

# НАБОР ИФА ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОБЩЕГО ПРОСТАТСПЕЦИФИЧНОГО АНТИГЕНА

## CAN-tPSA-4300, Total PSA

Каталог. № : **CAN-L-4260**  
Производитель: **Diagnostics Biochem  
Canada Inc., (Канада)**

Методика от **22-12-2010**  
Версия **9.0**



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

### **ВВЕДЕНИЕ**

Набор предназначен для количественного определения Общего ПСА в сыворотке человека методом иммуноферментного анализа. Только для исследовательских целей. Не для использования в диагностике *in-vitro*.

### **ПРИНЦИП МЕТОДА**

Данный метод основан на иммуноферментном анализе типа «сэндвич». Анализ использует два высоко специфичных моноклональных антитела: моноклональное антитело, специфичное для Общего ПСА, иммобилизовано в лунках микропланшета, и другое моноклональное антитело, специфичное для другой области ПСА, конъюгировано с пероксидазой хрена (HRP). Общий ПСА в образцах и стандартах связывается на планшете, вымывается и последовательно инкубируется с HRP конъюгатом. После второго шага промывки добавляется ферментный субстрат. Ферментная реакция останавливается добавлением стоп раствора. Абсорбция измеряется с помощью микропланшетного ридера. Интенсивность цвета прямо пропорциональна концентрации Общего ПСА в образце.

Набор стандартов используется для построения стандартной кривой, из которой определяется количество Общего ПСА в образце пациента и контролях.

**КЛИНИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ** (См. оригинал инструкции).

### **ЗАМЕЧАНИЯ ПО ПРОЦЕДУРЕ МЕТОДА И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ**

1. Для успешного проведения анализа необходимо полное понимание данной инструкции пользователями. Достоверные результаты могут быть получены только при строгом и тщательном соблюдении данной инструкции, поставляемой с набором.
2. Контрольные материалы или пулы сывороток, с высоким и низким значениями, должны быть включены в каждую постановку для оценки достоверности результатов.
3. Используйте деионизированную или дистиллированную воду, там, где в инструкции указано использование воды для разведения или растворения.
4. Для снижения контакта с потенциально вредными веществами использовать одноразовые перчатки при работе с реагентами и образцами.
5. Все образцы и реагенты набора должны достичь комнатной температуры и быть аккуратно, тщательно перемешаны перед использованием. Избегайте повторных замораживания и оттаивания образцов и реагентов.
6. Калибровочная кривая должна быть включена в каждую постановку.
7. Контроли (входят в набор) должны включаться в каждый анализ и попадать в установленные границы.
8. Неточное соблюдение процедур, техники анализа, неточное пипетирование, неполные промывки, а также несоблюдение условий хранения реагентов набора может привести к недостоверным результатам, к тому, что результат, полученный для контроля, не попадет в диапазон допустимых значений.
9. Присутствие пузырьков воздуха в лунках микропланшета влияет на результаты при считывании оптической плотности (ОП) с использованием микропланшетного анализатора. Перед считыванием результатов тщательно удалите все пузырьки с поверхности жидкости.
10. Раствор субстрата (ТМВ) чувствителен к свету и должен оставаться бесцветным при правильном хранении.

Нестабильность или загрязнение реагента могут проявиться в виде окрашивания реагента в зеленый цвет. В этом случае реагент использовать нельзя.

11. При внесении субстрата и стоп-раствора не используйте пипетки, в которых эти растворы могли бы контактировать с металлическими частями.
12. Для предотвращения контаминации реагентов и образцов используйте новые одноразовые сменные наконечники для каждого реагента, контроля, стандарта или образца.
13. Не смешивайте и не используйте реагенты из других наборов или лотов, не используйте набор после истечения срока годности, указанного на этикетке.
14. Реагенты набора должны считаться опасными веществами и с ними необходимо работать, соблюдая принятые в лаборатории правила безопасности.

### **ОГРАНИЧЕНИЯ**

1. Все реагенты, входящие в состав набора, предназначены для непосредственного определения Общего ПСА в сыворотке человека. Данный набор не предназначен для определения Общего ПСА в слюне, плазме или других образцах человеческого или животного происхождения.
2. Не используйте образцы с сильным гемолизом, липемией, желтухой, или неправильно хранившиеся образцы.
3. Любые образцы или контрольные сыворотки, содержащие азид натрия или тимерозал, не совместимы с данным набором. Их анализ может привести к ложным результатам.
4. Только Калибратор А может быть использован для разведения образцов с высоким содержанием сыворотки. Использование любого другого реагента может привести к получению ложных результатов.
5. Результаты, полученные с помощью данного набора, никогда не должны использоваться как единственное основание для постановки диагноза. Например, присутствие гетерофильных антител у пациентов, регулярно контактирующих с животными или с материалами животного происхождения, потенциально может влиять на результаты иммунологического анализа. Следовательно, клиническая диагностика должна базироваться на полном обследовании пациента, учитывая, в том числе, интенсивность контактов с животными/продуктами, если можно подозревать ложные результаты.
6. Некоторые индивидуумы могут иметь антитела к мышиному белку, что может интерферировать с данным анализом. Поэтому полученные результаты интерпретировать с осторожностью.
7. Уровни ПСА в сыворотке не следует интерпретировать как абсолютное доказательство наличия или отсутствия ракового заболевания.
8. Вероятность выявления ПСА может быть снижена из-за проведения гормонального лечения ПСА. Как результат, низкое значение ПСА не может адекватно отражать наличие или протекание заболевания.

### **МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ БИООПАСНЫХ МАТЕРИАЛОВ**

Сыворотка человека, которая могла быть использована при приготовлении стандартов и контролей, была протестирована с отрицательными результатами на содержание поверхностного антигена гепатита В, антител к ВИЧ и вирусу гепатита С. Однако не существует метода, полностью гарантирующего отсутствие таких инфекционных агентов как ВИЧ, гепатит В, С и других. Таким образом, реагенты должны рассматриваться как биологически опасные материалы и обращаться с ними необходимо в соответствии с нормами, принятыми в лаборатории для образцов крови. Все реагенты должны рассматриваться как биологически опасные материалы и обращаться с ними необходимо в соответствии с нормами, принятыми в лаборатории для образцов крови.

### **ХИМИЧЕСКАЯ ОПАСНОСТЬ**

Избегайте контактов с реагентами, содержащими ТМВ, перекись водорода и соляную кислоту. При контакте с такими реагентами тщательно промойте место контакта большим количеством воды. ТМВ может быть канцерогенным веществом.

### **ЗАБОР И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦА**

Для проведения анализа в дублях необходимо приблизительно 0.1 мл сыворотки. Соберите 4-5 мл крови в соответствующую надписанную пробирку и дайте ей свернуться. Центрифугируйте и аккуратно соберите сыворотку. Храните при 4 °С не более 24 часов или при -10 °С или ниже, если анализ будет проводиться позже. Считайте все образцы крови человека потенциально инфекционно опасными и обращайтесь с ними с соответствующими предосторожностями.

## ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Данный анализ является прямой системой; предварительная подготовка образцов не требуется.

## ТРЕБУЕМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ РЕАГЕНТЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

1. Высокоточные пипетки на 25, 50, 100 и 300 мкл.
2. Одноразовые сменные наконечники.
3. Деионизированная или дистиллированная вода.
4. Шейкер.
5. Микропланшетный фотометр с длиной волны измерения 415 нм и верхним пределом ОП 3.0 или выше.

## ПОСТАВЛЯЕМЫЕ РЕАГЕНТЫ

1. **Микропланшет, покрытый мышинными антителами к анти-ПСА (с «ломаемыми» стрипами)** - готовый к использованию. Содержит: 96-ячеечный микропланшет (8x12), покрытый моноклональными антителами в закрываемом пакете с осушителем. Хранение: охлажденным при 2 – 8 °С. Стабильность: 12 месяцев или до срока годности, указанного на этикетке.
2. **Концентрат Конъюгата Мышиное Анти-ПСА Антитело-Пероксидаза хрена**. Содержимое: Одна бутылка, содержащая моноклональные антитела анти-ПСА, конъюгированные с HRP, в белковом буфере с консервантом, не содержащим ртути. Объем: 300 мкл/флакон. Хранение: охлажденным при 2 – 8 °С. Стабильность: 12 месяцев или до срока годности, указанного на этикетке. Приготовление: Перед использованием развести в соотношении 1:50 в рабочем буфере (например, 40 мкл HRP в 2 мл рабочего буфера). При использовании всего микроплшета разведите 240 мкл HRP в 12 мл рабочего буфера. Разведенный неиспользованный конъюгат должен быть выброшен.
3. **Калибраторы ПСА** – готовы к использованию. Содержание: 6 флаконов, содержащих ПСА в буфере на основе сыворотки человека, с консервантом, не содержащим ртути. Приготовлены добавлением известных количеств ПСА в сыворотку. Калиброваны по 1-му Стандарту IS96/670 (90:10) ВОЗ. \*В таблице приведены приблизительные концентрации, точные значения указаны на этикетках флаконов.

Стандарт	Концентрация (нг/мл)	Объем/в пробирке
Стандарт А	0	2.0 мл
Стандарт В	0.5	0.5 мл
Стандарт С	2	0.5 мл
Стандарт D	10	0.5 мл
Стандарт E	40	0.5 мл
Стандарт F	100	0.5 мл

Хранение: охлажденным при 2 – 8 °С

Стабильность: Не вскрытый при 2-8 °С 12 месяцев или как указано на этикетке. После вскрытия использовать стандарты в течение 14 дней, или аликвотировать и заморозить. Избегать повторных циклов заморозки-оттаивания.

4. **Контроли** – готовы к использованию. Содержимое: 2 флакона, содержащие ПСА в буфере на основе сыворотки человека, с консервантом, не содержащим ртути. Приготовлены с добавлением определенного количества ПСА в сыворотку. Допустимый диапазон указан на этикетке флакона. Объем: 0.5 мл во флаконе. Хранение: охлажденным при 2 – 8 °С. Стабильность: Не вскрытый 12 месяцев или как указано на этикетке. После вскрытия использовать стандарты в течение 14 дней, или аликвотировать и заморозить. Избегать повторных циклов заморозки-оттаивания.
5. **Концентрат Промывочного Буфера** – требует подготовки. Содержание: 1 бутылочка, содержащая буфер с неионным детергентом и консервантом, не содержащим ртути. Объем: 50 мл в бутылочке. Хранение: охлажденным при 2 – 8 °С. Стабильность: 12 месяцев или как указано на этикетке. Приготовление: Развести в соотношении 1:10 дистиллированной или деионизированной водой перед использованием. Если для анализа используется весь микропланшет, разведите 50 мл концентрата промывочного буфера в 450 мл воды.
6. **Рабочий буфер** – готов к использованию. Содержание: 1 флакон, содержащий белковый буфер с консервантом, не содержащим ртути. Объем: 30 мл во флаконе.

Хранение: охлажденным при 2 – 8 °С

Стабильность: 12 месяцев или как указано на этикетке.

7. **Субстрат ТМБ** – готов к использованию. Содержание: 1 флакон, содержащий тетраметилбензидин и перекись водорода в не-DMF или DMSO содержащем буфере. Объем: 16 мл во флаконе. Хранение: охлажденным при 2 – 8 °С. Стабильность: 12 месяцев или как указано на этикетке.
8. **Стоп-раствор** - готов к использованию. Содержание: 1 флакон, содержащий 1M серной кислоты. Объем: 6 мл во флаконе. Хранение: охлажденным при 2 – 8 °С. Стабильность: 12 месяцев или как указано на этикетке.

## ПРОЦЕДУРА МЕТОДА

Подготовка образцов:

### Нem.

Все реагенты должны достичь комнатной температуры перед использованием. Калибраторы, контроли и образцы должны анализироваться в дублях. Вся процедура анализа должна проводиться непрерывно.

1. Приготовьте рабочие растворы конъюгата анти-ПСА-HRP и промывочного буфера.
2. Выберите необходимое для анализа число стрипов, неиспользованные стрипы снова верните в пакет с осушителем, запечатайте и поместите в холодильник.
3. Внесите по 25 мкл каждого калибратора, контроля и образца в соответствующим образом помеченные ячейки, в дублях.
4. Внесите по 100 мкл рабочего буфера во все ячейки (рекомендуется использовать многоканальную пипетку).
5. Инкубируйте 1 час при комнатной температуре на шейкере (приблизительно 200 об/мин).
6. Промойте ячейки 3 раза, используя по 300 мкл разведенного буфера для промывок на ячейку, а затем постучите микропланшетом по фильтровальной бумаге, убедитесь, что ячейки сухие (рекомендуется использовать автоматическое промывающее устройство).
7. Внесите по 100 мкл конъюгата рабочего раствора во все ячейки (рекомендуется использовать многоканальную пипетку).
8. Инкубируйте 30 минут при комнатной температуре на шейкере (приблизительно 200 об/мин).
9. Промойте ячейки снова как указано в шаге 6.
10. Внесите с одинаковой скоростью по 100 мкл раствора ТМБ субстрата в каждую ячейку.
11. Инкубируйте в течение 10 – 15 минут при КТ (или до тех пор, пока калибратор F не достигнет темно-синего цвета, для получения желаемой ОП).
12. Внесите по 50 мкл стоп-раствора во все ячейки, в той же последовательности и с той же скоростью, как и в шаге 10.
13. Определите оптическую плотность ячеек с помощью микропланшетного ридера при длине волны 450 нм в течение 20 минут после внесения стоп - раствора.

\* Если ОП превышает верхний предел определения ридера, или невозможно использовать фильтр 450 нм, можно проводить измерения при 405 нм или 415 нм. При этом ОП будет ниже, но это не повлияет на конечные результаты анализа.

## РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

1. Рассчитать среднее значение оптической плотности дублей для каждого калибратора.
2. Рассчитать среднее значение оптической плотности дублей для каждого образца.
3. Отнять среднее значение плотности нулевого калибратора из средних значений калибраторов, контролей и образцов сыворотки.
4. Построить калибровочную кривую, используя полулогарифмическую бумагу, откладывая по оси Y среднее значение оптической плотности стандартов, а по оси X - их концентрацию. Если возможно, рекомендуется использование программного обеспечения для построения 4-параметрической или 5-параметрической калибровочной кривой.
5. Определить значения концентрации анализа в образцах непосредственно из калибровочной кривой.
6. Если получены результаты со значениями, больше чем 100 нг/мл, разбавить образец Калибратором А не больше, чем 1:8. Результат умножить на коэффициент разведения.

## ТИПИЧНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ, СВЕДЕННЫЕ В ТАБЛИЦУ

Стандарт	ОП 1	ОП 2	Средняя ОП	Значение (нг/мл)
A	0.095	0.090	0.093	0
B	0.164	0.156	0.160	1

C	0.343	0.345	0.344	4
D	0.658	0.688	0.673	10
E	1.958	1.857	1.908	40
F	2.869	2.790	2.830	100
Неизвестный	0.295	0.289	0.292	3.3

**ПРИМЕР ТИПИЧНОЙ КАЛИБРОВОЧНОЙ КРИВОЙ** (См. оригинал инструкции).

Приводится только в демонстрационных целях и не должен использоваться для расчета результатов.

#### РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

##### Чувствительность

Предел обнаружения (LoD) для Общего ПСА составил **0.1 нг/мл**.

##### Воспроизводимость внутри серии

2 образца были проанализированы 10 раз каждый, по одной калибровочной кривой. Результаты (в нг/мл) приведены ниже:

Образец	Среднее	SD	CV%
1	5.59	0.02	6.1
2	22.89	0.06	4.6

##### Воспроизводимость между сериями

2 образца анализировали 10 раз каждый в течение 4 недель.

Результаты (в нг/мл) приведены в таблице:

Образец	Среднее	SD	CV%
1	0.92	0.09	9.5
2	3.64	0.14	3.8

##### Восстановление

Насыщенные образцы были приготовлены добавлением определенного количества ПСА к трем образцам сывороток пациента. Результаты (в нг/мл) приведены ниже в таблице:

Образец	Полученное значение	Ожидаемое значение	% Восстановления
1 Ненасыщенный	7.00	--	--
	+ 0.86	7.86	99.1
	+ 9.43	16.43	99.9
	+ 26.57	33.57	118.1
2 Ненасыщенный	2.72	--	--
	+ 2.08	4.80	96.8
	+ 10.65	13.37	111.9
	+ 27.8	30.52	114.4
3 Ненасыщенный	14.26	--	--
	+ 7.35	21.61	94.0
	+ 24.49	38.75	102.8
	+ 32.15	46.41	102.3

##### Линейность

Три образца сыворотки пациента серийно разводили с Калибратором А. Результаты (в нг/мл) приведены ниже:

Образец	Полученное значение	Ожидаемое значение	% Восстановления
1	39.66	--	--
	1:2	19.83	92.4
	1:4	9.92	90.0
	1:8	4.96	91.9
2	34.92	--	--
	1:2	17.46	101.9
	1:4	8.73	93.5
	1:8	4.36	93.6
3	47.49	--	--
	1:2	23.75	97.9
	1:4	11.87	108.7
	1:8	5.94	112.3

##### Сравнительные исследования

Данный метод dbc Общий ПСА ELISA (y) был сравнен с другим конкурентным методом (набор x). При анализе 168 образцов сывороток была получена следующая линейная регрессия:

$$y = 0.7972x + 0.8551$$

$$r=0.9837$$

##### Эффект высокой дозы

При концентрациях ПСА до 1000 нг/мл хук-эффект не наблюдался.

#### Ожидаемые нормальные значения

Как и для всех клинических анализов, каждая лаборатория должна самостоятельно установить свой собственный диапазон ожидаемых нормальных значений. Исследования ожидаемого диапазона нормальных значений у практически здоровых (n=96) мужчин и женщин в возрасте 3-70 лет дали следующие результаты (в нг/мл):

Группа	Диапазон
Мужчины и женщины (3-70 лет)	Все < 4.0



#### ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

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