

СОДЕРЖАНИЕ

1. НАЗНАЧЕНИЕ	2
2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА	3
3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	3
4. СОСТАВ НАБОРА	4
5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	5
6. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ	5
7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА	5
8. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА	6
9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА	7
10. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ И НОРМЫ	8
11. ЛИТЕРАТУРА	9

CONTENT

1. INTENDED USE	10
2. SUMMARY AND EXPLANATION	10
3. PRINCIPLE OF THE TEST	11
4. WARNINGS AND PRECAUTIONS	11
5. KIT COMPONENTS	12
6. SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE	13
7. TEST PROCEDURE	13
8. QUALITY CONTROL	15
9. CALCULATION OF RESULTS	15
10. EXPECTED VALUES	16
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	16
12. LITERATURE	16

Инструкция составлена Руководителем службы клиентского сервиса ООО «ХЕМА»,
к. б. н. Д. С. Кострикиным

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОБЩЕГО ПРОСТАТАСПЕЦИФИЧЕСКОГО АНТИГЕНА В СЫВОРОТКЕ (ПЛАЗМЕ) КРОВИ «общий ПСА-ИФА»

Рекомендована к утверждению Научно-экспертным Советом по медицинским изделиям

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «общий ПСА-ИФА» предназначен для количественного определения концентрации общего ПСА в сыворотке (плазме) крови методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Простатаспецифический антиген (ПСА) – гликопротеин с молекулярной массой 34 кДа, состоящий из одной полипептидной цепи, был обнаружен в эпителиальных клетках нормальной простаты. Его концентрация в крови повышается при доброкачественной гиперплазии и злокачественном перерождении ткани простаты, а также при метастатическом раке простаты. ПСА является сериновой протеазой из семейства калликреинов, его точное название по энзимологической классификации – прекалликреин 3. Высокие концентрации ПСА наблюдаются в молочной железе при лактации и грудном молоке, поэтому данный белок нельзя считать строго специфичным для простаты. В сыворотке крови ПСА находится преимущественно в комплексе с антипротеазами – анти-химотрипсином, альфа-2-макроглобулином и антитрипсином. Часть ПСА (свободный ПСА) находится вне этих комплексов. Пара антител, используемых в данной тест-системе (PS2-PS6), равномерно (эквивалентно) распознает обе формы ПСА – свободную и связанную, что подтверждено результатами независимых исследований в Университете Турку, Финляндия. У больных аденокарциномой простаты определяется повышение концентрации ПСА даже на ранних стадиях болезни. У больных с выраженным заболеванием отмечена концентрация ПСА 1000 нг/мл и выше. Клиническая значимость данного определения заключается в возможности контроля и прогноза прогрессирования заболевания. Нарастающее или устойчивое повышение концентрации ПСА, свидетельствуют об опухолевой прогрессии и неэффективности терапии. Интерпретацию данных необходимо проводить с учетом других клинических данных. Важную дополнительную информацию для дифференциальной диагностики доброкачественных и злокачественных заболеваний простаты позволяет получить определение соотношения свПСА/обПСА. При этом необходимо учитывать возраст пациента и анамнез: так, у мужчин до 60 лет соотношение рекомендуется определять при уровне обПСА выше 4 нг/мл; при этом следует иметь в виду, что существенное – выше 15 нг/мл – повышение уровня обПСА может наблюдаться не только при злокачественном перерождении ткани простаты, но и при простатите и массаже

предстательной железы (по данным ООО «ХЕМА» – до 20 нг/мл и до 80 нг/мл соответственно), а также при эякуляции накануне исследования. У мужчин старше 60 лет, когда доброкачественная гиперплазия наблюдается практически у всех, уровень ПСА до 7 нг/мл целесообразно рассматривать как нормальный, и соотношение свПСА/ПСА определять, начиная с 7 нг/мл. Внимание: при определении соотношения необходимо пользоваться наборами одной фирмы! Данный набор предназначен для использования с набором «свПСА-ИФА» ООО «ХЕМА», кат. № К231.

2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

Определение общего ПСА основано на использовании «сэндвич»-варианта твердофазного иммуноферментного анализа. На внутренней поверхности лунок планшета иммобилизованы мышинные моноклональные антитела к общему ПСА человека. В лунках планшета, при добавлении исследуемого образца, происходит связывание общего ПСА, содержащегося в исследуемом образце, с антителами на твердой фазе. Образовавшийся комплекс выявляют с помощью конъюгата мышинных моноклональных антител к общему ПСА человека с пероксидазой хрена. В результате образуется связанный с пластиком «сэндвич», содержащий пероксидазу. Во время инкубации с раствором субстрата тетраметилбензидина (ТМБ) происходит окрашивание растворов в лунках. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации общего ПСА в исследуемом образце. Концентрацию общего ПСА в исследуемых образцах определяют по калибровочному графику зависимости оптической плотности от содержания общего ПСА в калибровочных пробах.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность. Оба мышинных моноклональных антитела, использованные в данном Наборе, демонстрируют эквимоллярное взаимодействие, как со свободным ПСА так и с ПСА-АХТ комплексом.

3.2. Воспроизводимость.

Коэффициент вариации результатов определения содержания общего ПСА в одном и том же образце сыворотки (плазмы) крови с использованием Набора «общий ПСА-ИФА» не превышает 8,0%.

3.3. Линейность.

Зависимость концентрации общего ПСА в образцах сыворотки (плазмы) крови при разведении их сывороткой (плазмой) крови, не содержащей общий ПСА, имеет линейный характер в диапазоне концентраций 1.5–30 нг/мл и составляет $\pm 10,0\%$.

3.4. Точность.

Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» – соответствие измеренной концентрации общего ПСА предписанной, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы 5 нг/мл. Процент «открытия» составляет 90–110%.

3.5. Чувствительность.

Минимальная достоверно определяемая Набором «общий ПСА-ИФА» концентрация общего ПСА в сыворотке (плазме) крови не превышает 0.1 нг/мл.

4. СОСТАВ НАБОРА

Код компонента	Символ	Наименование	Кол-во	Ед.	Описание
1	P221Z	SORB MTP Планшет 96-луночный полистироловый, стриптированный, готов к использованию	1	шт.	-
2	C221Z	CAL 1-5 Калибровочные пробы на основе трис-буфера (рН 7.2-7.4), содержащие известные количества общего ПСА – 0; 1.5; 5; 10; 30 нг/мл , готовы к использованию (калибровочная проба 0 нг/мл – 6 мл, остальные – по 0.8 мл каждая)	5	шт.	прозрачные жидкости красного цвета (калибровочная проба 0 – прозрачная бесцветная жидкость)
3	Q221Z	CONTROL Контрольная сыворотка на основе сыворотки крови человека с известным содержанием общего ПСА, готова к использованию (0.8 мл)	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
4	T221Z	CONJ HRP Конъюгат , готов к использованию (11 мл)	1	шт.	прозрачная жидкость красного цвета
5	R055Z	SUBS TMB Раствор субстрата тетраметилбензидина (ТМБ) , готов к использованию (11 мл)	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
6	S008Z	BUF WASH 21X Концентрат отмывочного раствора , 21х-кратный (22 мл)	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
7	R050Z	STOP Стоп-реагент , готов к использованию (11 мл)	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
8	N003	- Бумага для заклеивания планшета	2	шт.	-
9	K221I	- Инструкция по применению Набора реагентов «общий ПСА-ИФА»	1	шт.	-
10	K221Q	- Паспорт контроля качества Набора реагентов «общий ПСА-ИФА»	1	шт.	-

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

5.1. Потенциальный риск применения Набора – класс 2а (ГОСТ Р 51609-2000).

5.2. Все компоненты Набора, за исключением стоп-реагента (5,0% раствор серной кислоты), в используемых концентрациях являются нетоксичными.

Раствор серной кислоты обладает раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. При попадании на кожу и слизистые пораженный участок следует промыть большим количеством проточной воды.

5.3. При работе с Набором следует соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

5.4. При работе с Набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированный материал, способный длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

6. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

- фотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность содержимого лунок планшета при длине волны 450 нм;
- термостат, поддерживающий температуру $+37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- дозаторы со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы в диапазоне 25–250 мкл;
- цилиндр мерный вместимостью 500 мл;
- вода дистиллированная;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- бумага фильтровальная.

7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

7.1. Перед проведением анализа компоненты Набора и исследуемые образцы сыворотки (плазмы) крови следует выдержать при комнатной температуре ($+18...+25\text{ }^{\circ}\text{C}$) не менее 30 мин.

7.2. Приготовление планшета.

Вскрыть пакет с планшетом и установить на рамку необходимое количество стрипов. Оставшиеся неиспользованными стрипы, чтобы предотвратить воздействие на них влаги, тщательно заклеить бумагой для заклеивания планшета и хранить при температуре $+2...+8\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности Набора.

7.3. Приготовление отмывочного раствора.

Содержимое флакона с концентратом отмывочного раствора (22 мл), перенести в мерный цилиндр вместимостью 500 мл, добавить 440 мл дистиллированной воды и тщательно перемешать. В случае дробного использования Набора следует отобрать необходимое количество концентрата отмывочного раствора и развести дистиллированной водой в 21 раз (1 мл концентрата отмывочного раствора + 20 мл дистиллированной воды).

8. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

8.1. Набор реагентов «общий ПСА-ИФА» должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности, указанного на упаковке Набора.

Допускается хранение (транспортировка) Набора при температуре до +25 °С не более 5 суток. Не допускается замораживание целого набора.

Допускается однократное замораживание (-20 °С) калибровочных проб и контрольной сыворотки в аликвотах.

8.2. Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 42 исследуемых образцов, 5 калибровочных проб и 1 пробы контрольной сыворотки (всего 96 определений).

8.3. В случае дробного использования Набора компоненты следует хранить следующим образом:

- оставшиеся неиспользованными стрипы необходимо тщательно заклеить бумагой для заклеивания планшета и хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора;
- конъюгат, субстрат, стоп-реагент после вскрытия флаконов следует хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора;
- калибровочные пробы и контрольную сыворотку после вскрытия флаконов следует хранить при температуре +2...+8 °С не более 2 месяцев;
- оставшийся неиспользованным концентрат отмывочного раствора следует хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора;
- приготовленный отмывочный раствор следует хранить при комнатной температуре (+18...+25 °С) не более 5 суток или при температуре +2...+8 °С не более 30 суток;

Примечание. После использования реагента немедленно закрывайте крышку флакона. Закрывайте каждый флакон своей крышкой.

8.4. Для проведения анализа не следует использовать гемолизированную, мутную сыворотку (плазму) крови, а также сыворотку (плазму) крови, содержащую азид натрия. Если анализ производится не в день взятия крови, сыворотку (плазму) следует хранить при температуре -20 °С. Повторное замораживание-оттаивание образцов сыворотки (плазмы) крови не допускается.

8.5. Исключается использование для анализа образцов сыворотки (плазмы) крови людей, получавших в целях диагностики или терапии препараты, в состав которых входят мышинные антитела.

8.6. При использовании Набора для проведения нескольких независимых серий анализов следует иметь в виду, что для каждого независимого определения необходимо построение нового калибровочного графика; кроме этого, рекомендуется определение концентрации общего ПСА в контрольной сыворотке.

8.7. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение Инструкции по применению Набора.

9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

1	Поместите в рамку необходимое количество стрипов – исследуемые образцы в 2 повторах и 12 лунок для калибровочных проб и контрольной сыворотки.
2	Если предполагается концентрация общего ПСА в исследуемом образце превышает 30 нг/мл, его следует дополнительно развести; используя калибровочную пробу 0. Использование других буферов и реагентов для разбавления образцов может исказить результаты определения! Примечание. Для получения надежных результатов рекомендуется использовать несколько последовательных разведений исследуемого образца сыворотки (плазмы) крови.
3	Внесите во все лунки по 100 мкл конъюгата.
4	Внесите в соответствующие лунки в дубликатах по 50 мкл калибровочной пробы и контрольной сыворотки. В остальные лунки внесите в дубликатах по 50 мкл исследуемых образцов сыворотки (плазмы) крови. Внесение калибровочных проб, контрольной сыворотки и исследуемых образцов необходимо произвести в течение 5–10 минут.
5	Заклейте планшет бумагой для закрепления планшета и инкубируйте его в течение 60 минут при температуре +37 °С.
6	По окончании инкубации удалите содержимое лунок и отмойте лунки 5 раз. При каждой отмывке добавьте во все лунки по 250 мкл отмывочного раствора (см. п. 7.3), встряхните планшет круговыми движениями по горизонтальной поверхности с последующей аспирацией или декантированием. Задержка при отмывке (замачивание лунок) не требуется. При каждом декантировании необходимо тщательно удалять остатки жидкости из лунок постукиванием планшета в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.
7	Внесите во все лунки по 100 мкл раствора субстрата тетраметилбензидина. Внесение раствора субстрата тетраметилбензидина в лунки необходимо произвести в течение 2–3 мин. Инкубируйте планшет в темноте при комнатной температуре (+18...+25 °С) в течение 10–20 минут в зависимости от степени развития синего окрашивания.
8	Внесите во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор субстрата тетраметилбензидина, по 100 мкл стоп-реагента , при этом содержимое лунок окрашивается в ярко-желтый цвет.
9	Измерьте величину оптической плотности (ОП) содержимого лунок планшета на фотометре вертикального сканирования при длине волны 450 нм. Измерение ОП содержимого лунок планшета необходимо произвести в течение 15 мин после внесения стоп-реагента. Бланк фотометра представляйте по калибровочной пробе С1.
10	Постройте в линейных координатах калибровочный график: ось абсцисс (x) – концентрация общего ПСА в калибровочных пробах (нг/мл), ось ординат (y) – оптическая плотность калибровочных проб (ОП 450 нм). Для алгоритма обседа (аппроксимации) калибровочного графика используйте интервальный (кусочно-линейный, «от точки к точке») метод.
11	Определите по калибровочному графику содержание общего ПСА в исследуемых образцах. Если исследуемый образец предразводили (см. п. 2), умножьте полученный результат на фактор разведения.

10. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ И НОРМЫ

10.1. Основываясь на результатах исследований, проведенных ООО «ХЕМА», рекомендуем пользоваться нормами, приведенными ниже. Вместе с тем, в соответствии с правилами GLP (Хорошей лабораторной практики), каждая лаборатория должна сама определить параметры нормы, характерные для обследуемой популяции.

Примечание. Значения концентраций общего ПСА в исследуемых образцах, находящиеся ниже границы чувствительности Набора (0.1 нг/мл), а также превышающие значение верхней калибровочной пробы (30 нг/мл) следует приводить в следующей форме: в исследуемом образце X концентрация общего ПСА ниже 0.1 нг/мл или выше 30 нг/мл.

Исследуемая группа	Единицы, нг/мл	
	Нижний предел	Верхний предел
Мужчины		
<40 лет	-	4.0
41-60 лет	-	5.5
>61 года	-	7.0
Женщины	-	0.45

11. ЛИТЕРАТУРА

1. Oesterling JE Prostate-specific antigen: a critical assessment of the most useful tumor marker fro adenocarcinoma of the prostate. J Urol 1991; 145: 907-23.
2. Oesterling JE et al.. Serum prostate-specific antigen in a community-based population of healthy men: establishment of age-specific reference ranges. JAMA 1993; 270:860.
3. Catalona WJ et al. Measurement of prostate-specific antigen in serum as a screening test for prostate cancer. N Eng J Med 1991, 324: 1156-61.
4. Christensson A et al. Serum prostate-specific antigen complexed to a1-antichymotrypsin as an indicator of prostate cancer. J Urology 1993; 150: 100-5.
5. Milfor Ward A et al. Free/total PSA ratio as an aid to the diagnosis of prostatic carcinoma. Clin Chem 1995; 41:S230.
6. Wu JT. Assay for prostate specific antigen (PSA): problems and possible solutions. J Clin Lab Analysis 1994; 8:51-62.

По вопросам, касающимся качества Набора **«общий ПСА-ИФА»**, следует обращаться в ООО «ХЕМА» по адресу:
105043, Москва, а/я 58,
тел./факс: (495) 737-39-36, 737-00-40, 510-57-07 (многоканальный)

электронная почта: info@xema.ru; rqc@xema.ru
интернет: www.xema.ru; www.xema-medica.com

Руководитель службы клиентского сервиса ООО «ХЕМА»,
к. б. н. Д. С. Кострикин

Instruction for use

A SOLID-PHASE ENZYME IMMUNOASSAY FOR THE QUANTITATIVE DETERMINATION OF TOTAL PSA IN HUMAN BLOOD SERUM OR PLASMA

1. INTENDED USE

A solid-phase enzyme immunoassay for the quantitative determination of total PSA in blood serum or plasma.

This kit is designed for measurement of total PSA in blood serum or plasma. For possibility of use with other sample types, please, refer to Application Notes (on request). The kit contains reagents sufficient for 96 determinations and allows to analyze 42 unknown samples in duplicates.

2. SUMMARY AND EXPLANATION

Prostate specific antigen (PSA) is a serin-like protease with molecular weight ca. 34 kDa and was initially found exclusively in normal prostatic gland as well as in prostatic fluid and seminal plasma. Later it was localized also in breast milk and, according to its enzymological properties, was classified as human prekallikrein 3. In human serum, most of PSA forms complexes with serine protease inhibitor proteins (mostly alpha-1-antichymotrypsin, alpha-2-macroglobulin and antithrypsin). A minor proportion of PSA (free PSA) is circulating outside these complexes.

Elevated serum PSA levels are found in patients with prostatic adenocarcinoma even at early stages of the disease. Values of 1000 ng/ml and even more may be found in patients with profound disease. Clinical value of this parameter is due to possibility of clinical monitoring and prognosis of the disease. Continuous elevation of PSA level is indicative of tumour progression and ineffective therapy. Nevertheless, interpretation of the results obtained should be made in the context of other clinical data. According to data obtained in University of Turku, Finland, the pair of monoclonal antibodies used in present test system (PS2-PS6), recognizes both free and complex-bound forms of PSA with equal affinity (equimolar binding).

Elevations of serum PSA levels are characteristic to prostatic hyperplasia, inflammation and tumours. Serum PSA level can be used for monitoring and treatment control of all diseases involving prostatic tissue, especially prostatic tumours.

Additional information valuable for differential diagnosis between benign and malignant prostate hyperplasia may be obtained by estimation of free PSA/total PSA ratio. In this case, age and case history of patients should be considered: that is, free PSA/total PSA ratio in patients under 60 years is to be estimated if total PSA level is above 4 ng/ml while in males over 60 years when benign prostatic hyperplasia is common this ratio is rational to be estimated when total PSA level is above 7 ng/ml. Besides, it should be kept in mind that significant elevation of total PSA level may be found in patients with prostatitis as well as after massage of prostatic gland and the next day after ejaculation (according to XEMA data, up to 20 ng/ml and 80 ng/ml, respectively).

Please, note, that free PSA/total PSA ratio should be estimated using EIA kits of the same manufacturer. This kit is intended for use with XEMA fPSA EIA, Cat.# K231.

3. PRINCIPLE OF THE TEST

This test is based on two-site sandwich enzyme immunoassay principle. Tested specimen is placed into the microwells coated by specific murine monoclonal to human total PSA-antibodies. Antigen from the specimen is captured by the antibodies coated onto the microwell surface. Second antibodies – murine monoclonal to human total PSA, labelled with peroxidase enzyme, are then added into the microwells. After washing procedure, the remaining enzymatic activity bound to the microwell surface is detected and quantified by addition of chromogen-substrate mixture, stop solution and photometry at 450 nm. Optical density in the microwell is directly related to the quantity of the measured analyte in the specimen.

4. WARNINGS AND PRECAUTIONS

4.1. For professional use only.

4.2. This kit is intended for in vitro diagnostic use only.

4.3. INFECTION HAZARD: There is no available test methods that can absolutely assure that Hepatitis B and C viruses, HIV-1/2, or other infectious agents are not present in the reagents of this kit. All human products, including patient samples, should be considered potentially infectious. Handling and disposal should be in accordance with the procedures defined by an appropriate national biohazard safety guidelines or regulations.

4.4. Avoid contact with stop solution containing 5,0% H₂SO₄. It may cause skin irritation and burns.

4.5. Wear disposable latex gloves when handling specimens and reagents. Microbial contamination of reagents may give false results.

4.6. Do not use the kit beyond the expiration date.

4.7. All indicated volumes have to be performed according to the protocol. Optimal test results are only obtained when using calibrated pipettes and microplate readers.

4.8. Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics in areas where specimens or kit reagents are handled.

4.9. Chemicals and prepared or used reagents have to be treated as hazardous waste according to the national biohazard safety guidelines or regulations.

4.10. Do not mix reagents from different lots.

4.11. Replace caps on reagents immediately. Do not swap caps.

4.12. Do not pipette reagents by mouth.

4.13. Specimens must not contain any AZIDE compounds – they inhibit activity of peroxidase.

4.14. Safety Data Sheet for this product is available upon request directly from XEMA Co., Ltd.

4.15. The Safety Data Sheet fit the requirements of EU Guideline 91/155 EC.

5.1. Contents of the Kit

5. KIT COMPONENTS

Symbol	Description	Qty	Units	Colour code	Stability of opened/diluted components
1 SORB MTP	tpSA EIA strips, 8x12 wells	1	pcs		until exp. date
2 CAL 1-5	polystyrene microwells coated with murine monoclonal to human total PSA human total PSA diluted in tris buffered BSA solution, preservative – 0,01% Bronidox L, 0,01% 2-Methyl-4-isothiazolin-3-one-hydrochloride; also contains red dye	5	pcs	red (C1 – colourless)	2 months
3 CONTROL	dilution of preselected human serum, with high content of total PSA with BSA solution; preservative – 0,01% Bronidox L, 0,01% 2-Methyl-4-isothiazolin-3-one-hydrochloride, colourless	1	pcs	colourless	2 months
4 CONJ HRP	aqueous solution of murine monoclonal to human total PSA coupled with horseradish peroxidase diluted on phosphate buffered solution with casein from bovine milk and detergent (Tween-20), contains 0,1% phenol as preservative and red dye	1	pcs	red	until exp. date
5 SUBS TMB	ready-to-use single-component tetramethylbenzidine (TMB) solution.	1	pcs	colourless	until exp. date
6 BUF WASH 21X	aqueous solution of sodium chloride and detergent (Tween 20), contains proClim300 as a preservative	1	pcs	colourless	Concentrate – until exp. date Diluted washing solution – 1 month at 2...+8°C or 5 days at RT
7 STOP	5,0% vol/vol solution of sulphuric acid	1	pcs	colourless	until exp. date
8 N003	Plate sealing tape	2	pcs		N/A
9 K221I	Instruction tpSA EIA	1	pcs		N/A
10 K221Q	QC data sheet tpSA EIA	1	pcs		N/A

5.2. Equipment and material required but not provided

- Distilled or deionized water;
- Automatic or semiautomatic multichannel micropipettes, 100–250 µl, is useful but not essential;
- Calibrated micropipettes with variable volume, range volume 25–250 µl;
- Dry thermostat for +37 °C ±0.1 °C;
- Calibrated microplate photometer with 450 nm wavelength and OD measuring range 0–3.0

5.3. Storage and stability of the Kit

Store the whole kit at +2...+8 °C upon receipt until the expiration date.

After opening the pouch keep unused microtiter wells TIGHTLY SEALED BY ADHESIVE TAPE (INCLUDED) to minimize exposure to moisture.

6. SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE

This kit is intended for use with serum or plasma (ACD- or heparinized). Grossly hemolytic, lipemic, or turbid samples should be avoided.

Specimens may be stored for up to 48 hours at +2...+8 °C before testing. For a longer storage, the specimens should be frozen at -20 °C or lower. Repeated freezing/thawing should be avoided.

7. TEST PROCEDURE**7.1. Reagent Preparation**

- All reagents (including unsealed microstrips) should be allowed to reach room temperature (+18 to +25 °C) before use.
- All reagents should be mixed by gentle inversion or vortexing prior to use. Avoid foam formation.
- It is recommended to spin down shortly the tubes with calibrators on low speed centrifuge.
- Prepare washing solution from the concentrate BUF WASH 21X by 21 dilutions in distilled water.

7.2. Procedural Note:

It is recommended that pipetting of all calibrators and samples should be completed within 3 minutes.

7.3. Assay flowchart

See the example of calibration graphic in Quality Control data sheet.

7.4. Assay procedure

1	Put the desired number of microstrips into the frame; allocate 12 wells for the calibrators CAL 1-5 and control samples CONTROL and two wells for each unknown sample. DO NOT REMOVE ADHESIVE SEALING TAPE FROM UNUSED STRIPS.
2	If suggested analyte concentration in the sample exceeds the highest calibrator, additionally dilute this sample accordingly, using zero calibrator. Use of other buffers or reagents for sample dilution may lead to incorrect measurement.
3	Dispense 100 µl of CONJ HRP into the wells.
4	Pipet 50 µl of calibrators CAL 1-5, control samples CONTROL and unknown samples into the wells. Cover the wells by plate adhesive tape (included into the kit).
5	Incubate 60 minutes at 37 °C.
6	Prepare washing solution by 21x dilution of washing solution concentrate (BUF WASH 21X) by distilled water. Wash the strips 5 times.
7	Dispense 100 µl of SUBS TMB into the wells
8	Incubate 10-20 minutes at +18...+25 °C
9	Dispense 100 µl of STOP into the wells.
10	Measure OD (optical density) at 450 nm.
11	Set photometer blank on first calibrator
12	Apply point-by-point method for data reduction.

7.5. Handling notes

Calibrators and control sample(s) – only one freezing/thawing cycle is allowed

8. QUALITY CONTROL

It is recommended to use control samples according to state and federal regulations. The use of control samples is advised to assure the day to day validity of results.

The test must be performed exactly as per the manufacturer's instructions for use. Moreover the user must strictly adhere to the rules of GLP (Good Laboratory Practice) or other applicable federal, state, and local standards and/or laws. This is especially relevant for the use of control reagents. It is important to always include, within the test procedure, a sufficient number of controls for validating the accuracy and precision of the test.

The test results are valid only if all controls are within the specified ranges and if all other test parameters are also within the given assay specifications.

9. CALCULATION OF RESULTS

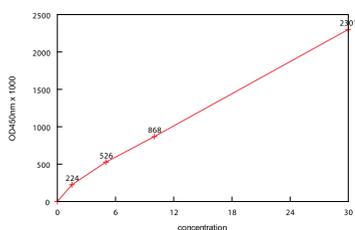
9.1. Calculate the mean absorbance values (OD450) for each pair of calibrators and samples.

9.2. Plot a calibration curve on graph paper: OD versus total PSA concentration.

9.3. Determine the corresponding concentration of total PSA in unknown samples from the calibration curve. Manual or computerized data reduction is applicable on this stage. Point-by-point or linear data reduction is recommended due to non-linear shape of curve.

9.4. Below is presented a typical example of a standard curve with the XEMA Co. Not for calculations!

Calibrators	Value	Absorbance Units (450 nm)
CAL 1	0 ng/ml	0.04
CAL 2	1.5 ng/ml	0.27
CAL 3	5 ng/ml	0.57
CAL 4	10 ng/ml	0.91
CAL 5	30 ng/ml	2.34



10. EXPECTED VALUES

Therapeutical consequences should not be based on results of IVD methods alone – all available clinical and laboratory findings should be used by a physician to elaborate therapeutically measures. Each laboratory should establish its own normal range for tPSA. Based on data obtained by XEMA, the following normal range is recommended (see below). NOTE: the patients that have received murine monoclonal antibodies for radioimaging or immunotherapy develop high titered anti-mouse antibodies (HAMA). The presence of these antibodies may cause false results in the present assay. Sera from HAMA positive patients should be treated with depleting adsorbents before assaying.

Sex, age	Units, ng/ml	
	Lower limit	Upper limit
Males		
<40 yrs	-	4.0
41-60 yrs	-	5.5
>61 yr	-	7.0
Females	-	0.45

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

11.1. Analytical specificity / Cross reactivity

The pair of monoclonal antibodies used in present test system (PS2-PS6), recognizes both free and complex-bound forms of PSA with equal affinity (equimolar binding)

11.2. Analytical sensitivity. Sensitivity of the assay was assessed as being 0.1 ng/ml.

11.3. Linearity. Linearity was checked by assaying dilution series of 5 samples with different total PSA concentrations. Linearity percentages obtained ranged within 90 to 110%.

11.4. Recovery. Recovery was estimated by assaying 5 mixed samples with known total PSA concentrations. The recovery percentages ranged from 90 to 110%.

12. LITERATURE

- Oesterling JE Prostate-specific antigen: a critical assessment of the most useful tumor marker fro adenocarcinoma of the prostate. J Urol 1991; 145: 907-23.
- Oesterling JE et al.. Serum prostate-specific antigen in a community-based population of healthy men: establishment of age-specific reference ranges. JAMA 1993; 270:860.
- Catalona WJ et al. Measurement of prostate-specific antigen in serum as a screening test for prostate cancer. N Eng J Med 1991, 324: 1156-61.
- Christensson A et al. Serum prostate-specific antigen complexed to a1-antichymotrypsin as an indicator of prostate cancer. J Urology 1993; 150: 100-5.
- Milfor Ward A et al. Free/total PSA ratio as an aid to the diagnosis of prostatic carcinoma. Clin Chem 1995; 41:S230.
- Wu JT. Assay for prostate specific antigen (PSA): problems and possible solutions. J Clin Lab Analysis 1994; 8:51-62.