

Odelis[®] CPSE

Odelis[®] CPSE

PARA USO EXCLUSIVO *IN VITRO*

INDICACIÓN

Odelis[®] CPSE es un dispositivo ELISA para la medición de la CPSE (Esterasa Específica de la Próstata Canina - Canine Prostate Specific Esterase).

INTRODUCCIÓN

La Esterasa Específica de la Próstata Canina (CPSE) es una importante proteína segregada por la próstata; representa más del 90% de las proteínas presentes en el líquido seminal. Está formada por dos cadenas polipeptídicas de 14 kDa y 15 kDa unidas por puentes disulfuro. La forma originaria de esta proteína tiene un peso molecular de entre 29 y 31 kDa en función del grado de glicosilación. La CPSE es una arginina esterasa. Su secreción está regulada por andrógenos. Aún no se ha determinado claramente cuál es su papel fisiológico. La CPSE pasa al suero tanto después de un aumento en su producción como por una alteración en las estructuras glandulares y la barrera hemato-glandular, que permite un paso mayor de CPSE a la circulación sanguínea.

PRINCIPIO

Odelis[®] CPSE es un inmunoensayo de tipo ELISA. Un primer anticuerpo, que está fijado en el micropocillo, captura las proteínas de la CPSE de los calibradores y las muestras. Tras el lavado, las proteínas unidas son identificadas por un segundo anticuerpo conjugado con HRP (Peroxidasa de Rabano - Horse Radish Peroxidase). Tras un segundo período de incubación, los reactivos no unidos se eliminan mediante lavado y se inicia la reacción colorimétrica con la adición de un sustrato para la HRP: TMB (3, 3', 5, 5', Tetrametil benzidina). Se interrumpe luego la reacción y se lee la densidad óptica (DO) de cada pocillo a 450nm. Los valores registrados de DO son proporcionales a la concentración de proteína CPSE contenida en los calibradores y las muestras.

COMPOSICIÓN DEL KIT

La fecha de caducidad se encuentra impresa en la etiqueta exterior.

COMPONENTES	SÍMBOLOS	CANTIDAD	CONSERVACIÓN
MICROPOCILLO Listo para usar.		1	+2°C/+8°C hasta la fecha de caducidad.
CONJUGADO: Listo para usar.	CONJ	1 vial (12 ml)	+2°C/+8°C hasta la fecha de caducidad.
CALBRADOR: Liofilizado. Reconstituir con el volumen de tampón de dilución indicado en el vial	CAL	4 viales	+2°C/+8°C hasta la fecha de caducidad.
CONTROL: Liofilizado. Reconstituir con el volumen de tampón de dilución indicado en el vial	CONTROL	4 viales	+2°C/+8°C hasta la fecha de caducidad.
TAMPÓN PARA DILUCIÓN: Listo para usar.	BUF DIL	1 vial (60 ml)	+2°C/+8°C hasta la fecha de caducidad.
SOLUCIÓN DE LAVADO CONCENTRADA X100 Diluir 100X antes de usarla.	BUF WASH 100X	1 vial (11 ml)	+2°C/+8°C hasta la fecha de caducidad. El tampón diluido puede conservarse una semana a +2°C/+8°C
SUBSTRATO: Listo para usar.	SUBS TMB	1 vial (12 ml)	+2°C/+8°C hasta la fecha de caducidad.
SOLUCIÓN DE PARADA: Listo para usar.	STOP SOLN	1 vial (8 ml)	+2°C/+8°C hasta la fecha de caducidad.
FILM ADHESIVO PARA LOS MICROPOCILLOS		4	

PRECAUCIONES

◆ Medidas de seguridad

No pipetear ninguna solución con la boca. No fumar, comer o beber en las instalaciones en las que se manipulen las muestras o los reactivos. Usar guantes desechables para manipular las muestras o reactivos y lavarse las manos minuciosamente después de usarlos. Evite las salpicaduras.

Deshacerse de las muestras y descontaminar todo el material que pueda haber sido contaminado por las mismas siguiendo los procedimientos para agentes infecciosos. El mejor método de descontaminación es el autoclave durante un mínimo de 1 hora a 121°C.

La azida sódica puede reaccionar con las tuberías de plomo y cobre y formar azidas metálicas muy explosivas. Al deshacerse de los residuos, dilúyalos copiosamente para evitar la formación de tales productos.

◆ Precauciones de uso

No use los componentes del kit después de su fecha de caducidad. No mezcle reactivos de lotes distintos. Evite toda contaminación bacteriana de los reactivos y del agua. Respete los períodos de incubación recomendados. No use los reactivos de otro kit.

OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

El ensayo se realiza directamente sobre suero o plasma (heparina o EDTA). Centrifugue las muestras inmediatamente después de obtenerlas. Las muestras pueden dividirse en alícuotas que pueden guardarse congeladas (-20°C). Evite ciclos repetidos de congelación / descongelación.

FUNCIONAMIENTO

◆ Equipamiento necesario

Micropipetas precisas o material similar con puntas desechables que permitan realizar las distribuciones requeridas por el protocolo. Debería comprobarse su calibrado de forma regular. Agua destilada. Tubos de plástico desechables. Mezclador tipo Vortex. Lavador de micropocillos (opcional). Lector de micropocillos, capaz de medir la absorbancia a 450 nm. Opcionalmente, el lector puede estar provisto de un filtro capaz de leer la absorbancia a una longitud de onda entre 610 nm y 650 nm para corregir cualquier posible imperfección del micropocillo.

Protocolo

Todos los reactivos deberían llevarse a temperatura ambiente (18-25°C) un mínimo de 30 minutos antes de ser usados. La toma y distribución de los reactivos en los pocillos se realiza a temperatura ambiente (18-25°C). Se aconseja testar cada muestra dos veces (duplicado) para prevenir cualquier riesgo de error de interpretación.

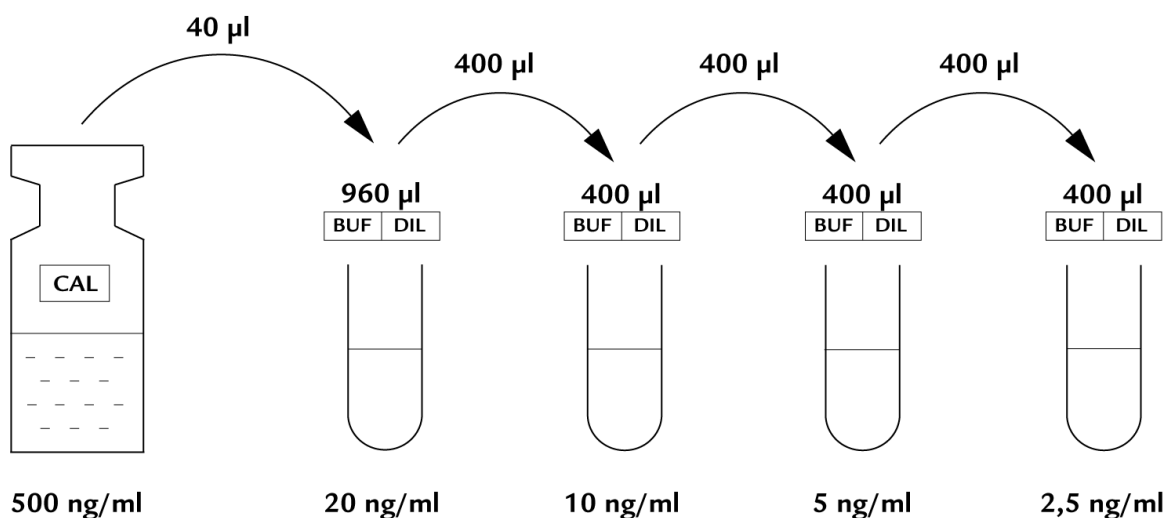
Determinar el número de pocillos necesario para cada ensayo y separar las tiras no utilizadas. Conservarlas a 2-8°C en presencia de la bolsita de plástico con desecante provista para ello, asegurándose que se encuentra correctamente sellada.

Reconstituir los viales de calibrador y control. Asegurarse que el liofilizado se ha disuelto por completo.

◆ Preparación de las diluciones del calibrador y de control

Calibrador

Reconstituir el vial de calibrador con el volumen de tampón de dilución indicado en la botella. Con ello se crea una solución de CPSE con una concentración de 500 ng/ml. Esperar 5 minutos, homogeneizar la mezcla suavemente en un vortex.



- ◆ Diluir 40 µl de la solución madre en 960 µl de tampón de dilución => solución a 20 ng/ml
- ◆ Tomar 400 µl de la solución a 20 ng/ml y diluirlos en 400 µl de tampón de dilución => solución a 10 ng/ml
- ◆ Tomar 400 µl de la solución a 10 ng/ml y diluirlos en 400 µl de tampón de dilución => solución a 5 ng/ml
- ◆ Tomar 400 µl de la solución a 5 ng/ml y diluirlos en 400 µl de tampón de dilución => solución a 2,5 ng/ml

Control

Reconstituir la botella de control con el volumen de tampón de dilución indicado en el vial. Así se crea una solución de CPSE a la concentración indicada en el vial.

◆ Predilución de las muestras (1/10)

Todas las muestras deben diluirse 10 veces (p.ej. 30 µl de la muestra diluidos en 270 µl del tampón de dilución proporcionado con el kit) antes de someterse a análisis. Homogeneizar suavemente la mezcla con un vortex.

◆ Procedimiento

Se recomienda realizar el ciclo de lavado tal como se indica para obtener resultados fiables y reproducibles. El volumen residual de solución de lavado debería ser lo más pequeño posible.

- Diluir el tampón de lavado (BUF WASH 100X) 100 veces antes de usarlo.

Respetar el orden de adición de los reactivos:

- Colocar 100 µl del tampón de dilución en el pocillo correspondiente (0 ng/ml)

- Colocar 100 µl de cada concentración (20 ng/ml; 10 ng/ml; 5 ng/ml; 2,5 ng/ml) del calibrador en los pocillos correspondientes.

- Colocar 100 µl del control o muestra prediluida en los pocillos correspondientes.

- Cubrir con el film adhesivo e incubar 1 hora a 37°C.

Lavar los pocillos como sigue:

- Aspirar el contenido de los pocillos.

- Colocar 300 µl de solución de lavado en cada pocillo.

- Repetir este procedimiento otras tres veces, completando cuatro ciclos de lavado.

Las distintas etapas del ciclo de lavado deberían ser eficaces para la producción de resultados fiables y reproducibles.

- Colocar 100 μ l del conjugado HRP listo para usar en todos los pocillos.
- Cubrir con el film adhesivo e incubar durante 1 hora a 37°C.

Lavar los pocillos como sigue:

- Aspirar el contenido de los pocillos.
- Colocar 300 μ l de la solución de lavado en cada pocillo.

Repetir este procedimiento otras 3 veces, hasta completar 4 ciclos de lavado.

- Colocar 100 μ l de TMB en cada pocillo.
- Dejar que la reacción colorimétrica se complete durante 10 minutos a temperatura ambiente (18-25°C), en oscuridad.
- Parar la reacción añadiendo 50 μ l de la solución de parada a cada pocillo.
- Leer la absorbancia a 450 nm. Realizar una segunda lectura (opcional) de la absorbancia a longitud de onda entre 610 nm y 650 nm.

CONTROL DE CALIDAD

Las buenas prácticas de laboratorio requieren el uso de muestras de control en cada serie de ensayos para asegurar la calidad de los resultados obtenidos. Estas muestras deben ser tratadas del mismo modo que las muestras a analizar; es aconsejable analizar los resultados usando métodos estadísticos apropiados.

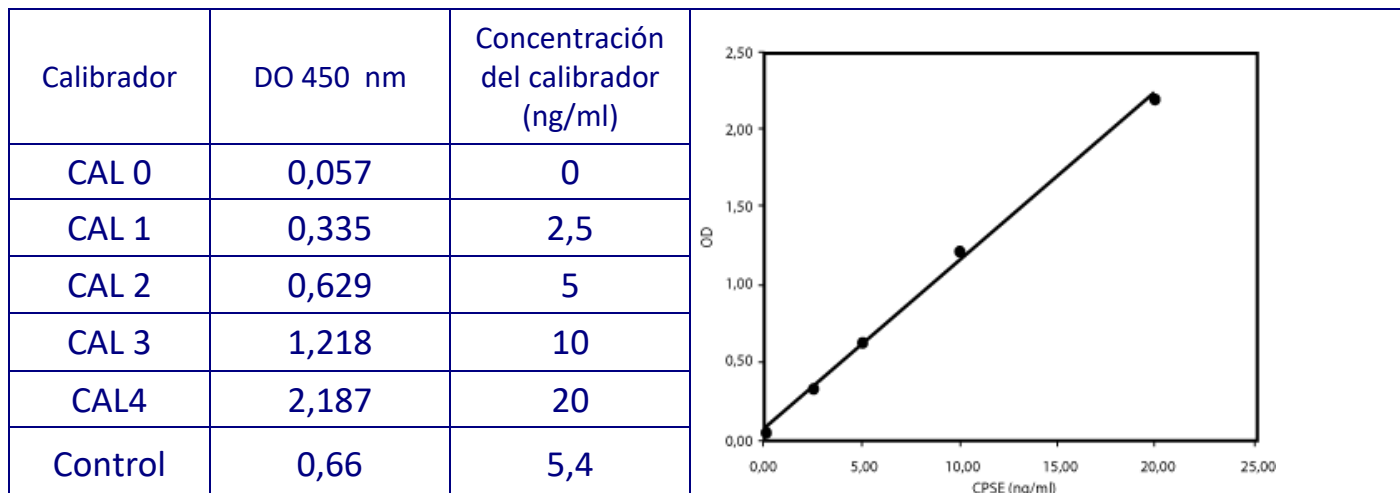
RESULTADOS

Trazar la curva de calibrado expresando la DO de los calibradores como función de la concentración.

Leer los valores de las muestras a partir de la curva y multiplicar por la fracción recomendada de dilución (x10).

Por ejemplo: una muestra con una concentración de 6,5 ng/ml, según la gráfica, tiene una concentración real de 65 ng/ml.

Curva de calibración típica (solo es un ejemplo): estos datos no deberían sustituir a los resultados obtenidos en el laboratorio bajo ningún concepto.



RESTRICCIONES DEL PROCEDIMIENTO

Las muestras turbias, hemolisadas, hiperlipémicas o con un contenido elevado de fibrina pueden dar resultados incorrectos. No extrapolar los valores de las muestras más allá del último calibrador. Diluir las muestras y repetir el ensayo teniendo en cuenta la dilución empleada. La concentración del control debería encontrarse entre los valores indicados en los viales.

VALORES ESPERADOS

Se midió la concentración sérica de CPSE en 34 perros que presentaban signos clínicos y ecográficos de Hiperplasia Prostática Benigna (HPB) y en 55 perros sin HPB (de menos de 2 años y sin signos ecográficos), lo que equivale a una población total de 89 perros. El estudio demostró que este ensayo de CPSE permite el diagnóstico de Hiperplasia Prostática Benigna (HPB) con una sensibilidad del 97,1% y una especificidad del 92,7% con un umbral clínico de 61 ng/ml (intervalo 54-67 ng/ml).

CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DEL ENSAYO

◆ Precisión

Intra-ensayo

Muestras	n	Concentración media (ng/ml)	Intraserias (CV%)
1	34	33,6	2,79
2	34	132,3	3,06
3	34	151	1,97

Inter-ensayo

Muestras	n	Concentración media (ng/ml)	Interseries (CV%)
1	12	27,9	6,6
2	12	148,2	5,86
3	12	174	5,6

◆ Prueba de recuperación

Los porcentajes de recuperación obtenidos se hallaron entre el 91 y el 113% - Media 97,8%

◆ Prueba de dilución

Las muestras muy concentradas se han diluido. Los porcentajes de recuperación se situaron entre el 97 y el 120%.

◆ Umbral de detección

Este umbral se obtuvo mediante cálculos y corresponde a dos desviaciones del calibrador por encima de la absorbancia media del calibrador Cero. Se calculó en 0,39 ng/ml.

◆ Efecto prozona

No se observó efecto prozona alguno a concentraciones de CPSE de hasta 10 µg/ml.

◆ Sustancias que interfieren

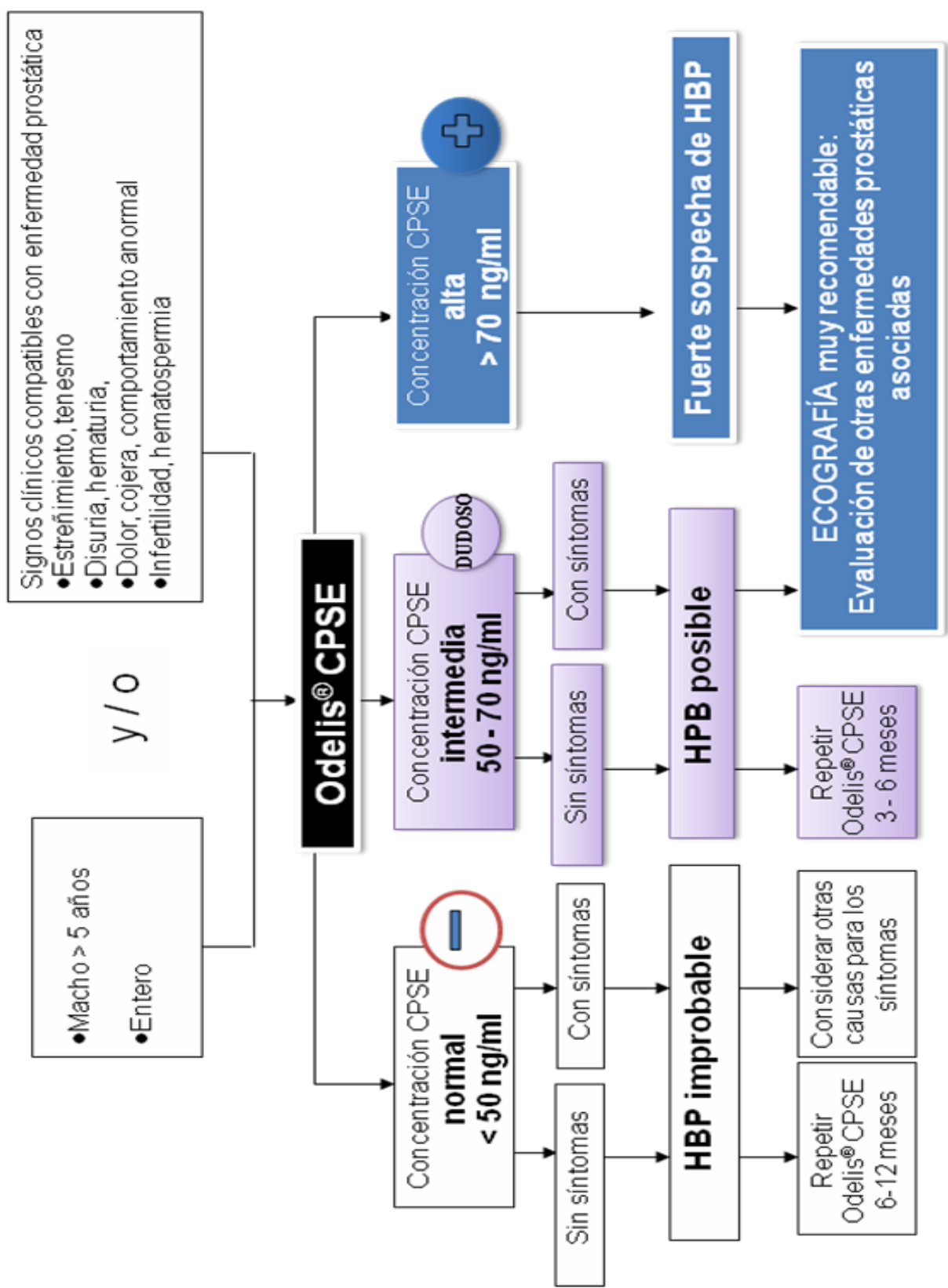
La hemoglobina (hasta 4g/L), bilirrubina (hasta 500µmol/L) o triglicéridos (hasta 20g/L) no tienen influencia sobre la dosificación del ensayo.

◆ Intervalo de medición

Las muestras deben ser medidas en el intervalo comprendido entre el umbral de detección y la concentración más elevada del intervalo de calibrado.

PROCEDIMIENTO A SEGUIR

POCILLOS	Calibradores Diluciones a 20ng/ml; 10 ng/ml; 5 ng/ml; 2,5 ng/ml; 0 ng/ml	Control y muestras prediluidas	Incubar durante 1 hora a 37°C ----- Aspiración + 300 µl Solución de lavado Repetir 3x	Conjugado	Incubar durante 1 hora a 37°C ----- Aspiración + 300 µl Solución de lavado Repetir 3x	TMB	Incubar durante 10 min a 18- 25°C a oscuras	Solución de Parada	Medir DO a 450 nm
CALIBRADORES	100 µl		100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	50 µl	50 µl	50 µl
CONTROL		100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	50 µl	50 µl	50 µl
MUESTRAS		100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	50 µl	50 µl	50 µl



MICROPLACA / MICROPOCILLO

12							
11							
10							
9							
8							
7							
6							
5							
4							
3							
2							
1							
	A	B	C	D	E	F	G



Fabricado por :
BIO VETO TEST
285, Avenue de Rome
83500 LA SEYNE SUR MER - FRANCIA
Tel : +33 (0)4 94 10 58 94 – Fax : +33 (0)4 94 10 58 90
E-MAIL : bvt@bvt.fr – WEB : www.bvt.fr

