

НАБОР свободный ПСА [I-125] IRMA

(Номер по каталогу: RK-85CT)

Система свободный ПСА [I-125] IRMA позволяет проводить прямое количественное определение свободного простат-специфического антигена (сПСА) *in vitro* в сыворотке крови человека. Количественное определение свободного ПСА может проводиться в диапазоне 0-30 нг/мл, при этом используются образцы сыворотки объемом 50 мкл.

Введение

Простат-специфический антиген (ПСА) это тканеспецифичная сывороточная протеаза, сходная с химотрипсино-подобными glandularными калликреинами. Активный фермент представляется собой одноцепочечный гликопротеин, состоящий из 237 аминокислот (приблизительно 30 кДа). ПСА в основном отвечает за разжижение семенной жидкости в свежем эякуляте путем протеолиза основных гелеобразующих белков. Большая часть (70-90 %) ПСА в сыворотке находится в связанном с альфа1-антихимотрипсином (АСТ) состоянии. Уровень общего ПСА (свободный + АСТ-комплекс) повышается как при доброкачественной гиперплазии простаты, так и при раке простаты. Важной особенностью иммунологического метода определения свободного ПСА является его пригодность для диагностики рака предстательной железы и определения стадии заболевания. Было продемонстрировано, что соотношение свободный/общий ПСА выше при доброкачественной гиперплазии предстательной железы, чем при раке предстательной железы. В соответствии с данными литературы, оптимальное пороговое значение показателя соотношения свободный/общий ПСА составляет 25%.

Принцип метода

Технология, применяемая в системе иммуно-радиометрического количественного определения (IRMA), предполагает использование двух высокоаффинных моноклональных антител.

Сигнальное антитело, меченое ¹²⁵I, связывается с эпитопом молекулы сПСА, которая отличается от

молекулы, которая распознается биотин-захватывающим антителом. Два антитела одновременно реагируют с антигеном, который присутствует в стандарте или в образце, что приводит к образованию комплекса иммобилизованное антитело – антиген – сигнальное антитело, также известного как "сэндвич".

В течение 2-часового инкубационного периода при непрерывном помешивании иммуно-комплекс иммобилизуется на реактивной поверхности пробирок, покрытых стрептавидином. Затем реакционную смесь извлекают, пробирки тщательно промываются, и производится замер их радиоактивности в гамма-счетчике. Концентрация антигена прямо пропорциональна радиоактивности, измеренной в пробирках. Путем построения калибровочной кривой, в которой отражаются полученные значения в сравнении с серией калибраторов, содержащих известное количество сПСА, может быть определена искомая концентрация сПСА в образцах пациента.

Содержание набора

- 1 флакон (11 мл) МЕТКИ, готовой к использованию. Содержит около 740 кБк ¹²⁵I-анти-сПСА и иммобилизованные анти-ПСА антитела в буфере с красным красителем и 0.1 % NaN₃.
- 6 флаконов СТАНДАРТОВ (6 x 1.0 мл, S0-S5), готовых к использованию, содержащих 0; 0.3; 1; 3; 10 и 30 нг/мл человеческого сПСА в сыворотке бычьей крови с 0.1% NaN₃. (откалиброваны по ВОЗ ECBS 96/668).
- 2 флакона КОНТРОЛЬНОЙ СЫВОРОТКИ (2 x 1.0 мл), готовой к использованию, содержащей сыворотку крови человека с 0,1% NaN₃. Концентрация контрольных сывороток указана в прилагаемом сертификате качества. См. *Приготовление реактивов.*
- 2 упаковки ПРОБИРОК С ПОКРЫТИЕМ, готовых к использованию. 2X50 пробирок для проведения реакции, 12x75 мм, упакованные в пластиковые коробки.

Сертификат качества
Листок-вкладыш

Необходимые материалы, инструменты и оборудование

Штатив для пробирок, высокоточные автоматические пипетки со сменными наконечниками (50, 100 и 2000 мкл), дистиллированная вода, вихревая

мешалка, шейкер, полимерная пленка абсорбирующая ткань, гамма-счетчик.

Рекомендуемые инструменты и оборудование

автоматические пипетки (напр., Eppendorf и др.), диспенсер с резервуаром 1л (вместо 2мл пипетки).

Сбор и хранение образцов

Образцы сыворотки могут быть подготовлены в соответствии с общей процедурой, которая обычно используется в клинической лабораторной практике. Образцы могут храниться при температуре 2-8 °С, если исследование проводится в течение 24 часов, иначе аликвоты следует готовить и хранить в условиях глубокой заморозки (-20 °С). Перед анализом замороженные образцы следует разморозить и тщательно перемешать.

Хранение

Открытые реактивы следует хранить при температуре 2-8 °С. При такой температуре каждый реактив стабилен до окончания срока годности набора. Фактический срок годности указан на этикетке упаковки и в сертификате качества.

ВНИМАНИЕ!

Уравновесьте все реагенты и образцы сыворотки до комнатной температуры. Тщательно смешайте все реактивы и образцы перед использованием. Избегайте чрезмерного пенообразования.

Процедура количественного определения

(Краткое описание см. в Таблице 1.)

1. Перед использованием уравновесьте реактивы и образцы до комнатной температуры.
2. Промаркируйте в двух экземплярах пробирки с покрытием для каждого стандарта (S0-S5), контрольной сыворотки и образцов.
3. Гомогенизируйте все реактивы и образцы аккуратным перемешиванием, избегая вспенивания.
4. С помощью пипетки поместите по **50 мкл** стандартов, контрольной сыворотки и образцов в соответствующим образом промаркированные пробирки. Используйте штатив для фиксации пробирок. Не дотрагивайтесь и не царапайте внутреннюю поверхность пробирок наконечником пипетки.
5. С помощью пипетки поместите в каждую из пробирок **100 мкл** метки.
6. Закройте все пробирки полиэтиленовой пленкой. Прочно зафиксируйте штатив на шейкере. Включите шейкер и настройте

- скорость таким образом, чтобы жидкость в каждой пробирке постоянно вращалась и перемешивалась (рекомендуемая скорость 600 об/мин).
7. Инкубируйте пробирки на шейкере в течение **2 часов** при комнатной температуре.
 8. В каждую пробирку добавьте **2.0 мл** дистиллированной воды. Слейте супернатант из всех пробирок путем переворачивания штатива. Поместите штатив в перевернутом состоянии на 2 минуты на фильтровальную бумагу.
 9. Верните штатив в исходное положение и повторите шаг 8 еще один раз.
 10. Определите радиоактивность каждой пробирки, поместив ее в гамма-счетчик как минимум на 60 секунд.
 11. Рассчитайте концентрацию сПСА в образцах, как это описано в разделе «расчет результатов» или используйте для этого специальное программное обеспечение.

Таблица 1. Протокол количественного определения, методика введения с помощью пипетки (все объемы представлены в микролитрах)

Пробирки	Всего	Стандарт	Контрольный образец	Образец
Стандарт		50		
Контрольный образец			50	
Образец				50
Метка	100	100	100	100
Перемешивать в течение 2 часов при комнатной температуре				
Дистиллированная вода		2000	2000	2000
Удалите жидкость и поместите перевернутые пробирки на фильтровальную бумагу				
Дистиллированная вода		2000	2000	2000
Удалите жидкость и поместите перевернутые пробирки на фильтровальную бумагу				
Измерьте уровень радиоактивности (60 сек/пробирка)				
Рассчитайте результаты				

Расчет результатов

Расчет представлен с использованием репрезентативных данных. Полученные данные должны быть схожими с данными, представленными в Таблице 2. Рассчитайте среднее значение в минуту (CPM) для каждой пары исследуемых пробирок. Рассчитать нормализованное процентное связывание для каждого стандарта, контрольной сыворотки и образца соответственно, используя следующую формулу:

$$B/T(\%) = \frac{S_{1-5} / C / M_x (\text{cpm}) - S_0 (\text{cpm})}{T(\text{cpm})} \times 100$$

Используя полулогарифмическую миллиметровую бумагу, постройте график В/Т (%) для каждого стандарта в соответствии с соответствующей концентрацией сПСА.

Определите концентрацию сПСА в неизвестных образцах методом интерполяции данных калибровочной кривой. Не экстраполируйте значения, находящиеся за пределами диапазона калибровочной кривой.

Из доступных прикладных программ автоматической обработки данных, в данном случае можно использовать логит-преобразование или аппроксимацию данных с помощью сплайн-функций.

Таблица 2. Типичные данные количественного определения

Пробирки	Конц. (нг /мл)	Количество cpm	B/T%
T		263791	
S0	0	174	0.07
S1	0.3	1309	0.5
S2	1	3882	1.5
S3	3	10238	3.9
S4	10	31598	12
S5	30	94990	36
CI	2.8	9621	3.65
СИ	7.89	25088	9.51

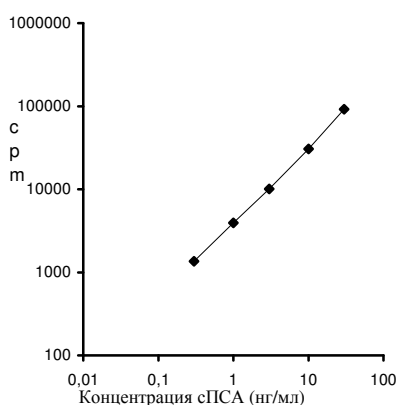


Рисунок 1: Типичная стандартная кривая (Не использовать для подсчета значений неизвестных образцов)

Характеристика количественного определения

Чувствительность

Аналитическая чувствительность составляет 0,02 нг/мл, была определена на основании данных 20 повторных определений нулевого стандарта. Чувствительность определялась как концентрация, соответствующая сумме средних значений cpm и двойное стандартное отклонение.

Функциональная чувствительность составляет 0,04 нг/мл, была определена на основании экстраполяции значения 22% профиля точности между количественными определениями, полученного при 10

независимых исследований образцов пациентов с низкой концентрацией эндогенного сПСА.

На основании данных 120 определений на 60 холостых образцах и 60 образцах с низкой концентрацией с 95% вероятностью были установлены пределы измерения:

Предел холостого образца: 0,03 нг/мл
 Предел обнаружения: 0,05 нг/мл
 При получении результата ниже предела холостого образца следует регистрировать как «аналит не обнаружен». При получении результата выше предела холостого образца но ниже предела обнаружения, его следует регистрировать как «аналит обнаружен», концентрация менее 0,05 нг/мл.

Специфичность

В данном наборе IRMA используются моноклональные антитела, специфичные для сПСА. Не было выявлено перекрестной реакции со следующими анализируемыми компонентами: СЕА, AFP, СА 19-9, СА 125, РАР, альбумин, гликопротеин, билирубин, человеческий IgG.

Точность

Образцы, полученные от 5 пациентов, были проанализированы в 15 повторах для определения точности в ходе количественного определения. Полученные значения представлены ниже.

Образец (No.)	Колво повторов	Среднее значение (нг/мл)	CV %
1	15	0.38	5.53
2	15	0.83	3.22
3	15	1.68	2.61
4	15	1.82	1.75
5	15	5.26	2.66

Воспроизводимость

Для определения точности между количественными определениями были протестированы 5 образцов сывороток пациентов дважды, в 20 независимых анализах, выполненных 2 операторами, с использованием наборов различных партий. Полученные значения приведены ниже.

Образец (No.)	Колво анализов	Среднее значение (нг/мл)	CV %
1	20	0.36	7.42
2	20	0.79	6.74
3	20	1.66	3.57
4	20	1.79	4.26
5	20	5.33	4.26

Тест разведения (линейность)

Исследование 6 образцов проводилось в серии разведений с нулевым стандартом. Приведенная ниже формула, полученная для измеренной (Y) концентрации в сравнении с ожидаемой (X), указывает на хорошую линейность:

$$y = 1.0157x - 0.2819 \quad R^2 = 0.987 \quad n = 20$$

Восстановление

Восстановление было определено как измеренное увеличение, выраженное в процентах от ожидаемого роста насыщения образцов сыворотки известным количеством сПСА. Среднее значение восстановления (\pm CO) составило $97,3 \pm 9,6\%$.

Ожидаемые значения

Здоровые взрослые мужчины: < 0.3 нг/мл ($n = 211$, 95% доверительный интервал).

Рекомендуется, чтобы каждая лаборатория самостоятельно устанавливала интервалы эталонных значений для своей группы больных.

Ограничения

- Реактивы, предоставленные в данном наборе, оптимизированы для измерения уровня свободного ПСА в сыворотке крови.
- Не следует использовать гемолизированные и липемические образцы, так как они могут дать ложные значения.
- При концентрациях свободного ПСА до 6000 нг/мл высокодозный «эффект крючка» отсутствовал. Образцы сыворотки с концентрацией выше, чем в самом концентрированном стандарте, следует развести с помощью нулевого стандарта и провести анализ еще раз.
- Результаты исследования следует использовать совместно с другой релевантной клинической информацией.

Примечания к методике

1) **Источник ошибки!** Опытные реакционные пробирки, упакованные в пластиковые коробки, индивидуально не промаркированы. Необходимо следить за тем, чтобы они не перемешивались с обычными опытными пробирками. Для минимизации риска не следует брать из пластиковой коробки больше пробирок, чем необходимо для проведения исследования, а после

выполнения работы класть их обратно в коробку. Пробирки для количественного определения рекомендуется пометить маркером.

2) **Источник ошибки!** Для обеспечения эффективного вращения пробирки должны быть плотно закреплены в штативе. Никогда не используйте штативы с открытым отверстием. Неравномерное или неполное встряхивание может стать причиной низкой эффективности количественного определения.

3) **Добавление дистиллированной воды.** Для добавления дистиллированной воды рекомендуется использование обычного лабораторного диспенсера со стеклянной емкостью объемом 1 л и гибкого выпускника для пробирки. При отсутствии данного оборудования может использоваться шприц большого объема, соединенный с пипеткой для серийного введения.

Дополнительная информация

Не следует смешивать между собой или заменять компоненты из различных партий или наборов разных производителей.

Меры предосторожности

Радиоактивность

Данный продукт содержит радиоактивный материал. Пользователь несет ответственность за соблюдение местных законов или правил, касающихся порядка использования радиоактивных материалов.

Биологическая опасность

Продукты человеческой крови, которые используются в наборе, были получены от здоровых доноров. Они были подвергнуты индивидуальным исследованиям с использованием утвержденных методик (ФИА, ферментативный иммуноферментный анализ), по результатам которых были получены отрицательные результаты на наличие антител к вирусу иммунодефицита человека (анти-ВИЧ-1, 2), антител к вирусу гепатита С (anti-HCV), поверхностных антигенов вируса гепатита В (HBsAg), антитрепонемных антител. При работе с образцами, полученными от человека, которые подлежат исследованию с использованием диагностических наборов, необходимо всегда соблюдать осторожность. Даже если пациент прошел необходимые обследования, ни один из методов не может дать полной гарантии отсутствия инфекционных агентов. Следовательно, с образцами крови человека необходимо обращаться как с *потенциально инфекционно опасным материалом*.

Компоненты бычьего происхождения были получены из стран, в которых не выявлялись случаи бычьей спонгиозной энцефалопатии. Тем не менее, части набора, содержащие компоненты животного происхождения, должны рассматриваться как *потенциально инфекционно опасный материал*.

Все продукты животного происхождения и их производные были получены у здоровых животных. Тем не менее, части набора, содержащие компоненты животного происхождения, должны рассматриваться как *потенциально инфекционно опасный материал*.















Химическая опасность

В качестве антибактериального агента компоненты содержат азид натрия. При утилизации отходы следует смывать большим количеством воды, чтобы предотвратить накопление взрывоопасных азидов металлов в системе водопровода. Содержание азидов в каждой упаковке составляет 19 мг.

Условия хранения и срок годности

Хранить при температуре 2-8°C.

Срок годности: 60 дней с момента готовности.

	Использовать до		Контроль
	Номер партии		Стандарт
	Внимание, обратитесь к сопроводительным документам		Пробирка с покрытием
	Биологическая опасность		Метка
	См. руководство по использованию		
	Устройство для проведения диагностики in vitro		Температурный предел Хранить при температуре 2-8°C
	Производитель		Радиоактивный материал
	Номер по каталогу		

CE 1011

Сайт: <http://www.izotop.hu>
Технический e-mail: immuno@izotop.hu
Коммерческий e-mail: commerce@izotop.hu



INSTITUTE OF ISOTOPES LTD.
1535 Budapest Pf.: 851.
Тел.: (36-1)392-2577,
Факс: (36-1)395-9247