УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ЗАО «АНАЛИТИКА»

П.Г. Каленик

«__» сентября 2010 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Набор реагентов для определения in vitro специфического антигена предстательной железы методом иммуноферментного анализа (PSA) производства фирмы HUMAN GmbH (Германия)

PSA

Иммуноферментный тест для количественного определения простата-специфического антигена в сыворотке крови человека

Набор рассчитан на 96 определений

НАЗНАЧЕНИЕ

Простата-специфический антиген (ПСА) представляет собой гликопротеин (сывороточную протеазу) с молекулярным весом 28400 дальтон, вырабатываемый эпителиальными клетками простаты, но может обнаруживаться также у женщин при раке молочной железы (30-40%). Присутствующий в сыворотке ПСА может определяться иммунологическими методами как в свободной, так и в связанной форме. Настоящий ИФА тест предназначен для определения общего ПСА.

Повышенный уровень ПСА наблюдается при доброкачественной гиперплазии, простатите, а также при доброкачественных, раковых и метастатических опухолях предстательной железы. Поскольку рак простаты занимает второе по частоте место среди злокачественных опухолей у мужчин, выявление повышенных уровней ПСА играет важную роль в ранней диагностике раковых заболеваний. Определение уровня ПСА в сыворотке дает больше полезной информации, чем определение уровня простатической кислой фосфатазы, при диагностике и терапевтическом мониторинге пациентов, благодаря большей чувствительности.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Набор HUMAN PSA ELISA основан на прямом определении антигена классическим ИФА методом и предназначен только для профессионального использования. В нем использованы высоко специфичные моноклональные антитела к ПСА, адсорбированные на лунках микропланшета и ковалентно связанные с ферментом. При первой инкубации образцы сыворотки, калибраторы или контроли и конъюгат антител с ферментом смешиваются, образуя при этом структуру типа «сэндвич», связанную с поверхностью лунок. После инкубации несвязавшийся конъюгат и моноклональные антитела удаляются промывкой. Добавление в лунки субстрата приводит к образованию окрашенного продукта, который меняет цвет на желтый при добавлении стоп-реагента, вносимого для остановки реакции. Интенсивность окраски измеряется при помощи специальных фотометров для микропланшетов или автоматических анализаторов (например, приборы линии HUMAREADER или ELISYS производства фирмы HUMAN) и пропорциональна концентрации ПСА в пробе. Численное значение концентрации определяется с помощью калибровочной кривой, построенной по калибраторам с известной концентрацией ПСА, входящим в состав набора.

© Перевод на русский язык ЗАО «АНАЛИТИКА», Москва, 2010
тел.: 737-0363, факс: 737-0365, e-mail: info@analytica.ru
ЭЛЕКТРОННАЯ КОПИЯ ОФОРМЛЕНА ЦЕНТРОМ ИСПЫТАНИЙ И РЕГИСТРАЦИИ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ

МАТЕРИАЛЫ И РЕАГЕНТЫ

Набор содержит реагенты, в количестве достаточном для выполнения 96 определений:

MIC	**Стрипы 8-луночные** (в рамке-держателе) Стрипы, разделяемые на отдельные лунки, покрытые моноклональными мышиными антителами к ПСА	12 шт.
CAL	**Калибраторы (A - F)*** (A - белая крышка, B – желтая, C – зеленая, D – красная, E – синяя, F – черная) Готовые к использованию; человеческие сыворотки, содержащие ПСА в концентрациях 0 (**A**), 2,5 (**B**), 5,0 (**C**), 10 (**D**), 25 (**E**) и 50 (**F**) нг/мл	6×2,0 мл
CON	**Конъюгат** (белая крышка) Готовый к использованию, красного цвета, содержащий моноклональные мышиные антитела к ПСА, меченые пероксидазой хрена	1×13 мл
WS	**Промывочный раствор** (белая крышка); концентрат (см. п. «Подготовка реагентов и проб»), Tris-буфер 10 ммоль/л; NaCl 8 г/л	1×50 мл
SUB	**Субстратный реагент** (черная крышка) Готовый к использованию, бесцветный или светло-голубой, содержащий 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ) 1,2 ммоль/л; перекись водорода ≤6,0 ммоль/л	1×13 мл
STOP	**Стоп-реагент** (красная крышка) Серная кислота 0,5 моль/л	1×15 мл
	Пленка для заклейки стрипов	1

- Общее содержание консервантов в реагентах < 0,1%.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Не пипетируйте реагенты ртом, не курите, не принимайте пищи во время исследования.
2. Избегайте контакта реагентов и проб с кожей и слизистыми.
3. В соответствии с правилами надлежащей лабораторной практики (GLP) пользуйтесь защитной одеждой и одноразовыми перчатками.
4. Обращайтесь с калибраторами CAL и пробами, как с потенциально инфицированными материалами.
5. Калибраторы CAL, входящие в состав набора, проверены на отсутствие антител к ВИЧ 1 и 2, вирусу гепатита С, а также HBs-антигена, тем не менее обращаться с ними надлежит, как с несущими потенциальную инфекционную опасность.
6. После исследования все материалы, контактировавшие с исследуемыми пробами или калибраторами, должны быть подвергнуты дезактивации автоклавированием в течение 1 часа при температуре 121 °С, или замачиванием в 5% растворе гипохлорита натрия в течение 1 часа.
7. Стоп-реагент STOP содержит серную кислоту, способную вызывать ожоги глаз и кожи. При попадании его на кожный покров и слизистые тщательно промойте их большим количеством проточной воды, после чего обратитесь к врачу.

ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ РЕАГЕНТОВ

Реагенты стабильны в течение срока годности, указанного на этикетках, в условиях хранения при температуре 2...8 °С.

После вскрытия флаконов реагенты следует хранить при температуре 2...8 °С и их следует использовать в течение 60 дней (см. также раздел ПРИМЕЧАНИЕ).

Стрипы MIC

Стрипы запаяны в пластиковый металлизированный пакет с влагопоглотителем.

Перед вскрытием упаковки стрипы должны быть прогреты до комнатной температуры во избежание конденсации влаги внутри лунок.

После вскрытия вакуумной упаковки остающиеся стрипы вернуть в пакет с влагопоглотителем и плотно закрыть его имеющейся на пакете самоуплотняющейся застежкой. Хранящиеся в таком виде при температуре 2...8 °С стрипы остаются пригодными к использованию до истечения срока годности (см. также раздел ПРИМЕЧАНИЕ).

Не касайтесь пальцами дна лунок и их верхней кромки.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ И ПРОБ

Перед использованием все реагенты должны быть прогреты до комнатной температуры (15-25 °C).
Не используемые реагенты должны храниться при температуре 2...8 °C.

Рабочий промывочный раствор WASH
Для получения рабочего промывочного раствора разведите концентрат WS в соотношении 1+20 свежей деионизированной водой, например, 50 мл WS+ 1000 мл воды = 1050 мл WASH
Промывочный раствор стабилен в течение **60 дней при 15-25 °C**.

Исследуемые пробы
Сыворотка крови.
Образцы должны быть получены до начала клинического вмешательства.
Не используйте образцы с микробной контаминацией, гемолизом или гиперлипемией.
Пробы могут храниться до 5 дней при температуре 2...8 °C, или до 30 дней при температуре минус 20 °C. Повторное замораживание проб не допускается. После размораживания пробы необходимо гомогенизировать. Видимые включения следует удалить центрифугированием или фильтрацией.

ПРОЦЕДУРА ИССЛЕДОВАНИЯ

Внимание! Точность полученных результатов зависит от строгого следования приведенной ниже процедуре исследования.

Предварительные замечания

P1: Не смешивайте реагенты из разных партий наборов. Не путайте крышки от флаконов. Не пользуйтесь просроченными реагентами.
P2: Не пользуйтесь реагентами, если они загрязнены, либо имеют запах или вид, отличный от обычного.
P3: Аккуратно впишите номера калибраторов CAL, контролей и проб в листок-формуляр, приложенный к оригиналу инструкции.
P4: Подсчитайте количество лунок, необходимое для данного исследования. Выньте необходимое количество стрипов MIC или отдельных лунок из упаковки и вставьте их в рамку-держатель.
P5: Исследование калибраторов CAL, контролей и проб должно проводиться **в дубликатах**. Вносить пробы и калибраторы CAL необходимо **как можно ближе ко дну лунки**.
P6: Всегда вносите реагенты в лунки в одном и том же порядке, чтобы свести к минимуму разброс по времени реакции между отдельными лунками. Это важно для воспроизводимости результатов. Общее время пипетирования не должно превышать 10 минут. В противном случае, калибраторы следует вносить в отведенные для них лунки после пипетирования первой половины проб. Если для анализа используется больше одного микропланшета, калибровку следует выполнять для каждого микропланшета.
P7: Любые воздушные пузырьки в лунках должны быть удалены до начала инкубации или измерения оптической плотности.
P8: Добавление субстрата SUB инициирует процесс развития окраски, который прерывается при добавлении стоп-реагента STOP. Во время развития окраски **предохраняйте ячейки от попадания яркого света.**
P9: После каждого пипетирования необходимо аккуратно перемешивать содержимое лунок в течение 20-30 секунд, избегая переноса жидкости из лунки в лунку. При возможности используйте шейкер для микропланшетов (например, встроенный шейкер планшетного фотометра HUMAREADER/ HUMAREADER PLUS).

Методика промывки

Промывка лунок является **исключительно важной стадией**. Недостаточная промывка ведет к снижению точности полученных результатов и завышению оптической плотности.
W1: Снимите со стрипов защитную пленку, после чего удалите жидкость из лунок и внесите в них промывочный раствор WASH. Через 30 секунд удалите жидкость из лунок и повторите промывку еще 4 раза.
W2: При использовании автоматического промывочного устройства заправьте его промывочным раствором и промойте лунки 5 раз. Следите за тем, чтобы вошер целиком заполнял ячейки жидкостью и полностью удалял ее через каждые 30 секунд (остаток жидкости должен быть менее 15 мкл).
W3: После окончания промывки **удалите остатки жидкости из лунок**, постукивая перевернутым микропланшетом (стрипом) о фильтровальную бумагу.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Последовательность операций

Перед использованием все реагенты и образцы должны быть прогреты до комнатной температуры.		
Стадия 1 Внесите в лунки:	**Лунка [объем жидкости в мкл]** **A1...D2** Калибраторы	**E2...** Образцы
CAL A – F; каждый в две лунки (дубликаты)	25	--
Образцы, контроли; каждый в две лунки (дубликаты)	--	25
Конъюгат CON во все лунки	100	100
Перемешайте и закройте стрипы MIC клейкой пленкой		
Инкубируйте **30 минут** при 20-25 °C.		
Промойте лунки 5 раз, как описано в методике промывания.		
Рабочий раствор промывочного буфера WASH	300	300
Стадия 2 Внесите в лунки:		
Субстрат SUB	100	100
Инкубируйте **15 минут** при 20-25 °C в темноте (см. предварительные замечания п.8).		
Стоп-реагент STOP	100	100
Тщательно перемешайте.		
После добавления стоп-реагента как можно быстрее (в течение не более чем 10 минут) измерьте оптическую плотность при длине волны **450 нм**, используя (по возможности) референтную длину волны 630-690 нм.		

РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Валидация теста

Результаты теста могут считаться достоверными, если выполняются следующие условия:

Калибраторы CAL	Приемлемое значение $ОП_{450}$ в лунках с калибраторами
A	≤ 0,05
B	≥ 3,0 × $ОП_{450}$ калибратора A
C	≥ 1,5× $ОП_{450}$ калибратора B
D	≥ 1,7 × $ОП_{450}$ калибратора C
E	≥ 1,8 × $ОП_{450}$ калибратора D
F	≥ 1,3 × $ОП_{450}$ калибратора E
F	≥1,2

Разница в величинах $ОП_{450}$ между дубликатами одного калибратора CAL не должна превышать 10%.

Расчет результатов

Для адекватной интерполяции результатов исследуемых образцов строится калибровочная кривая по значениям ОП калибраторов, по которой будут определяться значения концентраций ПСА в образцах. Необходимо построить кривую, откладывая по оси абсцисс (X) концентрации ПСА калибраторов CAL, а по оси ординат (Y) – соответствующие им значения оптической плотности.

Для расчета концентраций необходимо выбрать подходящий для этого случая тип кривой (например, «от точки к точке»).

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Частота заболеваемости раком простаты, вторым по распространенности онкологическим заболеванием у мужчин, резко возрастает в возрасте старше 50 лет. Наиболее чувствительным методом диагностики и терапевтического мониторинга этого заболевания является количественное определение ПСА в сыворотке крови. Концентрация ПСА хорошо коррелирует с величиной опухоли и стадией опухолевого процесса.

Повышенный уровень ПСА наблюдается не только при раке, но и при доброкачественной гиперплазии простаты (ДГП). В связи с этим результаты определения ПСА не могут являться единственным критерием при постановке диагноза онкологического заболевания и должны использоваться в совокупности с другими клиническими и лабораторными данными (например, результатами ректального или ультразвукового исследования предстательной железы). Для разграничения случаев ДГП и рака простаты могут быть полезными результаты определения свободного ПСА.

Повышенный уровень ПСА быстро снижается после хирургического удаления предстательной железы. Устойчивое сохранение его высоких концентраций указывает на остаточные участки злокачественных новообразований или метастазы.

Рост уровня ПСА при консервативной терапии свидетельствует о развитии рака простаты на его ранней стадии (на 6 месяцев раньше, чем позволяют выявлять другие диагностические методы).

Для дифференциальной диагностики онкологических и доброкачественных заболеваний полезно проводить определение свободного ПСА.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

ОГРАНИЧЕНИЯ

Гормональная терапия при раке простаты может влиять на экспрессию ПСА. Поэтому низкий уровень ПСА на фоне терапии рака простаты может не точно отражать присутствие остаточных участков или рецидивирующего заболевания. При постановке окончательного диагноза необходимо учитывать все лабораторные и клинические данные пациента.

ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Для здоровых мужчин уровень ПСА в сыворотке крови составляет менее 4 нг/мл.

Каждой лаборатории рекомендуется самостоятельно определять диапазон нормальных концентраций ПСА с учетом используемого оборудования, способа взятия крови и методики анализа.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Аналитическая чувствительность теста HUMAN PSA ELISA составляет 0,1 нг ПСА/мл.

Пробы с концентрацией ПСА выше 50 нг/мл следует развести в соотношении 1+9 предварительно охарактеризованной человеческой сывороткой с подтвержденной концентрацией ПСА <0,1 нг/мл. Полученный при этом результат умножают на 10. (Не рекомендуется разводить сыворотки с помощью CAL A).

Сведения об аналитических характеристиках ИФА теста ПСА фирмы HUMAN можно найти в Отчете об испытаниях, опубликованном в Интернете на сайтах:

http://www.human.de/data/gb/vr/el-psa.pdf

или

http://www.human.de.com/data/gb/vr/el-psa.pdf

Примечание

Компоненты набора стабильны до окончания указанного срока годности даже после вскрытия их упаковки. Тем не менее, контаминация реагента зависит от количества отборов реагентов. 60-дневный срок использования реагентов установлен из соображения надежности получения результатов.

При работе с набором следует обеспечить постоянное соблюдение в лаборатории основных требований GLP (надлежащей лабораторной практики).

Данные требования в т.ч. включают: необходимость плотно закрывать флаконы их собственными крышками немедленно после отбора реагентов; отбирать только необходимое количество реагента, если предполагается его соприкосновение с другими растворами, способными вызвать контаминацию, например образцами пациентов; как можно быстрее возвращать исходные реагенты, если они не используются, в стандартные условия хранения (2...8 °C).

Всегда должно проверяться соблюдение условий достоверности результатов теста.

СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

Список литературы приведен в оригинале инструкции на английском языке.

Внимание! Перевод сделан с английского оригинала инструкции.

Начальник отдела продукции К.И. Бланк

© Перевод на русский язык ЗАО «АНАЛИТИКА», Москва, 2010
тел.: 737-0363, факс: 737-0365, e-mail: info@analytica.ru
ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU