

НАБОР ИФА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОБЩЕГО ПРОСТАТ-СПЕЦИФИЧНОГО АНТИГЕНА (ПСА)

EIA-3719, Total PSA ELISA

Каталог. № : EIA-3719
Количество : 96
Производитель: DRG (Германия)

Методика от 05-2012
Версия 12.0



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 EIA-3719 total PSA ELISA используется для количественного определения общего простат-специфического антигена (о-ПСА) в образцах сыворотки или плазмы человека. Определение уровней о-ПСА, в сочетании с цифровым ректальным обследованием (ЦРО), используется для оценки риска карциномы простаты у мужчин или для мониторинга эффективности лечения у пациентов карциномы простаты.

2. ВВЕДЕНИЕ

Рак простаты является наиболее частой формой рака найденного в человеке и второй причиной смерти от рака у мужчин. До недавнего времени пальцевое ректальное исследование было наиболее распространенным диагностическим методом для ранней стадии рака простаты, но измерения ПСА стал наиболее приемлемым тестом определения людей, которые подвергаются риску рака простаты, и которые должны пройти другие тесты.

3. ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Данный твердофазный иммуноферментный анализ основан на принципе сэндвича. Микротитровальные лунки покрыты антителами к детерминантам антигенов. Сыворотки пациентов (в аликвотах) инкубируются в лунке, покрытой антителами, с ферментным конъюгатом второго антитела (Е-Аб) (к другому участку молекулы антигена). После инкубации несвязанные Е-Аб вымываются, а количество связанного Е-Аб пропорционально концентрации антигена в образце. После добавления раствора субстрата, интенсивность проявившегося окрашивания пропорциональна концентрации антигена в сыворотке пациента. Измеряемые оптические плотности стандартов используются для построения калибровочной кривой по которой рассчитываются неизвестные.

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 образцов:** готовый к использованию реагент (10 мл).
3. **5 стандартов - ПСА:** готовые к использованию реагенты (0,5мл) со следующими концентрациями: 1.56 – 3.12 – 6.25 – 12.5 – 25.0 нг/мл. Стандарты калибруются по ВОЗ 96/670.
4. **Контроли (высокий и низкий):** готовы к использованию 2 флакона по 0,5 мл. Концентрация указана на упаковке.
5. **Конъюгат ПСА:** готовый к использованию конъюгат (12 мл).
6. **Субстрат ТМБ:** готовый к использованию реагент (12 мл).
7. **Стоп-раствор:** готовый к использованию реагент (14 мл). Содержит серную кислоту.

5. НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

- Прецизионные микропипетки (объем: 25 мкл и 100 мкл) с одноразовыми наконечниками.
- Дистиллированная вода
- Спектрофотометр ELISA с 450-630нм фильтрами.
- Таймер на 60 минут
- Микропланшетный вошер
- Вortex или же подобное устройство
- Контейнер для использованных остатков и образцов.

6. ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

- Хранить набор при температуре 2-8 °С

- Привести к комнатной температуре(18-25°С) 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.

7. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- Стандарты Комплекты ELISA используются профессионалами только для лабораторного диагностического использования;
- Образцы сыворотки и плазмы крови должны рассматриваться как потенциально инфекционные материалы. Носите перчатки и соответствующую для лаборатории одежду при работе с образцом материалов. Нельзя есть, пить и курить в помещениях, где обрабатываются образцы или реагенты. Не пипетируйте ртом. В случае контакта с кожей, промойте бактерицидным мылом и большим количеством воды. При необходимости, обратитесь к врачу;
- Калибраторы ПСА 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;
- Из-за потенциально инфекционного характера образцов и компонентов набора, все материалы которые контактировали с этими материалами, нужно стерилизовать и утилизировать в соответствии с местным законодательством. Это также касается жидких отходов;
- Анализ реагентов содержат консерванты, ТМБ, H₂O₂, серную кислоту и может быть вредным при проглатывании. Нужно избегать непосредственного контакта с кожей или слизистой оболочкой. В случае контакта с кожей, промойте большим количеством воды и, при необходимости, обратитесь к врачу;
- Стоп раствор содержит H₂SO₄. Поскольку H₂SO₄, которая используется для остановки цветной реакции, - вещество, вызывающее коррозию, инструменты, которые использовались для ее распределения нужно тщательно очистить после использования;
- Не заменяйте реагенты разных каталожных номеров или разных производителей;
- Избегайте переливания реагента или образца, используя чистые пробирки для растворов и образцов;
- Не используйте тестовой набор, если повреждена колба или замок-молния упаковки.

8. СБОР, ПОДГОТОВКА И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

8.1 Сбор образцов

Образцы крови собираются путем венопункции. Следует учитывать, Поскольку на уровень ПСА в крови влияют различные факторы, доктор должен убедиться, что пациенты избегали следующих условий до забора образца крови:

- Катание на велосипеде
 - Половой акт (эякуляция)
 - манипуляции простаты во время медицинских осмотров, таких как DRE, трансректальное ультразвуковое обследование простаты и т. д.
 - простатит
 - дисфункция печени
- Следующие условия могут привести к завышенным уровням ПСА
- Прием 5-альфа-редуктоз-ингибитора, антиандрогена или аналога GnRH.

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°С. При более длинном хранении их необходимо заморозить до -20 °С. Избегать повторного замораживания и 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

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.

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.
3. 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°).
4. Раскапать по 25 мкл стандартов, контролей и образцов в каждую лунку. Образцы с ожидаемыми высокими значениями ПСА, более 25 нг/мл необходимо развести раствором для разведения.
5. Инкубировать 5 минут при комнатной температуре (18-25°С).
6. Добавить по 100 мкл конъюгата пероксидазы в каждую лунку.
7. Смешать, двигая планшет по столу (10 сек.).
8. Инкубировать при комнатной температуре 1 час (18-25°С).
9. Удалить раствор из лунок аспирацией или декантацией. При декантации постучать планшетом о промокательную бумагу, чтобы удалить оставшуюся жидкость.
10. Для промывки наполнить лунки дистиллированной водой и оставить на 15 секунд, повторить промывку 5-6 раз. Рекомендуется следующая процедура: 6 раз промыть лунки дистиллированной водой 250 мкл на лунку. Предпочтительно использовать автоматизированную процедуру промывки, проследить, чтобы промывочный раствор оставался в каждой лунке одинаковое количество времени. Это необходимо для получения минимальных значений КВ!
11. Раскапать 100 мкл раствора субстрата ТМБ в каждую лунку.
12. Инкубировать 20 минут при комнатной температуре (18-25°С).
13. Добавить 100 мкл стоп-раствора (в том же порядке, что и раствор субстрата)
14. Считать абсорбцию (ОП) при 450 нм (слепая проба при 630 нм).

9.1 Результаты

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

9.1.1 Пример типичной Калибровочной кривой

Следующие данные приведены только в качестве демонстрации и не могут быть использованы для расчетов.

Стандарт	Оптические Единицы (450 нм)
Нулевой стандарт (0 нг/мл)	0.05
Стандарт 1 (1.56 нг/мл)	0.24
Стандарт 2 (3.12 нг/мл)	0.39
Стандарт 3 (6.25 нг/мл)	0.74
Стандарт 4 (12.5 нг/мл)	1.27
Стандарт 5 (25.0 нг/мл)	2.01

10. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

- Рекомендуется проведение внутреннего контроля для каждого анализа. Результаты контроля должны находиться в пределах установленных диапазонов и желательно, чтобы указывалась низкая, средняя и высокая концентрация.
- Риск для пациентов в основном зависит от фальшиво негативных результатов (ПСА ниже 4,0 нг/мл). По этому очень рекомендуется проводить оценку набора с помощью дополнительных средств.

11. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Общепринятый порог сопутствующих исследований:

Пороговое значение (cut-off): 3,0-4,0 нг ПСА/мл

Здоровые мужчины имеют концентрацию ПСА менее 4,0 нг/мл. Если концентрация ПСА равна или более 4,0 нг/мл. Настоятельно рекомендуется провести последующие исследования. Эта концентрация ПСА указывает на повышенный риск рака простаты, но также может быть вызвана ДПП.

Обратите внимание, что пороговое значение 4,0 нг/мл только рекомендуемая величина. В литературе рассматривается, что модификации относительно возраста и этнологического фона могут быть полезными, например для молодых мужчин, пороговое значение должно быть ниже чем у старших. Если возможно, рекомендуется для каждой лаборатории установить свои специфические значения, которые принимают во внимание местное население в том районе, где находится лаборатория.

Важно помнить, что некоторые опухоли простаты не вызывают высокий уровень ПСА, поэтому диапазон ПСА никогда не должен заменять DRE, но должен быть использован только в сочетании с DRE.

Поскольку высокий уровень ПСА может также быть вызван не злокачественными условиями, текущими исследованиями можно попытаться увеличить диагностическую специфичность т-ПСА. В литературе, плотность, скорость ПСА и коэффициент ф-ПСА до т-ПСА рассматриваются чтобы нормализовать различность между раковыми и не злокачественными условиями и могут быть использованы для уменьшения ненужных биопсий простаты. Но только биопсия простаты может в конечном итоге показать есть ли рак простаты или нет.

Примечание: значения ПСА могут быть использованы только для оценки риска развития рака. Их всегда нужно интерпретировать вместе с другими клиническими результатами исследований и не должны использоваться в качестве единственной основы для диагностики рака простаты.

12. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

12.1 Предел обнаружения

Минимальный определяемый уровень:

Предел обнаружения = 0,2 нг/мл.

12.2 Точность

Значения точности и получены при анализе 3 сывороток пациентов с разными концентрациями ПСА.

Таблица 1 Точность внутри анализа

Пациенты	Количество репликантов	Среднее значение, нг/мл	SD, нг/мл	CV, %
1	24	12.52	0.65	6.0
2	24	3.44	0.13	3.9
3	32	0.83	0.07	8.8

Таблица 2 Точность между анализами

Пациенты	Количество репликантов	Среднее значение, нг/мл	SD, нг/мл	CV, %
1	4	12.28	0.82	6.7
2	4	3.33	0.266	7.98

12.3 Восстановление

Известное количество ПСА было добавлено в сыворотки трех пациентов, после чего были измерены восстановленные количества. Результаты показаны в таблице 3.

Таблица 3 Восстановление

Образец	Ожидаемое значение, нг/мл	Полученное значение, нг/мл	Восстановление %
1	6.30	6.40	102
2	4.67	4.56	98
3	10.10	10.91	108

12.4 Специфичность

Антитела, используемые в настоящем комплекте весьма специфичны для общего ПСА (свободного ПСА и ПСА-АСТ-комплекс), имеют относительно низкую кросс-реактивность с другими протеинами и полипептидами, липидами или химиотерапевтическими веществами в образцах пациентов.

Таблица 4 Специфичность

Антигены	Добавл. кол-во	Перекрестная реакция
Белки		нет
АФП	10 мкг/мл	нет
ПКФ	10 мкг/мл	нет

ХГЧ	10 мкг/мл	нет
Лактатальбумин	10 мкг/мл	нет
ПАП	1 мкг/мл	нет
Интерферирующие в-ва		
Билирубин	0,2 мг/мл	нет
Гемоглобин*	0,1 мг/мл	нет
Триглицеридов	15 мг/мл	нет
Химиотерапевтические в-ва		
Циклофосфамид	800 мкг/мл	нет
Доксорубин *НСI	20 мкг/мл	нет
Дизитилбестрол	2 мкг/мл	нет
Флютамид	10 мкг/мл	нет
Метолтрексат	50 мкг/мл	нет

* Более высокая концентрация гемоглобина приводит к слишком высоким значениям ОП, поэтому нужно избегать гемолитических образцов.



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

12.5 «Хук-эффект» высокой дозы

Тест был проверен на наличие высокой дозы хук-эффекта. При концентрации ПСА до 2000 нг/мл - не наблюдается. Пожалуйста, обратите внимание, что если ОП выходит за рамки стандарта для высоко концентрированных образцов, образец должен быть разбавлен до следующего измерения для получения правильных результатов.

12.6 Корреляция

EIA-3719 total PSA ELISA сравнивался с набором Roche ElecSys total PSA:

$$Y = 0.9644 x + 0.0741$$

В другом исследовании EIA-3719 t-PSA ELISA сравнивался с другим CE зарегистрированного PSA ELISA:

$$Y = 1.001 x, R^2=0.9704$$

12.7 Калибровка

Набор EIA-3719 total PSA ELISA откалиброван относительно стандарта ВОЗ 96/670.

11. ПРАВОВЫЕ ВОПРОСЫ

11.1 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.

11.2 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.

11.3 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.