



Набор для ИФА анализа на определение общего PSA в сыворотке человека Total PSA ELISA

Кат. № : 105-3719
Количество : 96
Производитель : DRG (USA)

версия 7.0
Методика от 11-2006

Внимание: основой при проведении анализа есть оригинал инструкции на англ. языке.

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 (E-Ab) (к другому участку молекулы антигена). После инкубации несвязанные E-Ab вымываются, а количество связанного E-Ab 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.

РЕАГЕНТЫ

Каждый набор содержит количество реагентов, достаточное для 96 определений.

1. **Микротитровальная планшета:** 12 модулей по 8 лунок каждый = 96 определений.
2. **5 PSA- стандартов:** готовые к использованию реагенты (0.5 мл) со следующими концентрациями: 25, 12.5, 6.25, 3.1 и 1.56нг/мл. Консервант: Тимеросал 0.02% Катон 1%. Стандарты калибруются по ВОЗ 96/668 и ВОЗ 96/670.
3. **Нулевой стандарт/ для разведения образцов:** готовый к использованию реагент (10 мл).
4. **Контроли:** готовый к использованию реагент (0.5 мл) Концентрация указана на упаковке. Консерванты: Тимеросал 0.02% Катон 0,1%.
5. **Конъюгат пероксидазы:** готовый к использованию реагент (12 мл).
6. **ТМВ-Субстрат:** готовый к использованию реагент (12 мл).
7. **Стоп-раствор:** готовый к использованию реагент (12 мл).

ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ:

- Хранить набор при температуре 2-8°C и привести к комнатной температуре не менее чем за 30 минут до использования.
- Не смешивать реагенты разных лотов.
- Дата срока годности указана на упаковке набора.
- Не используйте реагенты после истечения срока пригодности.
- Закрывайте флакончики немедленно после вскрытия.
- Храните планшет в поставляемом пакете.

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 H_2SO_4 . При контакте с кожей, обильно промыть водой и обратиться к врачу. Т.к. H_2SO_4 может вызвать коррозию, инструмент следует тщательно отмывать после использования. Данный набор предназначен только для диагностики in-vitro. Не раскапывать ртом, 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.

НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

1. Прецизионные микропипетки (V: 25 мкл и 100 мкл) с одноразовыми наконечниками.
2. Дистиллированная вода
3. Спектрофотометр ELISA с 450 нм - и 655нм-фильтрами.
4. Таймер на 60 минут
5. Микропланшетный вошер
6. Вортекс или же подобное устройство
7. Контейнер для использованных остатков и образцов.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Для анализа должна использоваться сыворотка или плазма.

Если они не используются немедленно, их можно хранить неделю при 2-8 °C.

При более длинном хранении их необходимо заморозить до -20 °C.

Образцы должны использоваться без микробиологического заражения. В таком случае центрифугируйте при 2000 г на протяжении 20 минут или фильтруйте при помощи 0,2 мкл фильтра. Высоко гемолизированные и липемические пробы могут давать неправильные аналитические результаты. Образцы, содержащие высокие титры ревматоидного фактора и анти мышинные гетерофильные антитела, могут давать фальшиво позитивные результаты.

В общем, концентрация ПСА падает, даже когда образцы хранятся при -20 °C.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

1. Перед использованием все реагенты необходимо довести до комнатной температуры по меньшей мере на 1 час (18-25°).
2. Проверьте дату срока годности флаконов и планшета и наличие повреждений.
3. Раскапать по 25 мкл стандартов, контролей и образцов в лунки. Образцы с ожидаемыми высокими значениями PSA, более 25 нг/мл необходимо развести раствором для разведения.
4. **Инкубировать 5 минут при комнатной температуре (18-25°C).**
5. Добавить **100 мкл** конъюгата пероксидазы в каждую лунку.
6. Смешать, двигая плашку по столу (10 секунд).
7. Инкубировать при комнатной температуре **1 час** (18-25°C).

8. Удалить раствор из лунок отсосом или вытряхнув на впитывающую поверхность.
9. 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 **250мкл** на лунку. Предпочтительно использовать автоматизированную процедуру промывки, проследить, чтобы промывочный раствор оставался в каждой лунке одинаковое количество времени. Это необходимо для получения минимальных значений CV!
10. Пипетировать **100 мкл** раствора субстрата ТМВ в каждую лунку (пригоден для использования в течение 30 мин).
11. Инкубировать 20 минут при комнатной температуре (18-25°C).
12. Добавить 100 мкл стоп-раствора (в том же порядке, что и раствор субстрата)
13. Считайте абсорбцию при 450 нм.

РЕЗУЛЬТАТЫ

1. Рассчитать среднее значение абсорбции для каждого дубля.
2. Вычесть среднее значение абсорбции нулевого стандарта из средних значений абсорбции стандартов, контролей и образцов.
3. Отобразить стандартную кривую на графической бумаге стандарта lin-lin, откладывая значения абсорбции стандартов против соответствующих значений концентраций ПСА.
4. Считать концентрации ПСА контролей и образцов.

ДОСТОВЕРНОСТЬ ТЕСТА

1. ОП 450 нм нулевых ячеек ниже 0,150. Высшие значения указывают на хромоген/субстрат контаминацию. В этом случаи повторите анализ проверяя реагент.
2. ОП 450 нм наивысшего стандарта (25 нг/мл выше чем 0,700) Низшие значения указывают на ослабление набора или контроля. В этом случаи, проверите дату истечения срока годности набора перед проведением повторного анализа.
3. Поставляемый контроль не должен отличаться больше чем на 15% при использовании в дубликате.

Таблица и стандартная кривая типового анализа – **не использовать для расчета фактических результатов теста.**

См. оригинал инструкции.

образец	ожид. знач. (нг/мл)	факт. знач. (нг/мл)	восстановление %
1	6.30	6.40	100
2	4.67	4.56	98
3	10.10	10.91	108

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Рекомендуется проведение внутреннего контроля для каждого анализа. Результаты контроля должны находиться в пределах установленных диапазонов.

Поскольку ПСА – количественный тест, образцы нужно в общем определять в дубликатах.

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.

ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Здоровые мужчины имеют концентрацию ПСА 4.0нг/мл или менее.

Нормальные значения и значения Cut-off:

Нормальные значения определялись измерением образцов взятых у здоровых мужчин (n=100) с помощью тест-системы PSA-ELISA.

Нормальное значение: 1.34 ± 1.03 нг PSA/мл
(Среднее \pm S.D.)

Значение Cut-Off: 3.0 – 4.0 PSA/мл

Примечание: Вышеуказанные значения являются ориентировочными. Каждая лаборатория должна определить собственные нормальные значения.

РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

1. **Минимальный определяемый уровень:** предел для определения = 0.2нг/мл.
2. **Прецизионность:** Внутренний и внешний контроль правильности проводился исследованием сывороток трех пациентов с различными концентрациями ПСА. Результаты приведены в таблице 1 и 2.

Таб. 1. Внутритестовая прецизионность

пациенты	кол-во репликаторов	среднее нг/мл	ст. откл. нг/мл	КВ %
1	24	12,52	0,65	6,0
2	24	3,44	0,13	3,9
3	32	0,83	0,07	8,8

Таб. 2. Межтестовая прецизионность

пациенты	кол-во репликаторов	среднее нмол/л	ст. откл. нмол/л	КВ %
1	4	12,28	0,82	6,7
2	4	3,33	0,266	7,98

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

Таб. 3. Восстановление

Лунки	наименование	450 нм		Конц. нг/мл
1-2	Standard 0нг/мл	0,022	0,023	
3-4	Standard 1.56	0,178	0,180	
5-6	Standard 3.10	0,337	0,342	
7-8	Standard 6.20	0,611	0,568	
9-10	Standard 12.50	0,990	0,984	
11-12	Standard 25.00	1,574	1,562	
13-14	Control	0,421	0,400	3,98

4. **Специфичность:** Антитела, используемые в данном наборе высокоспецифичны к ПСА, имеют относительно низкую кросс-реактивность с другими протеинами и полипептидами, липидами или химиотерапевтическими веществами в образцах пациентов.

Таб. 4 Специфичность

антигены	добавл. кол-во	Перекрестн. реакция
Белки		нет
AFP	10 мкг/мл	нет
CEA	10 мкг/мл	нет
HCG	10 мкг/мл	нет
Lactalbumin	10 мкг/мл	нет
PAP	1 мкг/мл	нет
интерферирующие в-ва		
Bilirubin	0.2 мг/мл	нет
Triglyceride	15 мг/мл	нет
химиотерапевтические в-ва		
Cyclophosphamid	800 мкг/мл	нет
Doxorubicin *HCl	20 мкг/мл	нет
Diethylstilbestrol	2 мкг/мл	нет
Flutamide	10 мкг/мл	нет
Methorexate	50 мкг/мл	нет

Эффект Хука

Тест был проверен на наличие эффекта Хука. При концентрации ПСА до 2000 нг/мл - не наблюдается.

Соотношение

Тест система DRG общий PSA ELISA сравнивалась с Roche ElecSys total PSA:

$$Y = 0.9644 x + 0.0741$$

Калибровка

Тест система DRG общий PSA ELISA калибруется против Стандарта 96/670B03.

Информация для заказа:

ЧМП «ДИАМЕБ»
ул. Черновола, 97,
г. Ивано-Франковск, 76005
тел.: +38 (0342) 775122
тел/факс: +38 (0342) 775612
e-mail: info@diameb.com