



Набор ИФА для определения свободного ПРОСТАТ-СПЕЦИФИЧЕСКОГО АНТИГЕНА (ПСА)

Кат. № : EIA-4189
Количество : 96
Производитель : DRG (германия)

Методика от 09-2011
Версия 8.0

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

1. ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ

Набор ИФА Free PSA ELISA используется для количественного определения свободного простат-специфического антигена (с-ПСА) в образцах сыворотки или плазмы человека. Определение уровней с-ПСА как правило используется в сочетании с измерением общего ПСА (о-ПСА) для определения соотношения между с-ПСА и о-ПСА. Это соотношение помогает в оценке риска рака простаты и в различении между повышенными уровнями о-ПСА, вызванными раковыми или нераковыми условиями. Определения с-ПСА особенно рекомендуются для мужчин с повышенными уровнями о-ПСА и отрицательными результатами, а в сочетании с цифровым ректальным обследованием (ЦРО) используются для определения показаний к вторичной биопсии простаты.

3. ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Настоящий набор ИФА с-ПСА является твердофазным ферментомеченым иммуносорбентным анализом. Микротитрационные лунки покрыты моноклональным антителом с-ПСА, направленным против эпитопа молекулы антигена. Аликвот сыворотки пациента инкубируется в лунке, покрытой ферментным конъюгатом второго антитела (Е-Ab), направленного на другую область молекулы антитела. После инкубации несвязанное антитело (Е-Ab) вымываются, а количество связанного антитела (Е-Ab) пропорционально концентрации антигена в образце. После добавления раствора субстрата, интенсивность проявившегося окрашивания пропорциональна концентрации антигена в образце. Измеряемые оптические плотности стандартов используются для построения калибровочной кривой по которой рассчитываются неизвестные значения образцов.

4. ПОСТАВЛЯЕМЫЕ В НАБОРЕ МАТЕРИАЛЫ

Каждый набор содержит количество реагентов, достаточное для 96 определений.

1. **Микротитрационный планшет:** 12 модулей по 8 лунок каждый = 96 определений.
2. **5 стандартов-ПСА:** готовые к использованию реагенты (0,50 мл) со следующими концентрациями: 12, 6, 3, 1,5 и 0,75 нг/мл. Стандарты калибруются по стандарту ВОЗ 96/668.
3. **Нулевой стандарт/Разбавитель:** готовый к использованию реагент (10 мл).
4. **Контроль:** готовый к использованию реагент (0,50 мл) Концентрация указана на упаковке.
5. **Рабочий реагент:** готовый к использованию реагент (6 мл).
6. **Конъюгат свободного ПСА:** готовый к использованию реагент (6 мл)
7. **Промывочный буфер:** Концентрат (40X) – 25 мл. Перед использованием развести дистиллированной водой.
8. **Субстрат ТМБ:** готовый к использованию реагент (12 мл). Содержит ТМБ (тетраметилбензидин) и H_2O_2 .
9. **Стоп-раствор:** готовый к использованию реагент (12 мл). Содержит серную кислоту.

5. НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

- Прецизионные микропипетки (объем: 25 мкл и 100 мкл) с одноразовыми наконечниками.
- Дистиллированная вода.
- Фотометр ИФА с фильтрами 450 и 630 нм.
- Таймер на 60 минут или больше.
- Микропланшетный вошер (дополнительно).
- Вортекс или аналогичное смешивающее устройство.
- Контейнер для использованных остатков и образцов.

6. ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

- Хранить набор при температуре 2-8°C
- Привести к комнатной температуре 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 поставленном запечатывающемся пакете. Неиспользуемые компоненты должны всегда храниться при соблюдении этих условий.
- Убедиться, что компоненты набора не заморожены.

7. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Калибраторы 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.

Реагенты набора могут содержать азид натрия или тимеросал, которые могут быть токсичны. Азид натрия может вступать в реакцию с медными или свинец-содержащими частями трубопровода с формированием взрывчатых соединений. При утилизации смывать большим количеством воды.

Стоп раствор содержит H_2SO_4 . При контакте с кожей, обильно промыть водой и обратиться к врачу. Т.к. H_2SO_4 может вызвать коррозию, инструмент следует тщательно отмывать после использования. Данный набор предназначен только для диагностики in-vitro. Не раскапывать ртом, а так же избегать контакта реагентов набора с кожей или слизистыми оболочками. Если контакт произошел, промыть с бактерицидным мылом большим количеством воды. Не курить, не есть, не пить в рабочих помещениях. При работе надевать одноразовые латексные перчатки, после работы тщательно мыть руки. Образцы пораженные микробами могут давать ошибочный результат.

8. СБОР, ПОДГОТОВКА И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

8.1 Сбор образцов

Образцы крови собираются путем венепункции. Следует учитывать, что на уровень ПСА в крови влияют различные факторы.

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.

Примечание:

- Сильно гемолизированные и липемические пробы могут давать неправильные аналитические результаты.
- Образцы не должны быть микробиологически загрязнены.
- Образцы, содержащие высокие титры ревматоидного фактора и анти мышинные гетерофильные антитела, могут давать ошибочные результаты.

9. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

9.1 Подготовка реагентов

Перед началом анализа промывочный буфер должен быть разведен до правильной концентрации. На лунку требуется около 2 мл разбавленного буфера. Рассчитать объем буфера, необходимый для исследования. Взять 1/40 объема концентрата промывочного буфера и разбавить 39/40 объема дистиллированной воды.

9.2 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 (18-25°).

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.

- 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°).
- Раскапать по 25 мкл стандартов, контролей и образцов в каждую лунку. Образцы с ожидаемыми высокими значениями с-ПСА, более 12 нг/мл необходимо развести раствором для разведения.
- Добавить по 50 мкл рабочего реагента в каждую лунку и смешать, двигая планшет по столу (10 сек.).
- Инкубировать при комнатной температуре 1 час (18-25°С).
- Добавить по 500 мкл конъюгата в каждую лунку и смешать, двигая планшет по столу (10 сек.).
- Инкубировать при комнатной температуре 1 час (18-25°С).
- Удалить раствор из лунок аспирацией или декантацией. При декантации постучать планшетом о промокательную бумагу, чтобы удалить оставшуюся жидкость.
- Для промывки заполнить планшет разбавленным промывочным буфером и подождать 10 сек. перед тем как удалить буфер; повторить промывку 5 раз (всего 6 раз). Рекомендуется следующая процедура: 6 раз промыть лунки разбавленным промывочным буфером 250-300 мкл на лунку. Предпочтительно использовать автоматизированную процедуру промывки. При ручной промывке проследить, чтобы промывочный раствор оставался в каждой лунке одинаковое количество времени. Это необходимо для получения минимальных значений КВ!
- Раскапать по 100 мкл раствора субстрата ТМБ в каждую лунку.
- Инкубировать 15 минут при комнатной температуре (18-25°С).
- Добавить по 100 мкл/лунку стоп-раствора (в том же порядке, что и раствор субстрата)
- Считать абсорбции (ОП) при 450 нм (слепая проба при 630 нм).

9.3 Результаты

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

10. ДОСТОВЕРНОСТЬ АНАЛИЗА

- ОП 450 нм луки бланка (слепой пробы) ниже 0,150. Вышие значения указывают на загрязнение хромогена/субстрата. В этом случаи повторить анализ проверяя реагент.
- ОП 450 нм наивысшего стандарта (12 нг/мл) должна быть выше 0,9. Низшие значения указывают на ухудшение качества контроля. В этом случаи, проверить дату истечения срока годности набора перед проведением повторного анализа.
- Поставляемый контроль не должен отличаться больше чем на 15% при использовании в дубликате.
- Ниже предоставлена таблица и стандартная кривая типового анализа – не использовать для расчета фактических результатов исследования.

Лунки	Наименование	450 нм		Конц. нг/мл
1-2	Стандарт 0 нг/мл	0,011	0,009	
3-4	Стандарт 0,75 нг/мл	0,109	0,096	
5-6	Стандарт 1,5 нг/мл	0,185	0,179	
7-8	Стандарт 3,0 нг/мл	0,393	0,392	
9-10	Стандарт 6,0 нг/мл	0,871	0,837	
11-12	Стандарт 12,0 нг/мл	1,901	1,844	
13-14	Контроль	0,218	0,231	2,05

(График кривой см. в оригинале инструкции).

11. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

- Рекомендуется проведение внутренних контролей для каждого анализа.
- Результаты контроля должны находиться в пределах установленных диапазонов и должны, желательно, отображать низкие, средние и высокие концентрации.

12. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ И ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

Когда значения общего ПСА находятся между 4-10 нг/мл, соотношение с-ПСА к о-ПСА может быть использована для увеличения диагностической специфичности исследования ПСА. В общем, вероятность заболеть раком увеличивает чем ниже количество с-ПСА.

Соотношение с-ПСА к о-ПСА в 25% обычно указывает на высокую вероятность ДГП (доброкачественной гиперплазии предстательной железы). Низкий уровень с-ПСА вероятнее всего сигнализирует о раке простаты. Большинство мужчин с раком простаты имеют значение с-ПСА ниже 15%. Если свободный ПСА ниже 7% рак предстательной железы является наиболее вероятным. По данным Американского общества рака и Национального института рака мужчины с с-ПСА ниже 7% должны пройти биопсию.

Обратите внимание, что отдельно взятая концентрация с-ПСА не имеет диагностического значения.

Вышеуказанные значения представлены только в качестве указаний для пользователя. При возможности, рекомендуется для каждой лаборатории устанавливать свои определенные значения, которые принимают во внимание особенности людей, живущих в области, где расположена лаборатория.

Примечание: значения ПСА и соотношения с-ПСА к о-ПСА могут быть использованы только для оценки риска развития рака. Они всегда должны быть интерпретированы в сочетании с другими клиническими данными и не должны использоваться в качестве единственного основания для диагностики рака простаты.

13. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

13.1 Предел обнаружения

Предел обнаружения для этого набора составляет 0,1 нг/мл

13.2 Точность

Точность внутри и между анализами была установлена путем анализа трех сывороток пациентов с различными концентрациями ПСА.

Результаты показаны в Таблицах 1 и 2.

Таблица 1 Точность в анализе

Пациенты	Количество репликантов	Среднее нг/мл	СО нг/мл	КВ %
1	10	0,31	0,024	7,7
2	10	1,75	0,107	6,1
3	10	9,63	0,623	6,5

Таблица 2 Точность между анализами

Пациенты	Количество репликантов	Среднее нг/мл	СО нг/мл	КВ %
1	10	2,86	0,17	6,1
2	10	0,75	0,06	7,8
3	10	2,1	0,16	7,8

13.3 Восстановление

Насыщенные образцы сыворотки были приготовлены добавлением определенных количества образцов с чрезвычайно высоким свободным ПСА к нормальным мужским образцам сыворотки. Восстановление антигена составило в пределах 91,8 - 116% и в среднем 102%.

Таблица 3 Восстановление

Образец	Ожидаемое значение (нг/мл)	Наблюдаемое значение (нг/мл)	Восстановление %
1	5,48	5,47	99,8
	2,74	3,19	116
	5,48	5,03	91,8
2	2,78	2,81	101
	5,57	5,68	102
3	2,74	2,82	103

13.4 «Хук-эффект»

Хук-эффект не наблюдался в образцах до 5000 нг/мл.

13.5 Корреляция

Настоящий набор был сравнен с доступным набором ИФА ПСА: $Y = 0,8922x + 0,11$; $R^2 = 0,8977$

Во втором исследовании настоящий набор был сравнен с другим референтным ИФА с-ПСА: $Y = 1,0708x$; $R^2 = 0,7969$

13.6 Калибровка

Настоящий набор откалиброван по стандарту ВОЗ 96/668.

13.7 Специфичность

Антитела, используемые в этом наборе чрезвычайно специфичны к свободному ПСА, с относительно низкой перекрестной реактивностью к другим протеинам и полипептидам, липидам или химиотерапевтическим агентам, присутствующим в образцах пациента.

Таблица 3 **Специфичность**

Антигены	Внесенное количество	Перекрестная реактивность
Белки		
АФП	10 мкг/мл	Нет
РЭА	10 мкг/мл	Нет
ХГЧ	10 мкг/мл	Нет
Лактальбумин	10 мкг/мл	Нет
ПКФ	1 мкг/мл	Нет
Влияющие вещества		
Билирубин	0,2 мг/мл	Нет
Триглицерид	15 мг/мл	Нет
Гемоглобин*	0,1 мг/мл	Нет
Гемотерапевтические агенты		
Циклофосфамид	800 мкг/мл	Нет
Доксорубин * HCl	20 мкг/мл	Нет
Диэтилstilбестрол	2 мкг/мл	Нет
Флютамид	10 мкг/мл	Нет
Метотрексат	50 мкг/мл	Нет

*Более высокая концентрация ведет к завышенным значениям ОП. При этом следует избегать гемолитических образцов.

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