

НАБОР ИФА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРОСТАТИЧЕСКОГО СПЕЦИФИЧЕСКОГО АНТИГЕНА (ПСА)

4222Z, PSA

Каталог. № : 4222Z
Производитель: DAI (США)

Методика от 10-25-2013



Основой при проведении анализа является оригинал инструкции на английском языке, вложенной в набор. Номер и дата версии оригинала инструкции и перевода должны совпадать.

ОБЩАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Количество тестов	96 тестов
Тест	Простата специфичный антиген ELISA
Метод	ИФА: Твердофазный иммуносорбентный анализ
Принцип	Сэндвич-комплекс
Диапазон обнаружения	0-100 нг/мл
Образец	25 мкл
Специфичность	99 %
Чувствительность	0,5 нг/мл
Общее время	~ 45 мин.
Срок хранения	12-14 мес.

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор ИФА ПСА предназначен для количественного определения простатического специфического антигена в сыворотке человека.

ВВЕДЕНИЕ

Человеческий простат-специфический антиген (PSA) это сериновая протеаза, одноцепочный гликопротеин молекулярной массой 34 000 дальтон, вмещающий 7% карбогидрата. PSA иммунологически специфичен простатической ткани, метастатической карциноме простаты, а также простатической и семенной жидкости. PSA не присутствует ни в какой другой нормальной ткани человека, также он не продуцируется раковыми клетками груди, легких, кишечника, прямой кишки, желудка, поджелудочной и щитовидной железами. Кроме того, он функционально и иммунологически отличается от простатической кислой фосфатазы (PAP).

Увеличенный уровень сывороточного PSA был обнаружен у пациентов с раком простаты, доброкачественной гипертрофией простаты или воспалительными состояниями других соседствующих урогенитальных тканей, но не у здоровых людей, людей с неппростатической карциномой, здоровых женщин или женщин с раковыми заболеваниями. PSA является маркером ответа на лечение пациентов с раком простаты. Таким образом, определение PSA может быть важным средством для мониторинга пациентов с раком простаты и при оценке эффективности применяемого лечения.

Последние исследования также показали, что измерение PSA вместе с ректальным цифровым исследованием может быть полезным для диагностики ранних форм рака простаты.

ПРИНЦИП ИССЛЕДОВАНИЯ

Набор DRG PSA ELISA основывается на принципе твердофазового фермент-связанного иммуносорбентного анализа. Кроличье анти-ПСА покрывает поверхность лунок микропланшета, а другое моноклональное анти-ПСА антитело, меченное пероксидазой хрена, используется в качестве меченного атома. Присутствующие молекулы ПСА в растворе стандарта или сыворотке попадают в «сэндвич» между двумя антителами. Следом за формированием покрывающего комплекса антитело-антиген-антитело-фермент, несвязанный трейсер антитело-фермент удаляется промыванием. Активная пероксидаза хрена связывается в лунке, а затем анализируется колориметрической реакцией. Интенсивность развитого цвета пропорциональна концентрации ПСА в образце.

СБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Образцами должны быть кровь, сыворотка разных типов и обычные меры предосторожности должны быть соблюдены при заборе крови. Для точного сравнения с установленными нормальными значениями необходимо взять образец, полученный утром натощак. Кровь

собрать в венопункционную пробирку без добавок или антикоагулянтов. Дать крови свернуться. Образец центрифугировать для отделения сыворотки от клеток. Образцы могут храниться при 2-8°C максимум 5 дней. Если образцы не будут тестироваться в течение этого периода, они могут храниться при -20 °C до 30 дней. Избегать использования загрязненных устройств. Избегать повторного замораживания-оттаивания. При анализе в дублях необходимо 0.050 мл.

МАТЕРИАЛЫ И КОМПОНЕНТЫ

Поставляемые материалы в наборе для исследования:

- Простата-специфический антиген (PSA) 1 мл/флакон**
Шесть флаконов референсных Антигенов PSA с уровнями 0 (A), 5 (B), 10 (C), 25 (D), 50 (E) и 100 (F) нг/мл. Хранить при 2-8 °C. добавлен консервант.
Примечание: калибраторы на основе человеческой сыворотки, были откалиброваны с использованием референсного материала.
- Ферментный Реагент PSA – 13 мл/флакон**
Один флакон, содержащий ферментомеченые антитела, биотинилированные моноклональные мышиные IgG в буфере, краситель, консервант. Хранить при 2-8 °C.
- Планшет, покрытый Стрептавидином – 96 лунок**
Один 96-луночный планшет, покрытый Стрептавидином, в алюминиевой упаковке с осушителем. Хранить при 2-8 °C.
- Концентрат Промывочного раствора – 20 мл**
Один флакон, содержащий сурфактант. С добавлением консерванта. Хранить при 2-8 °C.
- Субстрат А – 7мл/флакон**
Один флакон, содержащий ТМБ в буфере. Хранить при 2-8 °C.
- Субстрат В – 7мл/флакон**
Один флакон, содержащий H₂O₂. Хранить при 2-8 °C.
- Стоп раствор – 8 мл/флакон**
Одна бутылка, содержащая сильную кислоту (1N HCl). Хранить при 2-30 °C.
- Инструкция.**

Примечание 1: Не использовать реагенты после окончания срока годности.

Примечание 2: Не подвергать нагреванию и действию прямых солнечных лучей. Открытые реагенты стабильны на протяжении 60 дней при 2-8 °C. стабильность набора и компонентов указаны на этикетке.

Примечание 3: Вышеперечисленные реагенты являются достаточными для проведения анализа на одном 96-луночном планшете.

Необходимые, но не поставляемые материалы.

- Точные пипетки объемом 25 и 50 мкл с точностью не хуже, чем 1.5 %.
- Диспенсер для пипетирования объемов 0.100 мл и 0.350 мл с точностью не хуже, чем 1.5 %.
- Микропланшетный вошер или бутылка для мытья (опционно).
- Микротитровальный планшет-ридер с длинами волн 450 нм и 620 нм.
- Промокательная бумага.
- Пленка или крышка для проведения шагов инкубации.
- Вакуумный аспиратор (опционно) для шагов промывки.
- Таймер.
- Материалы контроля качества.

ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

- Промывочный буфер**
Разбавьте содержимое промывочного концентрата до 1000 мл с дистиллированной или деионизированной водой в контейнере, подходящем для хранения. Хранить при 20-27 °C до 60 дней.
- Раствор Рабочего субстрата**
Перелить содержимое янтарного флакона с Раствором А в прозрачную пробирку Раствора В. Закрывать прозрачный флакон желтой крышкой для легкой идентификации. Смешать и пометить соответственно. Хранить при 2-8 °C.

Примечание 1: не использовать рабочий субстрат, если он приобрел синий окрас.

Примечание 2: не использовать загрязненные реагенты.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

Перед началом анализа приведите все реагенты, сыворотку стандарты и контроли к комнатной температуре (20-27°C).

- Приготовьте лунки микропланшета для каждого стандарта сыворотки, контроля и образца для анализа в дубликаты. **Не использованные полоски вставьте назад в пакет из фольги, запечатайте и храните при 2-8°C.**
- Пипетировать 0,025 мл (25 мкл) соответствующей референтной сыворотки, контроля или образца в помеченные лунки.

- Добавьте 0,100 мл (100 мкл) PSA ферментного реагента во все лунки. **Очень важно пипетировать все реагенты на дно лунок.**
- Покачайте осторожно микропланшетом 20-30 сек. чтобы перемешать и накройте.
- Инкубируйте 30 мин. при комнатной температуре.
- Удалите содержимое микропланшета декантацией или аспирацией. Промокните планшет промокающей бумагой, в случае декантации.
- Добавьте 350 мкл промывочного буфера (см. раздел подготовки реагента), декантируйте (постучите и удалите) или аспирируйте. Повторите процедуру еще два (2) раза, чтобы вместе получилось три (3) промывания. **Может использоваться автоматическое или ручное устройство для промывания. При этом следуйте руководству по эксплуатации производителя для точной процедуры промывания. При использовании бутылки со сдвливанием, наполните каждую лунку при сдвливании контейнера (избегайте воздушных пузырей). Декантируйте промыватель и повторите еще дважды.**
- Добавьте 0,100 мл (100 мкл) раствора рабочего субстрата во все лунки в том самом порядке для минимизирования расхождения времени реакции между лунками. **НЕ ВСТРЯХИВАТЬ ПЛАНШЕТ ПОСЛЕ ДОБАВЛЕНИЯ СУБСТРАТА**
- Инкубируйте при комнатной температуре 15 мин.
- Добавьте 0,050 мл (50 мкл) стоп раствора в каждую лунку и аккуратно перемешайте 15 – 20 сек. **Всегда добавлять реагенты в одном порядке, чтобы минимизировать разницу времени реакции между лунками.**
- С помощью микропланшетного считывателя измерьте абсорбцию в каждой лунке при 450 нм (при использовании референтной длины волны при 620-630 нм для минимизации дефектности лунок). **Результаты должны считаться в течении 30 минут после добавления стоп раствора.**

ВЫЧИСЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для получения концентрации PSA в неизвестных образцах используется кривая ответной дозы.

- Пометьте абсорбцию, полученную с распечатки микропланшетного считывателя, как указано в примере 1.
- Отметьте абсорбцию для каждого дубликата стандартной сыворотки против соответствующей концентрации PSA в нг/мл на линейной графической бумаге (не вычисляйте среднее дубликатов стандартов сыворотки).
- Проведите оптимальную кривую через отмеченные точки.
- Для определения концентрации PSA в неизвестных образцах, отметьте среднюю абсорбцию дубликатов каждого неизвестного на вертикальной оси графика (дубликаты неизвестного могут быть усреднены как указано ниже). В последующем примере средняя абсорбция составляет 1,142 (пересекает калибровочную кривую в 23,6 нг/мл концентрации PSA).

Пример 1(См. оригинал инструкции на англ. языке).

Приведенные данные только для иллюстрации и не могут использоваться для вычисления результатов анализа. **Приписанные значения калибраторов зависят от их серии.** (Пример калибровочной кривой см. в оригинале инструкции)

ПАРАМЕТРЫ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА

Для того, чтобы результаты анализов считались действительными, они должны соответствовать следующим критериям:

- Абсорбция OD калибратора F должна составлять ≥ 1.3 .
- Четыре из 6 объединений контролей качества должны находиться в установленных пределах.

АНАЛИЗ РИСКА

А. Характеристики анализа

- Не должны использоваться микробиологически загрязненные, высоко липемические или гемолизированные образцы.
- Важно, чтобы время реакции для каждой лунки было стабильно. Пипетирование образцов не должно превышать 10 мин. Если используется более чем один планшет, необходимо строить еще одну кривую.
- Добавление раствора субстрата провоцирует кинетическую реакцию, которая останавливается добавлением стоп раствора. Поэтому добавление стоп раствора и субстрата нужно проводить с той самой частотой, чтобы не допускать часовую девиацию во время реакции.
- Планшетный ридер измеряет вертикально. Не дотрагивайтесь до дна ячеек.

- Неправильное удаление раствора при аспирации или декантации на шаге промывания может привести к неточным результатам.
- Образцы пациентов с концентрациями больше 100 нг/мл могут быть разведены (например, 1:10 или выше). Полученный результат умножить на коэффициент разведения.

В. Интерпретация

- Проведение анализа и интерпретация результатов должны быть сделаны опытными профессионалами.**
- Результаты лабораторных исследований не должны быть единственным аспектом для постановки диагноза.
- Для получения действительных результатов, значения контролей и другие параметры должны находиться в установленных диапазонах.
- При перемешивании содержимого из разных наборов компания не несет ответственности за полученные ложные результаты.
- Если используется программное обеспечение, важно, чтобы значения попадали в диапазон 10 % от установленных значений.

РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Точность

Точность внутри и между анализами была определена при анализе трех разных уровней контрольных сывороток. Полученные данные показаны в Таблицах 2 и 3.

Таблица 2 Точность в анализе (значения в нг/мл)

Образец	Кол-во	Среднее	СО	КВ, %
Низкий	20	0.7	0.05	7.1
Нормальный	20	4.5	0.20	4.4
Высокий	20	28.3	1.07	3.7

Таблица 3 Точность между анализами (значения в нг/мл)

Образец	Кол-во	Среднее	СО	КВ, %
Низкий	10	0.8	0.09	11.3
Нормальный	10	4.3	0.25	5.8
Высокий	10	27.5	1.42	5.2

*Все измерения проводились в 10 экспериментах в дубликате.

Чувствительность

Чувствительность набора составляет 0,012 нг/мл. это эквивалент образца, содержащего 0.5 нг/мл PSA.

Соответствие

Настоящий набор был сравнен с референсным ИФА тестом. Были оценены образцы с низкой, нормальной и высокой концентрациями. Общее число образцов 241. Уравнение квадратной регрессии и коэффициент корреляции были компьютеризированы и сравнены с установленным методом. Полученные данные показаны Таблице 4.

Таблица 4

Метод	Среднее (x)	Анализ наименьшей квадратной регрессии	Коефф. корреляции
Данный метод (Y)	5.62	$y = -0.0598 + 0.98(x)$	0.987
Референсный (X)	5.57		

Только незначительное количество показало расхождение между методами. Уравнение квадратной регрессии и коэффициент корреляции указывают на отменную согласованность методов.

Специфичность

Перекрестная реактивность не наблюдалась в работе данной системы при добавлении больших количеств следующих веществ в пулированную человеческую сыворотку.

Вещество	Концентрация
Ацетилсалициловая кислота	100 мкг/мл
Аскорбиновая кислота	100 мкг/мл
кофеин	100 мкг/мл
CEA	10 мкг/мл
AFP	10 мкг/мл
CA-125	1000 МЕд/мл
hCG	10 МЕд/мл
hTSH	100 МЕд/мл
hPRL	100 мкг/мл

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Каждая лаборатория должна анализировать контроли с низким, нормальным и высоким диапазоном для мониторинга характеристик анализа. Эти контроли нужно обрабатывать как неизвестные и определять значения в каждой процедуре теста. Нужно построить

таблицу контроля качества для характеристик поставляемых реагентов. Для установлений тенденций, нужно использовать статистические методы изучения пациентов. Существенное отклонение от установленных характеристик может показывать небольшие изменения при экспериментальных условиях или деградации реагентов набора. Свежие реагенты должны быть использованы для определения причины вариаций.

ОЖИДАЕМЫЕ ДИАПАЗОНЫ ЗНАЧЕНИЙ

У здоровых мужчин ожидаемые значения составляют 4 нг/мл.

Таблица 1

Ожидаемые значения для PSA тестовой системы ИФА в нг/мл	
Здоровые мужчины	< 4

Важно помнить, что установленные границы ожидаемых значений для «нормальной» популяции зависит от многих факторов: специфичность метода, тестируемой популяции, точности метода. Поэтому, каждая лаборатория должна устанавливать собственные границы. До того как такие границы установлены, лаборатория должна полагаться на границы, установлены производителем.

ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

1. Для использования в in-Vitro диагностике.
2. Не для внешнего или внутреннего использования на людях или животных.



ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

ООО «ДИАМЕБ»
ул.Чорновола, 97
г. Ивано-Франковск, 76005
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com