³Macaluso et al. (1999) Prostate-specific antigen in vaginal fluid as a biologic marker of condom failure. Contraception 59: 195-201
- ⁴Sato et al. (2002) Use of the „SMITEST“ PSA card to identify the presence of prostate – specific antigen in semen and male urine. Forensic Sci Int 127: 71-74
- ⁵ Hochmeister et al. (1997) Evaluation of Prostate-Specific Antigen (PSA) Membrane Tests for the Forensic Identification of Semen. 8th International Symposium on Human Identification <http://mafs.net/pdf/geneticidproc/ussymp8proc/33.html>
- ⁶Laux et al., Forensic Detection of Semen III. Detection of PSA Using Membrane Based Tests: Sensitivity Issues with Regards to the presence of PSA in other Body Fluids. <http://mafs.net/pdf/forensicdetectionsemen3.pdf>
- ⁷Laux et al., Forensic Detection of Semen II. Comparison of the Abacus Diagnostics OneStep ABA card p30 Test and the Seratec® PSA Semiquant Kit for the Determination of the Presence of Semen in Forensic Cases. <http://mafs.net/pdf/laux2.pdf>
- ⁸Gartside et al., Estimation of Prostate-Specific Antigen (PSA) Extraction Efficiency from Forensic Samples Using the Seratec® PSA SemiQuant Semiquantitative Membrane Test. Forensic Science Communications 2003 April; 5 (2). <http://www.fbi.gov/hq/lab/fsc/backissu/april2003/gartside.htm>