

НАБІР ІФА

ДЛЯ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ВІЛЬНОГО ПРОСТАТ-СПЕЦИФІЧНОГО АНТИГЕНА (PSA)

350-10, CanAg Free PSA EIA

Каталог. №: 350-10

Методика від 09-2013

Кількість : 96

Виробник : Fujirebio Diagnostics, Inc.,
(Швеція)



Основою при проведенні аналізу є оригінал інструкції англійською мовою, вкладеної в набір. Номер і дата версії оригіналу та перекладу інструкції повинні співпадат.

ПРИЗНАЧЕННЯ ВИКОРИСТАННЯ

Набір CanAg Free PSA EIA призначений для кількісного визначення вільного простат-специфічного антигена (PSA) в сироватці крові людини.

ВСТУП І ПОЯСНЕННЯ МЕТОДУ (Див. оригінал інструкції англ. мовою).

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Справжній набір є твердофазовим, неконкурентним методом, заснованим на прямій техніці "сендвіч" калібратори, контролі та сироватки пацієнтів інкубуються разом з біотинильованими анти-Free PSA моноклональними антитілами і моноклональними антитілами, кон'югованими з пероксидазою хрому (HRP) в покритих стрептавідином лунках мікропланшетів. Після промивання в кожну лунку додається буферний реагент субстрат/хромоген (перекис водню і 3,3', 5,5'-тетраметилбензидин), в результаті відбувається ферментативна реакція. У процесі реакції в присутності антигену розвивається блакитне забарвлення. Інтенсивність забарвлення пропорційна кількості антигену Free PSA, присутньому у зразку. Інтенсивність забарвлення вимірюється на мікропланшетному рідері при 620 нм (або, що не обов'язково, при 405 нм після додавання стоп-розчину). Стандартні криві будуються для кожного аналізу в координатах оптична щільність проти концентрації для кожного стандарту. Концентрація Free PSA в зразках пацієнта розраховується з калібрувальною кривою.

РЕАГЕНТИ

- Кожен набір містить реагенти для 96 тестів.
- Термін придатності набору проставлений назовні коробки.
- Не використовуйте набір після закінчення терміну придатності.
- Не змішуйте реагенти з різних лотів і наборів.
- Зберігайте набір при 2-8 °C. Не заморожуйте.
- Стабільність розкритих реагентів наведена в таблиці нижче, за умови, що вони не були контаміновані, зберігалися в ретельно закритих оригінальних упаковках і зберігаються і використовуються, як описано. негайно повертайте реагенти в холодильник (2-8 °C) після використання.

Компонент	Кількість	Зберігання і стабільність після першого використання
Мікропланшет	1 планшет	2-8 °C до закінчення терміну придатності
12x8 мікролунок, покритих стрептавідином. Після розкриття негайно поверніть невикористані смужки в алюмінієвий пакет з осушувачем і ретельно запечатуйте пакет, зберігайте сухим.		
Калібратори Free PSA	6 флаконів x 0.75 мл, 0-0.3-1-2-5-10 мкг/л	2-8 °C до закінчення терміну придатності
Вільний людський PSA в трис-НСІ буферному сольовому розчині, що містить бичачий сироватковий альбумін, інертний жовтий барвник і 0,01% Methylisothiazolinone (MIT) як консервант. Готовий до використання.		
Контролі Free PSA	2 флакона x 0.75 мл	2-8 °C до закінчення терміну придатності

Вільний людський PSA в трис-НСІ буферному сольовому розчині, що містить бичачий сироватковий альбумін і 0,01% Methylisothiazolinone (MIT) як консервант. Готовий до використання.

Біотин Анти-Free PSA	1 флакон x 15 мл	2-8 °C до закінчення терміну придатності, вказаного на флаконі
----------------------	------------------	--

Біотин Анти-Free PSA моноклональне мишаче антитіло, ~ 1.5 мкг/мл. Містить буферний сольовий розчин (рН 7.2), бичачий сироватковий альбумін, бичачий імуноглобулін, блокуючі агенти, Tween 20, інертний синій барвник і 0.01% метилізоціазолін (MIT) в якості консерванту. Готовий до використання.

Трейсер, HRP Анти-Free PSA	1 флакон x 0.75 мл	2-8 °C до закінчення терміну придатності, вказаного на флаконі
----------------------------	--------------------	--

Сток-розчин кон'югату пероксидази хрому з анти-PSA моноклональними мишачими антитілами, ~ 20 мкг/мл. Повинен бути перед використанням змішаний з Біотином анти-Free PSA перед використанням. Містить консерванти.

Субстрат ТМБ-HRP	1 флакон x 12 мл	2-8 °C до закінчення терміну придатності, вказаного на флаконі
------------------	------------------	--

Містить забуферений розчин перекису водню і 3,3', 5,5' Тетраметилбензидин (ТМБ). Готовий до використання.

Сток-розчин	1 флакон x 15 мл	2-8 °C до закінчення терміну придатності, вказаного на флаконі
-------------	------------------	--

Містить 0.12 М соляної кислоти. Готовий до використання.

Концентрат промивального буфера	1 флакон x 50 мл	2-8 °C до закінчення терміну придатності, вказаного на флаконі
---------------------------------	------------------	--

Містить ТРІС-НСІ сольовий розчин з ТВІН 20 і Germall II як коFree PSAрвант. Повинен бути розведений перед використанням в 25 разів водою.

Ознаки нестабільності

Розчин субстрату ТМБ повинен бути безбарвний або злегка блакитний. Блакитний колір свідчить про забруднення реагенту і розчин повинен бути викинутий.

ЗАУВАЖЕННЯ ТА ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

Для використання в in-Vitro діагностиці

- Тільки для професійного використання
- Будь ласка, зверніться до публікації Департамент охорони здоров'я та соціальних служб США (Bethesda, штат Меріленд, США) публікація № (CDC) 88-8395 щодо лабораторної безпеки або будь-якого іншого місцевого або національного регулювання.
- Поводитися зі зразками пацієнтів як з потенційно інфекційними.
- Дотримуйтеся місцевих керівних принципів при утилізації всіх відходів.

Увага

Матеріали людського походження, використані при виробництві реагентів даного набору, були протестовані з негативними результатами на антитіла до ВІЛ 1 та 2, антитіла до ВГС і поверхневого антигену гепатиту В (HBsAg). Оскільки не існує методу, який повністю гарантує відсутність інфекційних захворювань, що передаються з кров'ю, то з усіма матеріалами людського походження необхідно поводитися як з потенційно інфекційно небезпечними.

ЗБІР І РОБОТА ЗІ ЗРАЗКАМИ

CanAg Free PSA EIA призначений для використання з сироваткою. Проведіть забір крові з вени і відокремте сироватку відповідно до звичайних процедур. Зразки можуть зберігатися при температурі 2-8 °C протягом 24 годин і при -20 °C протягом 12 місяців. Для більш довгих періодів зберігати при -70 °C або нижче. Зразки не повинні зберігатися в холодильній камері, яка сама розморожується. Дозволити замороженим зразкам танути повільно, переважно при температурі 2-8 °C протягом ночі, а потім привести зразки до кімнатної температури перед аналізом.

Підвищені рівні вільного ПСА можна отримати після маніпуляцій над передміхуровою залозою. Тому рекомендується проводити забір крові перед ректальним дослідженням. Після хірургічних маніпуляцій над передміхуровою залозою, таких як біопсія або транс уретральна резекція, рекомендується зачекати не менше 6 тижнів перед забором крові для тестування на ПСА (7). Слід враховувати, що лікування Фінастеридом зменшує рівень вільного PSA (7).

ПРОЦЕДУРА

Необхідні матеріали, що не поставляються з набором

1. Мікропланшетний шейкер
Струшування має бути середнім або енергійним, приблизно 700-900 коливань/хвилину.
2. Пристрій для промивання мікропланшета

Автоматичний промивальний пристрій з можливістю виконувати 1 і 6 циклів промивання з мінімальним обсягом наповнення 350 мкл/лунку/цикл промивки.

Якщо не використовується автоматичний мікропланшетний вошер, можна застосувати 8-канальну піпетку зі змінними наконечниками об'ємом 350 мкл.

3. Мікропланшетний Рідер

З довжиною хвилі 620 нм і/або 405 нм і діапазоном абсорбції від 0 до 3.0.

4. Точні піпетки

З одноразовими пластиковими наконечниками для внесення мікрооб'ємів рідин. 8-канальна піпетка для внесення 100 мкл бажана, але не обов'язкова. Піпетки для дозування обсягів в мікролітрах.

5. Дистильована або деіонізована вода

Для приготування Промивного Розчину.

Примітки до методики

- Повне розуміння даної інструкції необхідно для забезпечення належного використання набору FREE PSA EIA. Реагенти, що входять в комплект, призначені для використання як єдиний блок. Не змішуйте ідентичні реагенти з наборів, що мають різні номери партій. Не використовуйте реагенти після закінчення терміну придатності, вказаного на зовнішній стороні набору.
- Реагенти необхідно привести до кімнатної температури (20-25 °C) перед використанням. Аналіз варто проводити тільки при температурах між 20-28 °C для отримання точних результатів. Заморожені зразки повинні бути м'яко, але ретельно перемішані обережним перевертанням флаконів після відтавання.
- Перш ніж приступити до піпетування калібраторів і невідомих зразків, доцільно позначити смужки, щоб мати можливість чітко визначити зразки під час і після аналізу.
- Вимога ефективної і ретельної промивки для розділення зв'язаного і незв'язаного антигену і реагентів від зв'язаних твердо фазових комплексів антитіло-антиген є одним з найбільш важливих кроків в ІФА. З метою забезпечення ефективного промивання переконайтеся, що всі лунки повністю заповнені до верхнього краю розчином для промивання протягом кожного циклу промивання, що промивний розчин розливають з необхідною швидкістю, що аспірація лунок між і після циклів промивання є повною і, що лунки порожні. Якщо є залишки рідин, інвертувати пластину і постукувати нею по фільтрувальному паперу.
 - Автоматичний вошер: Дотримуйтесь інструкцій виробника щодо належного очищення та обслуговування і проводьте необхідну кількість циклів промивання до і після кожної стадії інкубації. Рекомендується використовувати режим роботи *смужка* і режим промивки *переповнення* з об'ємом заповнення 800 мкл. Пристрій для аспірації/промивання не слід залишати з Промивним Розчином протягом тривалого часу, так як голки можуть забитися через погане наповнення рідиною і аспірацію.
- Субстрат TMB-HRP є дуже чутливим до забруднення. Для оптимальної стабільності TMB HRP-субстрату, залити необхідну кількість з флакона в ретельно промитий резервуар або одноразовий пластиковий лоток, щоб уникнути забруднення реагенту. Обов'язково використовуйте чисті одноразові пластикові піпетки (або наконечники).
- Обов'язково використовуйте чисті одноразові пластикові наконечники піпеток і правильну точну техніку піпетування при роботі із зразками і реагентами. Не допускайте торкання піпеткою поверхні рідини, щоб уникнути перенесення забруднення. Належна техніка піпетування має особливе значення при поводженні зі зразками та розчином TMB-субстрату HRP.

1	50	1
2	100	2
3	150	3
4	200	4
5	250	5
6	300	6
7	350	7
8	400	8
9	450	9
10	500	10
11	550	11
12	600	12

Переконайтеся, що використовуються тільки чисті пластикові або скляні посудини для приготування Розчину Антитіл.

Альтернатива: Вилийте вміст Трейсера, HRP Anti-Free PSA у флакон з Біотином Анти-Free PSA і акуратно перемішайте. Переконайтеся, що Трейсер, HRP Анти-Free PSA повністю перелитий у флакон з Біотином Анти-Free PSA.

ПРИМІТКА: Розчин Антитіл стабільний протягом 3-х тижнів при 2-8 °C. Не готуйте більш Робочого розчину Трейсера, ніж буде використано протягом цього періоду і переконайтеся, що він зберігається належним чином.

ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

Усі стандарти, контролю і зразки повинні аналізуватися в дублях. Калібрувальна крива повинна будуватися при кожній постановці аналізу. Перед використанням реагенти повинні бути приведені до кімнатної температури (20-25 °C).

- Приготуйте Промивний Розчин і Розчин Антитіл. Дуже важливо використовувати чисті ємності. Чітко дотримуйтесь інструкції.
- Закріпіть необхідну кількість мікросмужок в тримачі. (Помістіть невикористовувані смужки в пластиковий пакет з осушувачем і закрийте його). Промийте кожну смужку один раз розчином для промивання. Не промивайте більше смужок, чим збирається використовувати протягом 30 хвилин.
- Внесіть 50 мкл FREE PSA Калібраторів (CAL 0, 0.3, 1, 2, 5, 10), контролей (C) і невідомих зразків (невідомі - Unk) в лунки у відповідності з наступною схемою:

	1	2	3	4	5 і т.д.
A	Кал. 0	Кал. 5	Невід. 1		
B	Кал. 0	Кал. 5	Невід. 1		
C	Кал. 0.3	Кал. 10	Невід. 2		
D	Кал. 0.3	Кал. 10	Невід. 2		
E	Кал. 1	C1	І т.д.		
F	Кал. 1	C1			
G	Кал. 2	C2			
H	Кал. 2	C2			

- Додайте 100 мкл Розчину Антитіл в кожну лунку, використовуючи точну піпетку на 100 мкл (або восьми канальну піпетку на 100 мкл). Уникайте дотику наконечників до поверхні рідини.
- Інкубуйте пластину протягом 1 години (± 10 хв.) при кімнатній температурі (20-25 °C) з постійним потрушуванням.
- Після інкубації аспірувати і промити кожну смужку 6 разів.
- Додайте 100 мкл субстрату TMB в кожну лунку, в тій же послідовності, як в п. 4. Розчин субстрату слід додавати по можливості швидко, щоб час між додаванням в першу і останню лунку не перевищував 5 хвилин.
- Інкубуйте 30 хвилин (± 5 хвилин) при кімнатній температурі з постійним перемішуванням планшета на шейкері. Уникайте потрапляння прямого сонячного світла.
- Негайно читайте оптичну щільність на рідері при 620 нм.

Діапазон вимірювання

Free PSA EIA вимірює концентрації між 0.03 і 10 мкг/л. Якщо концентрація Free PSA вище діапазону вимірювання, як очікується, рекомендується розбавляти зразки з нормальною чоловічою сироваткою перед аналізом. **УВАГА:** сироватка, використовувана для розбавлення, також повинна бути виміряна з метою визначення ендогенної концентрації Free PSA (див. "Розрахунок результатів").

Контроль якості

Контролі Free PSA 1 і 2 можуть бути використані для перевірки серії аналізу. Діапазони очікуваних результатів зазначені на етикетках флаконів з реагентами. Якщо значення виходять за межі зазначених діапазонів, необхідно провести повну перевірку реагентів і продуктивності зчитувача і повторити аналіз. Кожна лабораторія може додатково підготувати свої власні пули сироватки на різних рівнях, які можна використати в якості внутрішнього контролю з метою забезпечення точності аналізу.

Приготування реагентів	Стабільність приготовленого реагенту
Промивний розчин	2 тижні при 2-25 °C в герметичному контейнері
Розчин Антитіл	3 тижні при 2-8 °C в герметичному контейнері

Приготуйте потрібний обсяг Розчину Антитіл змішуванням 50 мкл Трейсера, HRP Анти-Free PSA з 1 мл Біотину Анти-Free PSA на смужку (див. таблицю нижче):

Кількість смужок	Трейсер, HRP Anti-Free PSA (мкл)	Біотин Анти-Free PSA (мл)
------------------	----------------------------------	---------------------------

Референсний матеріал

1-й Міжнародний стандарт 96/668 може бути використаний як еталонний стандарт. Значення для вільного ПСА Калібраторів і Контролей були призначені з набором внутрішніх еталонів, значення яких визначались відповідно до 1-го міжнародного стандарту.

РОЗРАХУНОК РЕЗУЛЬТАТІВ

Якщо використовується мікропланшетний спектрофотометр з вбудованою програмою для розрахунку даних, створіть програму, яка використовує концентрацію, зазначену на етикетці кожного з Free PSA калібраторів.

Для автоматичного розрахунку результатів Free PSA рекомендується використовувати один з наступних методів:

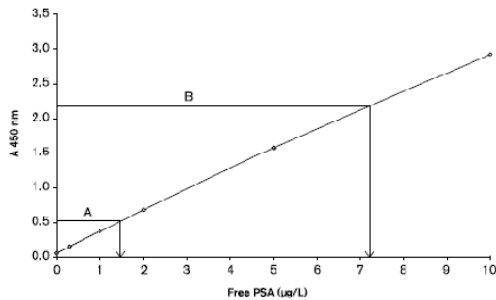
- Метод кубічної кривої сплайна є підходящим методом. Калібратор 0 повинен бути включений в кривій зі значенням 0 мкг/л.
- Метод згладженої кривої сплайна є підходящим методом. Калібратор 0 слід використовувати як бланк.
- Інтерполяція з оцінкою від точки до точки. Калібратор 0 повинен бути включений в кривій зі значенням 0 мкг/л.
- Метод квадратного рівняння кривої є підходящим методом. Калібратор 0 повинен бути включений в кривій зі значенням 0 мкг/л.

ПРИМІТКА: 4-параметрична або лінійна регресія не повинні використовуватися.

Для ручної оцінки калібрувальна крива будується відкладенням значень абсорбції (A), отриманих для кожного Free PSA калібратора проти відповідної концентрації Free PSA (в мкг/л). Невідомі концентрації Free PSA потім можуть бути визначені з калібрувальної кривої з використанням середнього значення абсорбції кожного зразка пацієнта.

Приклад результатів

Зразок	Значення Калібраторів (мкг/л)	Середнє абс. значення (A)	Free PSA мкг/л
Калібратор 0	0	0.054	
Калібратор 0.3	0.3	0.148	
Калібратор 1	1	0.369	
Калібратор 2	2	1.683	
Калібратор 5	5	1.580	
Калібратор 10	10	2.930	
Зразок А		0.522	1.480
Зразок В		2.181	7.147



Приклад, не використовуйте цю криву для визначення результатів аналізу.

Розрахунок результатів з розбавленими зразками

Якщо зразки в первинному аналізі показують рівні вільного ПСА вище, ніж 10 мкг/л, зразки необхідно розвести 1/10 з нормальною чоловічою сироваткою і повторити аналіз, щоб отримати точну концентрацію вільного ПСА. **ПРИМІТКА:** Зразок, використовуваний для розведення, також повинен бути виміряний з метою визначення ендогенної концентрації вільного ПСА.

Концентрація вільного ПСА у нерозведеному зразку розраховується за формулою:

$$\text{Dilution 1/10: } 10 \times ([\text{Free PSA}]_{\text{Diluted sample}} - (0.9 \times [\text{Free PSA}]_{\text{Normal male serum}}))$$

ОБМЕЖЕННЯ ПРОЦЕДУРИ

Рівні Free PSA не можуть бути використані як абсолютний доказ присутності або відсутності злоякісних пухлин, а набір Free PSA не повинен використовуватися для скринінгу онкологічних хворих. Результати тестування повинні інтерпретуватися тільки у зв'язку з іншими дослідженнями і методами діагностики захворювань, і Free PSA-тест не повинен замінювати інші клінічні дослідження.

Калібратори набору не повинні використовуватися для аналізу відновлення вільного ПСА. Для досліджень з відновлення рекомендується використовувати зразок пацієнта з завищеними значеннями.

Антитіла анти-реагенту (людське антитіло анти-миші (HAMA) або гетерофільні антитіла) у зразку пацієнта можуть іноді заважати аналізу, навіть якщо специфічні блокуючі агенти включені в буфері.

ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ

Вимірювання вільного PSA може бути використано в поєднанні з еквімолярним тестом, таким як CanAg PSA EIA (340-10) для загального ПСА в цілях отримання співвідношення вільного ПСА/ загального ПСА. Зразки сироватки 52 чоловіків об'єктивно діагностованих з доброякісною гіперплазією передміхурової залози (BHP) і 77 чоловіків з діагнозом раку простати (PCa) були проаналізовані з використанням CanAg PSA EIA та CanAg Free PSA EIA:

Diagnosis (n)	FPSA/TPSA			FPSA/TPSA	
	Median	Min.	Max.	Mean	(95% confidence interval)
BPH (52)	0.18	0.04	0.42	0.19	(0.17-0.21)
PCa (77)	0.09	0.02	0.53	0.12	(0.10-0.14)

Вибір використання значень cut-off в клінічній практиці залежить від клінічних умов, тобто, чи потрібне визначення оптимізованої чутливості або специфічності. Чутливості (% PCa, правильно виявлених) і специфічності (% BHP, правильно виявлених) для різних співвідношень FPSA/TPSA cut-off значень наведено нижче:

FPSA/TPSA cut-off	Clinical specificity (BPH > cut-off)			Clinical sensitivity (PCa ≤ cut-off)		
	n	%	(95% confidence interval)	n	%	(95% confidence interval)
0.23	14 (52)	27	(16-41)	69 (77)	90	(81-95)
0.18	36 (52)	69	(55-81)	64 (77)	83	(73-91)
0.08	48 (52)	92	(81-98)	30 (77)	39	(28-51)

ТЕХНІЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Точність

Точність оцінювалася згідно NCCLS EP5-A з використанням 4 рівнів концентрацій пулованої замороженої сироватки з додаванням людського Free PSA. Кожен зразок був довільно піпетований (n = 2/аналіз) і проаналізований двічі кожен день протягом 20 днів поспіль. Відтворюваність показана в таблиці:

Зразок	N	Середня конц. мкг/л	В аналізі SD, мкг/л	В аналізі CV, %	Між днями SD, мкг/л	Між днями CV, %
Free PSA 1	80	0.38	0.01	1.9	0.01	3.0
Free PSA 2	80	1.44	0.02	1.6	0.04	2.6
Free PSA 3	80	3.46	0.05	1.6	0.08	2.3
Free PSA 4	80	6.91	0.09	1.3	0.12	1.8

Межа виявлення (чутливість)

Межа виявлення для даного набору склала < 0.03 мкг/л і визначена як концентрація, відповідна значенню оптичної щільності нульового стандарту плюс 2 стандартних відхилення:

$$\frac{2 \times \text{SD Калібратора 0}}{\text{OD Калібратора 0.3} - \text{OD Калібратора 0}} \times 0.3 \text{ мкг/л}$$

Відновлення

Насичені зразки сироватки готували додаванням аліквот зразків з завищеними рівнями вільного ПСА до нормальних чоловічих зразків сироватки. Відновлення антигену було в межах $\pm 15\%$ від очікуваних значень. **ПРИМІТКА:** дослідження відновлення не повинно проводитися з використанням калібраторів набору.

Хук-ефект

Хук-ефект не спостерігається для зразків з концентраціями до 5 000 мкг/л.

Лінійність розведення

Проби пацієнтів були розбавлені нормальною чоловічою сироваткою і проаналізовані. Отримані значення знаходилися в межах $\pm 10\%$ від очікуваних значень.

Специфічність

	Концентрації с незначною інтерференцією ($\pm 10\%$)
Ліпемія	10 мг/мл
Білірубін, незв'язаний	0.4 мг/мл
Гемоглобін	5 мг/мл

ГАРАНТІЯ

Будь-які зміни або модифікації процедури, не рекомендовані Fujirebio Діагностика, можуть вплинути на результати, і в цьому випадку Fujirebio Діагностика відмовляється від усіх гарантій, явних, припущених або передбачених законодавством, включаючи гарантії

товарного стану та придатності для використання.



ОФІЦІЙНИЙ ДИСТРИБ'ЮТОР

ТОВ «ДІАМЕБ»
вул. Чорновола, 97
м. Івано-Франківськ, 76005
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com