



## Набор ИФА для определения общего ПРОСТАТ-СПЕЦИФИЧЕСКОГО АНТИГЕНА (ПСА)

Кат. № : EIA-3719  
Количество : 96  
Производитель : DRG (Германия)

Методика от 05-2012  
Версия 12.0

**Внимание:** основой при проведении анализа является оригинал инструкции на англ. языке.

### 1. ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ

Набор ИФА EIA-3719 total PSA ELISA используется для количественного определения общего простат-специфического антигена (о-ПСА) в образцах сыворотки или плазмы человека. Определение уровней о-ПСА, в сочетании с цифровым ректальным обследованием (ЦРО), используется для оценки риска карциномы простаты у мужчин или для мониторинга эффективности лечения у пациентов карциномы простаты.

### 2. ВВЕДЕНИЕ

Рак простаты является наиболее частой формой рака найденного в человеке и второй причиной смерти от рака у мужчин. До недавнего времени пальцевое ректальное исследование было наиболее распространенным диагностическим методом для ранней стадии рака простаты, но измерения ПСА стал наиболее приемлемым тестом определения людей, которые подвергаются риску рака простаты, и которые должны пройти другие тесты.

### 3. ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Данный твердофазный иммуоферментный анализ основан на принципе сэндвича. Микротитровальные лунки покрыты антителами к детерминантам антигенов. Сыворотки пациентов (в аликвотах) инкубируются в лунке, покрытой антителами, с ферментным конъюгатом второго антитела (E-Ab) (к другому участку молекулы антигена). После инкубации несвязанные E-Ab вымываются, а количество связанного E-Ab пропорционально концентрации антигена в образце. После добавления раствора субстрата, интенсивность проявившегося окрашивания пропорциональна концентрации антигена в сыворотке пациента. Измеряемые оптические плотности стандартов используются для построения калибровочной кривой по которой рассчитываются неизвестные.

### 4. ПОСТАВЛЯЕМЫЕ В НАБОРЕ МАТЕРИАЛЫ

Каждый набор содержит количество реагентов, достаточное для 96 определений.

- Микротитрационный планшет: 12 модулей по 8 лунок каждый = 96 определений.
- 5 стандартов-ПСА: готовые к использованию реагенты (0,5мл) со следующими концентрациями: 1.56 – 3.12 – 6.25 – 12.5 – 25.0 нг/мл. Стандарты калибруются по ВОЗ 96/670.
- Нулевой стандарт/Разбавитель образцов: готовый к использованию реагент (10 мл).
- Контроль: готовый к использованию реагент (0,5 мл) Концентрация указана на упаковке.
- Конъюгат ПСА: готовый к использованию конъюгат (12 мл).
- Субстрат ТМБ: готовый к использованию реагент (12 мл).
- Стоп-раствор: готовый к использованию реагент (14 мл). Содержит серную кислоту.

### 5. НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

- Прецизионные микропипетки (объем: 25 мкл и 100 мкл) с одноразовыми наконечниками.
- Дистиллированная вода
- Спектрофотометр ELISA с 450-630нм фильтрами.
- Таймер на 60 минут
- Микропланшетный вошер
- Вортекс или же подобное устройство
- Контейнер для использованных остатков и образцов.

### 6. ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ:

- Хранить набор при температуре 2-8°C

- Привести к комнатной температуре(18-25°C) не менее чем за 30 минут до использования. После использования вернуть обратно в холодильник.

- Избегать длительного хранения при КТ.

- Не использовать реагенты после истечения срока годности. Срок годности см. на оригинальной наклейке упаковки набора.

- Закрывать флаконы немедленно после вскрытия.

- Хранить планшет, включая влагопоглотитель, в поставляемом запечатывающемся пакете. Неиспользуемые компоненты должны всегда храниться при соблюдении этих условий.

- Убедиться, что компоненты набора не заморожены.

### 7. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- Стандарты Комплекты ELISA используются профессионалами только для лабораторного диагностического использования;

- Образцы сыворотки и плазмы крови должны рассматриваться как потенциально инфекционные материалы. Носите перчатки и соответствующую для лаборатории одежду при работе с образцом материалов. Нельзя есть, пить и курить в помещениях, где обрабатываются образцы или реагенты. Не пипетируйте ртом. В случае контакта с кожей, промойте бактерицидным мылом и большим количеством воды. При необходимости, обратитесь к врачу;

- Калибраторы ПСА и контроли имеют человеческое происхождение и были протестированы по методикам, одобренным FDA, с отрицательным результатом на HIV, HBsAg и HCV. Однако со всеми стандартами следует обращаться как с потенциально биологически опасными;

- Из-за потенциально инфекционного характера образцов и компонентов набора, все материалы которые контактировали с этими материалами, нужно стерилизовать и утилизировать в соответствии с местным законодательством. Это также касается жидких отходов;

- Анализы реагентов содержат консерванты, ТМБ, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, серную кислоту и может быть вредным при проглатывании. Нужно избегать непосредственного контакта с кожей или слизистой оболочкой. В случае контакта с кожей, промойте большим количеством воды и, при необходимости, обратитесь к врачу;

- Стоп раствор содержит H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Поскольку H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, которая используется для остановки цветной реакции, - вещество, вызывающее коррозию, инструменты, которые использовались для ее распределения нужно тщательно очистить после использования;

- Не заменяйте реагенты разных каталожных номеров или разных производителей;

- Избегайте переливания реагента или образца, используя чистые типсы для растворов и образцов;

Не используйте тестовой набор, если повреждена колба или замок-молния упаковки.

### 8. СБОР, ПОДГОТОВКА И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

#### 8.1 Сбор образцов

Образцы крови собираются путем венепункции. Следует учитывать, Поскольку на уровень ПСА в крови влияют различные факторы, доктор должен убедиться что пациенты избегали следующих условий до забора образца крови:

- Катание на велосипеде
- Половой акт(эякуляция)
- манипуляции простаты во время медицинских осмотров, таких как DRE, трансректальное ультразвуковое простаты и т. д.
- простатит
- дисфункция печени

Следующие условия могут привести к завышенным уровням ПСА

- прием 5-альфа-редуктоз-ингибитора, антиандрогена или аналога GnRH.

#### 8.2 Подготовка образцов

Подготовка образцов сыворотки или плазмы проводится по стандартным методикам. Сыворотка или плазма должны быть подготовлены как можно скорее, чтобы избежать гемолиза и улучшить стабильность ПСА.

#### 8.3 Хранение образцов

Для анализа должна использоваться свежая сыворотка или плазма. Если они не используются немедленно, их можно хранить 1 неделю при 2-8°C. При более длинном хранении их необходимо заморозить до -20 °C. Избегать повторного замораживания и оттаивания образцов.

#### Примечание:

- Сильно гемолизированные и липемические пробы могут давать неправильные аналитические результаты.

- Образцы не должны быть микробиологически загрязнены.
- Образцы, содержащие высокие титры ревматоидного фактора и антимышинные гетерофильные антитела, могут давать ошибочные результаты.

## 9. Процедура анализа

**Примечание:** Настоятельно рекомендуется проводить все измерения в дублях. При каждом измерении должна быть построена калибровочная кривая. Для получения наилучших результатов важно. Чтобы растворы всегда добавлялись в лунки в одном порядке с целью минимизации отклонений во времени инкубаций.

1. Перед использованием все реагенты, стандарты, контроли и образцы необходимо довести до комнатной температуры (18-25°).
2. Проверить даты сроков годности флаконов и планшета (включая мешочек), а также наличие повреждений.
3. Разместить требуемые лунки микропланшета. Следует учитывать, что все измерения должны проводиться в дублях. Зафиксировать местоположение лунок и соответствующих образцов, стандартов и контролей, чтобы обеспечить их распознавание в дальнейшем. Любые неиспользованные стрипы микролунок вернуть обратно в герметично запечатывающийся мешочек с осушителем, закрыть мешочек и хранить при (2-8°).
4. Раскапать по 25 мкл стандартов, контролей и образцов в каждую лунку. Образцы с ожидаемыми высокими значениями ПСА, более 25 нг/мл необходимо развести раствором для разведения.
5. Инкубировать 5 минут при комнатной температуре (18-25°С).
6. Добавить по 100 мкл конъюгата пероксидазы в каждую лунку.
7. Смешать, двигая планшет по столу (10 сек.).
8. Инкубировать при комнатной температуре 1 час (18-25°С).
9. Удалить раствор из лунок аспирацией или декантацией. При декантации постучать планшетом о промокательную бумагу, чтобы удалить оставшуюся жидкость.
10. Для промывки наполнить лунки дистиллированной водой и оставить на 15 секунд, повторить промывку 5-6 раз. Рекомендуется следующая процедура: 6 раз промыть лунки дистиллированной водой 250 мкл на лунку. Предпочтительно использовать автоматизированную процедуру промывки, проследить, чтобы промывочный раствор оставался в каждой лунке одинаковое количество времени. Это необходимо для получения минимальных значений КВ!
11. Раскапать 100 мкл раствора субстрата ТМБ в каждую лунку.
12. Инкубировать 20 минут при комнатной температуре (18-25°С).
13. Добавить 100 мкл стоп-раствора (в том же порядке, что и раствор субстрата)
14. Считать абсорбцию (ОП) при 450 нм (слепая проба при 630 нм).

## Результаты

1. Рассчитать среднее значение абсорбции для каждого дубля.
2. Вычесть среднее значение абсорбции нулевого стандарта от средних значений абсорбции стандартов, контролей и образцов.
3. Отобразить стандартную кривую на лн.-лог. графической бумаге, выводя значения абсорбции стандартов против соответствующих значений концентрации ПСА, или использовать соответствующее ПО используемого ИФА-ридера.
4. Считать и рассчитать концентрации ПСА контролей и образцов.

## 11. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

- Рекомендуется проведение внутреннего контроля для каждого анализа. Результаты контроля должны находиться в пределах установленных диапазонов и желательно, чтобы указывалась низкая, средняя и высокая концентрация.
- Риск для пациентов в основном зависит от фальшиво негативных результатов (ПСА ниже 4,0 нг/мл). По этому очень рекомендуется проводить оценку набора с помощью дополнительных средств.

## 12. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

**Общепринятый порог сопутствующих исследований:**

**Пороговое значение (cut-off):** 3,0-4,0 нг ПСА/мл

Здоровые мужчины имеют концентрацию ПСА менее 4,0нг/мл. Если концентрация ПСА равна или более 4,0 нг/мл. настоятельно рекомендуется провести последующие исследования. Эта концентрация ПСА указывает на повышенный риск рака простаты, но также может быть вызвана ДПГ.

Обратите внимание, что пороговое значение 4,0нг/мл только рекомендуемая величина. В литературе рассматривается, что модификации относительно возраста и этнологического фона могут быть полезными, например для молодых мужчин, пороговое значение должно быть ниже чем у старших. Если возможно, рекомендуется для каждой лаборатории установить свои специфические значения, которые принимают во внимание местное население в том районе, где находится лаборатория.

Важно помнить, что некоторые опухоли простаты не вызывают высокий уровень ПСА, поэтому диапазон ПСА никогда не должен заменять DRE, но должен быть использован только в сочетании с DRE.

Поскольку высокий уровень ПСА может также быть вызван незлокачественными условиями, текущими исследованиями можно попытаться увеличить диагностическую специфичность т-ПСА. В литературе, плотность, скорость ПСА и коэффициент ф-ПСА до т-ПСА рассматриваются чтобы нормализовать различность между раковыми и незлокачественными условиями и могут быть использованы для уменьшения ненужных биопсий простаты. Но только биопсия простаты может в конечном итоге показать есть ли рак простаты или нет.

**Примечание:** значения ПСА могут быть использованы только для оценки риска развития рака. Их всегда нужно интерпретировать вместе с другими клиническими результатами исследований и не должны использоваться в качестве единственной основы для диагностики рака простаты.

## 13. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

### 13.1 Предел обнаружения

Минимальный определяемый уровень:

Предел обнаружения = 0,2 нг/мл.

### 13.2 Точность

Внутренний и внешний контроль правильности проводился исследованием сывороток трех пациентов с различными концентрациями ПСА. Результаты приведены в таблице 1 и 2.

Таб. 1. Точность в анализе

Паци-енты	Кол-во репликатов	Среднее нг/мл	СО нг/мл	КВ %
1	24	12,52	0,65	6,0
2	24	3,44	0,13	3,9
3	32	0,83	0,07	8,8

Таб. 2. Точность между анализами

Пациенты	Кол-во репликатов	Среднее нг/мл	СО нг/мл	КВ %
1	4	12,28	0,82	6,7
2	4	3,33	0,266	7,98

**13.3 Восстановление**

Известное количество ПСА было добавлено в сыворотки трех пациентов, после чего были измерены восстановленные количества. Результаты показаны в таблице 3.

**Таб. 3. Восстановление**

Образец	Ожид. знач. (нг/мл)	Факт. знач. (нг/мл)	Восстановление %
1	6,30	6,40	102
2	4,67	4,56	98
3	10,10	10,91	108

**13.4 Специфичность**

Антитела, используемые в настоящем комплекте весьма специфичны для общего ПСА (свободного ПСА и ПСА-АСТ-комплекс), имеют относительно низкую кросс-реактивность с другими протеинами и полипептидами, липидами или химиотерапевтическими веществами в образцах пациентов.

**Таб. 4 Специфичность**

антигены	Добавл. кол-во	Перекрестн. реакция
<b>Белки</b>		нет
АФП	10 мкг/мл	нет
ПКФ	10 мкг/мл	нет
ХГЧ	10 мкг/мл	нет
Лактатальбумин	10 мкг/мл	нет
ПАП	1 мкг/мл	нет
<b>Интерферирующие в-ва</b>		
Билирубин	0,2 мг/мл	нет
Гемоглобин*	0,1 мг/мл	нет
Триглицеридов	15 мг/мл	нет
<b>Химиотерапевтические в-ва</b>		
Циклофосфамид	800 мкг/мл	нет
Доксорубин *НСI	20 мкг/мл	нет
Диэтилстилбестрол	2 мкг/мл	нет
Флютамид	10 мкг/мл	нет
Метолтрексат	50 мкг/мл	нет

\* более высокая концентрация гемоглобина приводит к слишком высоким значениям ОП, поэтому нужно избегать гемолитические образцы.

**13.5 «Хук-эффект» высокой дозы**

Тест был проверен на наличие высокой дозы хук-эффекта. При концентрации ПСА до 2000 нг/мл - не наблюдается. Пожалуйста, обратите внимание, что если ОП выходит за рамки стандарта для высококонцентрированных образцов, образец должен быть разбавлен до следующего измерения для получения правильных результатов.

**13.6 Корреляция**

EIA-3719 total PSA ELISA сравнивался с набором Roche ElecSys total PSA:

$$Y = 0.9644 x + 0.0741$$

В другом исследовании EIA-3719 t-PSA ELISA сравнивался с другим CE зарегистрированного PSA ELISA:

$$Y = 1.001 x, R^2=0.9704$$

**Калибровка****13.7 Калибровка**

Набор EIA-3719 total PSA ELISA откалиброван относительно стандарта ВОЗ 96/670.

**14 ЛИТЕРАТУРА**

(См. в оригинале инструкции).

**ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА:**

**ЧМП «ДИАМЕБ»**  
 Ул. Чорновола, 97, г. Ивано-Франковск, 76005  
 Тел.: (0342) 775122  
 Тел/факс: (0342) 775612  
 E-mail: info@diameb.ua  
[www.diameb.ua](http://www.diameb.ua)