

НАБОР ИФА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СВОБОДНОГО ПРОСТАТ-СПЕЦИФИЧЕСКОГО АНТИГЕНА (ПСА)

EIA-4189, Free PSA ELISA

Каталог. № : EIA-4189
Количество : 96
Производитель: DRG (Германия)

Методика от 11-2012
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.

1. ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ

Набор ИФА Free PSA ELISA используется для количественного определения свободного простат-специфического антигена (с-ПСА) в образцах сыворотки или плазмы человека. Определение уровня 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 фермент-меченым 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 (E-Ab), направленного на другую область молекулы антитела. После инкубации несвязанное антитело (E-Ab) вымываются, а количество связанного антитела (E-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. **Нулевой стандарт/Разбавитель:** готовый к использованию реагент (10 мл). Содержит консервант.
3. **Стандарты (1-5):** пять флаконов, 0,5 мл, готовые к использованию реагенты со следующими концентрациями: 12, 6,0, 3,0, 1,5 и 0,75 нг/мл. Стандарты калибруются по стандарту ВОЗ 96/668. Содержат консерванты.
4. **Контроль Высокий и Низкий:** 2 флакона, готовы к использованию, (0,5 мл). Концентрация указана на упаковке. Содержат консерванты.
5. **Рабочий реагент:** 1 флакон, 6 мл, готов к использованию. Содержит консервант.
6. **Ферментный Конъюгат,** 1 флакон, 6 мл, готов к использованию. Содержит консервант.
7. **Субстрат ТМБ,** 1 флакон, 12 мл, готов к использованию.
8. **Стоп-раствор,** 1 флакон, 14 мл, готов к использованию. Содержит 0,5 М H₂SO₄.
9. **Промывочный буфер,** 1 флакон, 25 мл, Концентрат (40X). Перед использованием развести дистиллированной водой.

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 поставляемом запечатывающемся пакете. Неиспользуемые компоненты должны всегда храниться при соблюдении этих условий.
- Убедиться, что компоненты набора не заморожены.
- Вскрытые наборы остаются стабильными на протяжении 8 недель при хранении в надлежащих условиях.

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 H₂SO₄. При контакте с кожей, обильно промыть водой и обратиться к врачу. Т.к. H₂SO₄ может вызвать коррозию, инструмент следует тщательно отмывать после использования. Данный набор предназначен только для диагностики in-vitro. Не раскапывать рот, 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 венопункции. Следует учитывать, что на уровень ПСА в крови влияют различные факторы. (См. оригинал инструкции).

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. Образцы должны анализироваться в течение 24 часов. При более длинном хранении их необходимо заморозить до -20 °C. Избегать циклов повторного замораживания-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 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°).

- Проверить даты сроков годности флаконов и планшета (включая мешочки), 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 50 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. Высшие значения указывают на загрязнение хромогена/субстрата. В этом случае 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 случае, проверить дату истечения срока годности набора перед проведением повторного анализа.
- Поставляемый контроль не должен отличаться больше чем на 15% при использовании в дубликаты.
- Ниже предоставлена таблица и стандартная кривая типового анализа – не использовать для расчета фактических результатов исследования.

Лунки	Наименование	450 нм		Конц. нг/мл
		0,011	0,009	
1-2	Стандарт 0.00 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, желательнее, 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 использовано 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

12.3 Восстановление

Насыщенные образцы сыворотки были приготовлены добавлением определенного 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
2	5,48	5,03	91,8
	2,78	2,81	101
3	5,57	5,68	102
	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.



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
www.diameb.com

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		Нет
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.

14 ПРАВОВЫЕ ВОПРОСЫ

14.1 Надежность результатов

Тест должен проводиться в точном соответствии инструкциям производителя. Более того, пользователь должен строго придерживаться правил НЛП (надлежащей лабораторной практики), Это особенно важно при использовании контрольных реагентов. Важно всегда включать соответствующее количество контролей при тестировании для подтверждения соответствия и точности теста. Результаты теста действительны только, если все контроли находятся в указанных диапазонах, и если все другие параметры теста также в указанных диапазонах. В случае, когда Вы сомневаетесь, обратитесь к производителю.

14.2 Терапевтические результаты

Терапевтические результаты не должны основываться только на лабораторных данных, даже если все результаты теста соответствуют значениям, указанным в п.11.1. Любой лабораторный результат является только частью клинической картины.

Диагностика инфекционного заболевания не должна основываться на результатах только одного теста. Точный диагноз должен быть поставлен с учетом истории болезни, симптоматики и серологических данных.

Только результаты теста не могут быть основой для терапевтических заключений.

14.3 Ответственность

Любая модификация тестового набора и/или замена или перемена любых компонентов тестового набора могут отрицательно повлиять на результаты теста. Такие действия не дадут права на замену набора.

Любые претензии, связанные с неверной интерпретацией лабораторных результатов, также недействительны. Производитель не несет ответственности за повреждения во время транспортировки.