

НАБОР ЧПСА [I-125] IRMA

(Номер по каталогу: RK-10CT)

Система чПСА [I-125] IRMA позволяет проводить прямое количественное определение простат-специфического антигена (ПСА) *in vitro* в сыворотке крови человека. Количественное определение ПСА может проводиться в диапазоне 0-100 нг/мл, при этом используются образцы сыворотки объемом 25 мкл.

Введение

Простат-специфический антиген (ПСА) это тканеспецифичная сывороточная протеаза, сходная с химотрипсино-подобными glandулярными калликреинами. Активный фермент представляет 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 (АХТ) состоянии. Уровень общего ПСА (свободный + АХТ-комплекс) повышается как при доброкачественной гиперплазии простаты, так и при раке простаты. Надежность определения ПСА долгое время подвергалась сомнениям учеными из-за определенных аналитических сложностей. Иммунологические методы исследования позволяют определить две формы ПСА в различных молярных соотношениях, что может приводить к значительной разнице получаемых величин. В идеале, достоверный иммунологический метод определения общего ПСА характеризуется эквимольной реакцией как со свободной формой ПСА, так и с ПСА в составе комплексов, в отличии от метода, обладающего различной иммунореактивностью по отношению к этим формам («метод с асимметричной реакцией»). Недостаток международных руководств еще более затрудняет достоверное определение уровня ПСА в сыворотке.

Данная система IRMA характеризуется эквимольной реакцией с двумя указанными формами ПСА, и была прокалибрована согласно утвержденным FDA иммунологическим методам в

соответствии с рекомендациями международного комитета по стандартизации.

Принцип метода

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

Сигнальное антитело, меченое ^{125}I , связывается с эпитопом молекулы ПСА, 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 1-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 ПСА, может быть определена искомая концентрация ПСА в образцах пациента.

Содержание набора

- 1 флакон (11 мл) МЕТКИ, готовой к использованию. Содержит около 980 кБк ^{125}I -анти-ПСА и иммобилизованные анти-ПСА антитела в буфере с красным красителем и 0.1% NaN_3 .
- 7 флаконов СТАНДАРТОВ (7 x 1.0 мл, готовых к использованию, содержащих (S0-S6) 0; 0.1; 0.5; 2, 8; 25 и 100 нг/мл человеческого ПСА в сыворотке бычьей крови с 0.1% NaN_3 . (откалиброваны по ВОЗ ECBS 96/670).
- 2 флакона КОНТРОЛЬНОЙ СЫВОРОТКИ (2 x 1.0 мл), готовой к использованию, содержит сыворотку крови человека с 0,1% NaN_3 . Концентрация контрольных сывороток указана в прилагаемом сертификате качества.
- 2 упаковки ПРОБИРОК С ПОКРЫТИЕМ, готовых к

использованию. 2 x 50 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 (25, 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 1 л (вместо 2 мл 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°C, если исследование проводится в течение 24 часов, иначе аликвоты следует готовить и хранить в условиях глубокой заморозки (-20°C). Перед анализом замороженные образцы следует разморозить и тщательно перемешать. Следует избегать повторного замораживания и размораживания реактивов. Не следует использовать липемические, гемолизированные или мутные образцы.

Хранение

Открытые реактивы следует хранить при температуре 2-8 °C. 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.

Использование контрольной сыворотки

Надлежащая лабораторная практика требует использования контрольных сывороток в каждой серии анализов для проверки качества полученных результатов. Со всеми образцами

следует обращаться одинаково, анализ результатов рекомендуется проводить с использованием соответствующих статистических методов.

Процедура количественного определения

(Краткое описание см. в Таблице 1.)

1. Промаркируйте в двух экземплярах пробирки с покрытием для каждого стандарта, контрольной сыворотки и образцов.
2. Гомогенизируйте все реактивы и образцы аккуратным перемешиванием, избегая вспенивания.
3. С помощью пипетки поместите по **25 мкл** стандартов, контрольной сыворотки и образцов в соответствующим образом промаркированные пробирки. Используйте штатив для фиксации пробирок. Не затрагивайте и не царапайте внутреннюю поверхность пробирок кончиком пипетки.
4. С помощью пипетки поместите в каждую из пробирок **100 мкл** метки (При желании отложите 2 пробирки без покрытия для общего подсчета).
5. Закройте все пробирки полимерной 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).
6. Инкубируйте пробирки на шейкере в течение **1 часа** при комнатной температуре.
7. 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.
8. Верните штатив в исходное положение и повторите шаг 7 еще один раз.
9. Определите радиоактивность каждой пробирки, поместив ее в гамма-счетчик как минимум на 60 секунд.
10. Рассчитайте концентрацию ПСА 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		25		
Контрольный образец			25	
Образец				25
Метка	100	100	100	100
Перемешивать в течение 1 часа 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 (СРМ) для каждой пары исследуемых пробирок.

Рассчитайте нормализованное процентное связывание для каждого стандарта, контрольной сыворотки и образца соответственно, используя следующую формулу:

$$B/T(\%) = \frac{S_{i-6} / C / M_x (\text{cpm}) - S_0 (\text{cpm})}{T(\text{cpm})} \times 100$$

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

Определите концентрацию ПСА 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.

Также возможно использование автоматизированных систем расчета результатов.

Таблица 2. Типичные данные количественного определения

Пробирки	Конц. (нг/мл)	Среднее значение СРМ	В/Т%
T		392944	-
S0	0	292	0.00
S1	0.1	630	0.09
S2	0.5	1454	0.30
S3	2	4665	1.11
S4	8	17011	4.25
S5	25	49586	12.54
S6	100	175399	44.56
CI	3.67	8236	2.03
СИ	8.73	18171	4.55

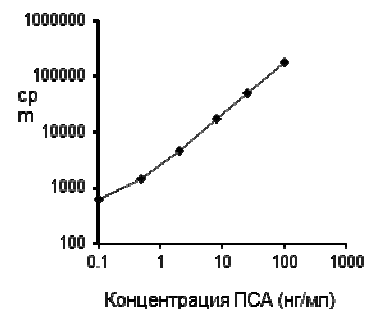


Рисунок 1: Типичная стандартная кривая
(Не использовать для подсчета значений неизвестных образцов)

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 СРМ и двойного стандартного отклонения.

Предел холостого раствора (ПХ), Предел обнаружения (ПО) и Предел количественного определения (ПКО) были определены в соответствии с руководством CLSI документ EP17.

ПХ = 0,035 нг/мл определяется как наивысший результат измерения, который может наблюдаться (с заявленной вероятностью [5%]) для холостого образца.

ПО = 0,09 нг/мл определяется как доля ложноположительных результатов (α) менее 5% и ложноотрицательных результатов (β) менее 5%, на основании 120 определений с 4 холостыми пробами и 6 образцами с низким уровнем концентрации.

ПКО = 0,12 нг/мл, графически определяется по кривой профиля точности.

Точность

Образцы, полученные от 5 пациентов, были проанализированы в 15 повторях для определения внутрисубъектной вариабельности. Полученные значения представлены ниже.

Образец (No.)	Кол-во повторов	Среднее значение (нг/мл)	CV %
1	15	0.94	3.74
2	15	1.98	1.86
3	15	4.12	3.24
4	15	8.43	2.25
5	15	17.24	1.36

Воспроизводимость

Для определения межсубъектной вариабельности были протестированы 5 образцов сывороток пациентов дважды, в 20 независимых анализах, выполненных 4 операторами, с использованием наборов различных партий. Полученные значения приведены ниже.

Образец (No.)	Колво анализов	Среднее значение (нг/мл)	CV %
1	20	0.99	5.64
2	20	2.03	4.22
3	20	4.27	2.76
4	20	8.83	2.70
5	20	17.70	2.88

Специфичность

Перекрестная реакция была оценена как неопределяемая в диапазонах измерения hCG, hPRL, hLH, hFSH, hTSH и AFP.

Тест разведения (линейность)

Для определения человеческого ПСА с помощью ПСА IRMA была продемонстрирована линейность метода в диапазоне от 0,12 нг/мл (ПКО) до 104,1 нг/мл.

Восстановление

Восстановление было определено как измеренное увеличение, выраженное в процентах от ожидаемого роста насыщения образцов сыворотки известным количеством ПСА. Среднее значение восстановления составило 96,3% с диапазоном 86,13-103,15%.

Ожидаемые значения

Здоровые взрослые мужчины: <3.0 нг/мл (n = 285).

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

Возраст (годы)	N	нг/мл ПСА (< среднее значение + 3 CO)
20-30	76	< 1.2
31-40	57	< 2.6
41-50	54	< 2.7
51-60	68	< 2.8
> 60	34	< 4.4

Ограничения

• Реактивы, предоставленные в данном наборе, оптимизированы для измерения уровня ПСА в сыворотке крови.

• При концентрациях ПСА до 20000 нг/мл «высокодозный эффект крючка» отсутствовал. Образцы сыворотки с концентрацией ПСА 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 рекомендуются 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), антирепепонемных 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 20 мг.

Условия хранения и срок годности

Хранить при температуре 2-8°C. Срок годности: 60 дней с момента готовности.

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

CE 1011

Сайт: <http://www.izotop.hu>

Технический e-mail: immuno@izotop.hu
Коммерческий e-mail: commerce@izotop.hu

IZOTOP

INSTITUTE OF ISOTOPES LTD.

1535 Budapest Pf.: 851.

Тел.: (36-1)392-2577,

Факс: (36-1)395-9247

Обновлено: март 2020