

Код ОКП 939817

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора
от 200 г.
№

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор
ООО «Научно-производственное
объединение «Диагностические
системы»

И. Е. Колосов

2008 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
«ДС – ИФА – ПСАобщий»

Тест-система иммуноферментная для количественного определения
общего простата-специфического антигена

1. Назначение

1.1. Набор реагентов «ДС – ИФА – ПСАобщий» предназначен для количественного определения общего простата-специфического антигена (ПСА) в сыворотке крови человека методом твёрдофазного иммуноферментного анализа (ИФА).

1.2. ПСА - гликопротеин с молекулярной массой 33 кДа, относящийся к калликреиновому семейству сериновых протеаз. ПСА продуцируется эпителиальными клетками простаты, присутствует в семенной жидкости и в более низких концентрациях в сыворотке крови и моче. ПСА отвечает за разжижение семенной жидкости после эякуляции. Основная форма содержания ПСА в сыворотке крови – комплексы с ингибиторами протеаз, доля свободного ПСА невелика.

Под общим ПСА, определяемым иммунологическими методами, подразумевается суммарное количество ПСА, связанного с альфа-1-антихимотрипсином, и свободной фракции ПСА. Повышение уровня общего ПСА выше 4 нг/мл свидетельствует о патологиях предстательной железы: доброкачественной гиперплазии и аденокарциноме простаты. Определение

соотношения ПСА свободного к ПСА общему служит для разграничения злокачественных и доброкачественных новообразований простаты. Уровень ПСА свободного существенно выше при гиперплазии предстательной железы, чем при раке простаты. Значение соотношения ПСА свободного к ПСА общему $< 10\%$ с высокой долей вероятности свидетельствует о злокачественной опухоли, при значении $> 25\%$ рак простаты маловероятен. Определение уровня ПСА является важнейшим средством для контроля эффективности проведенной терапии.

1.3. Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах в 48 пробах (40 неизвестных проб, одна проба контрольной сыворотки, шесть калибровочных проб и одна проба для определения оптической плотности ТМБ-Субстратного раствора) при одновременном использовании всех стрипов планшета.

В случае дробного применения набора: необходимо обязательное использование всех калибровочных проб при каждой постановке; набор может быть использован в течение месяца после вскрытия реагентов набора.

2. Характеристика набора

2.1. Принцип действия.

В наборе «ДС-ИФА-ПСАобщий» применен «сэндвич»-вариант твердофазного ИФА. Для реализации его использованы два моноклона антител с разной специфичностью к двум доменам молекулы ПСА: первые (немеченные) иммобилизованы на твердой фазе, вторые (меченные пероксидазой хрена) входят в состав конъюгата. В лунках планшета во время инкубации происходит одновременное связывание содержащегося в исследуемом образце ПСА с антителами, иммобилизованными на твердой фазе, и антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена.

Количество связавшегося конъюгата прямо пропорционально количеству общего ПСА в образце сыворотки крови.

Во время инкубации с ТМБ-Субстратным раствором происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски прямо пропорциональна

количеству общего ПСА в образце сыворотки крови. После измерения оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочного графика рассчитывается концентрация общего ПСА в исследуемых образцах.

2.2. Состав набора:

- иммуносорбент – планшет полистироловый разборный (12 стрипов по 8 лунок каждый) с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок моноклональными антителами к общему ПСА, маркирован «Иммуносорбент» — 1 шт;

- конъюгат – моноклональные антитела к общему ПСА, конъюгированные с пероксидазой хрена; прозрачная или опалесцирующая розового цвета жидкость; маркирован «Конъюгат» — 1 фл. (12,0 мл);

- калибровочные пробы, содержащие известные концентрации общего ПСА, аттестованные в соответствии с Первым международным стандартом ВОЗ 96/670; прозрачные или опалесцирующие желтого цвета жидкости; калибровочный материал может отличаться от заявленного по значениям концентрации общего ПСА (нг/мл), значения концентраций общего ПСА указаны на этикетках флаконов и в аналитическом паспорте качества; маркированы:

«Калибратор 0» (0 нг/мл) - 1 фл. (2,0 мл);

«Калибратор 1» (1,0 нг/мл) - 1 фл. (0,5 мл);

«Калибратор 2» (2,5 нг/мл) - 1 фл. (0,5 мл);

«Калибратор 3» (5,0 нг/мл) - 1 фл. (0,5 мл);

«Калибратор 4» (10,0 нг/мл) - 1 фл. (0,5 мл);

«Калибратор 5» (30,0 нг/мл) - 1 фл. (0,5 мл);

- контрольная сыворотка с известным содержанием общего ПСА; прозрачная или опалесцирующая желтого цвета жидкость; значение концентрации общего ПСА в сыворотке указано на этикетке флакона и в аналитическом паспорте качества, маркирована «Контрольная сыворотка» - 1 фл. (0,5 мл);

- промывочный раствор, концентрат; прозрачная или слегка опалесцирующая, бесцветная или светло-жёлтого цвета жидкость, допустимо образование осадка, полностью растворяющегося при температуре от 35 до 39 °С и встряхивании; маркирован «ПР (концентрат x 25)» — 1 фл. (50,0 мл);

- ТМБ-Субстратный раствор, прозрачная бесцветная жидкость; маркирован «ТМБ-Субстратный раствор» — 1 фл. (12,0 мл);

- серная кислота в концентрации 0,2 моль/л; прозрачная бесцветная жидкость; маркирована «Стоп-реагент/0,2М» - 1 фл. (15,0 мл);

- инструкция по применению – 1 шт;

- бланк для построения калибровочной кривой – 1 шт.

Дополнительно в комплект поставки могут быть включены:

-крышка к полистироловым 96-луночным планшетами;

-одноразовые наконечники;

-пластиковая ванночка для жидких реагентов;

-пластиковая скрепка для закрывания пакета с иммуносорбентом.

3. Аналитические и диагностические характеристики набора

3.1. Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая концентрация общего ПСА в сыворотке крови человека не превышает 0,3 нг/мл.

3.2. Специфичность. Оба моноклональных антитела, используемые в наборе, демонстрируют эквимолярное взаимодействие, как со свободным ПСА, так и с ПСА-АХТ комплексом. Не обнаружено перекрестной реакции моноклональных антител к калликреину 2 человека.

3.3. Коэффициент вариации результатов определения общего ПСА в одном и том же образце с использованием набора не превышает 8 %.

3.4. Линейность. Зависимость концентрации общего ПСА имеет линейный характер в диапазоне концентраций калибровочных проб №1–№5. Значение «линейности» должно находиться в пределах от 90 до 110%.

3.5. Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» общего ПСА – соответствие измеренной концентрации общего

ПСА предписанной в пробе, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы №1. Процент открытия составляет от 90 до 110%.

3.6. Клиническая проверка. Концентрацию общего ПСА измеряли в образцах сыворотки крови, взятой с 9 до 11 ч у 157 мужчин в возрасте от 21 до 50 лет. Средняя концентрация общего ПСА составила $0,89 \pm 0,7$ нг/мл.

3.7. Рекомендуется в каждой лаборатории при использовании набора уточнить значения концентраций общего ПСА, соответствующие нормальным значениям для конкретной территории.

4. Меры предосторожности

4.1. Потенциальный риск применения набора — класс 2а.

4.2. Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

4.3. При работе с набором следует соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

4.4. Стоп-реагент представляет собой 0,2 М раствор серной кислоты. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания раствора стоп-реагента на кожу и слизистые необходимо промыть пораженный участок большим количеством проточной воды.

4.5. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, т.к. исследуемые образцы сывороток крови являются потенциально инфицированным материалом, в котором длительное время могут сохраняться возбудители ВИЧ, парентеральных вирусных гепатитов и других инфекционных заболеваний.

4.6. Химическая посуда и оборудование, которые используются в работе с набором, должны быть соответствующим образом маркированы и храниться отдельно.

4.7. Запрещается прием пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами.

5. Оборудование и материалы, необходимые при работе с набором:

- спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках планшета при длине волны 450 нм;
- термостатируемый шейкер, позволяющий производить встряхивание со скоростью от 500 до 800 об/мин при температуре от 18 до 24 °С;
- устройство для промывания планшетов (вошер);
- дозаторы пипеточные полуавтоматические одноканальные с изменяемым объемом отбора жидкостей: на 5–50 мкл; на 40–200 мкл; на 200–1000 мкл; на 1000–5000 мкл с наконечниками;
- дозатор пипеточный полуавтоматический восьмиканальный, позволяющий отбирать объемы жидкости до 300 мкл, с наконечниками;
- цилиндр мерный (200 мл, 500 мл);
- стакан стеклянный (500 мл);
- вода дистиллированная;
- бумага фильтровальная лабораторная;
- перчатки резиновые или пластиковые.

6. Подготовка исследуемых образцов сывороток крови человека.

Для исключения ложных результатов нельзя подвергать исследуемые образцы термоинактивированию, необходимо отбирать и хранить их в условиях, предотвращающих бактериальный рост. Недопустимо использование образцов с добавлением азиды натрия в качестве консерванта! Каждый образец исследуемой сыворотки следует отбирать новым наконечником! Отобранные образцы хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 3-х суток. Более длительное хранение допустимо при температуре не выше минус 20 °С (образцы могут подвергаться замораживанию и оттаиванию не более 1 раза). Нельзя использовать образцы с бактериальным ростом, выраженным гемолизом и гиперлипидемией. Образцы сыворотки

крови, содержащие агрегаты или осадок, необходимо осветлять центрифугированием при 1000-2000 об/мин в течение 15 мин при температуре от 4 до 8 °С.

7. Подготовка реагентов для анализа

7.1. Нельзя использовать реагенты из наборов разных серий или смешивать их в процессе приготовления растворов, а также использовать реагенты по истечении срока годности!

Перед использованием все реагенты набора выдержать 30 мин при комнатной температуре (от 18 до 24 °С).

7.2. Иммуносорбент. **Внимание: во избежание конденсации влаги внутри лунок необходимо выдержать иммуносорбент при комнатной температуре (от 18 до 24 °С) в закрытом пакете не менее 30 минут!**

Вскрыть фольгированный пакет, отступив 1,0 см от края пакета. Вынуть из пакета рамку и необходимое количество стрипов, вставить стрипы в рамку.

7.3. ПР - рабочий промывочный раствор. Содержимое флакона с концентратом ПР тщательно перемешать. Для приготовления рабочего ПР необходимое количество концентрата промывочного раствора отобрать в отдельную ёмкость и добавить соответствующее количество воды дистиллированной (согласно таблице 1). Полученный раствор тщательно перемешать.

7.4. Конъюгат – готов к применению. Перед использованием отобрать необходимое количество в чистую ёмкость.

7.5. Калибровочные пробы - готовы к применению.

7.6. Контрольная сыворотка, готова к применению.

7.7. ТМБ-Субстратный раствор – готов к применению. Перед использованием отобрать необходимое количество в чистую ёмкость.

7.8. Стоп-реагент - готов к применению.

Расход реагентов набора в зависимости от количества используемых стрипов

	Рабочий промывочный раствор		Конъюгат (мл)	ТМБ- Субстратный раствор (мл)
	ПР (конц x25) (мл)	Вода дистиллированная (мл)		
3	5	120	3,0	3,0
4	5	120	4,0	4,0
5	10	240	5,0	5,0
6	10	240	6,0	6,0
7	15	360	7,0	7,0
8	15	360	8,0	8,0
9	20	480	9,0	9,0
10	20	480	10,0	10,0
11	25	600	11,0	11,0
12	25	600	12,0	12,0

8. Проведение анализа.

8.1. Калибровочные пробы и контрольную сыворотку рекомендуется вносить по следующей схеме: в лунки иммуносорбента А-1, А-2 дозатором пипеточным внести по 25 мкл «Калибратора 0», в лунки В-1, В-2 - по 25 мкл «Калибратора 1», в лунки С-1, С-2 - по 25 мкл «Калибратора 2», в лунки D-1, D-2 – по 25 мкл «Калибратора 3», в лунки Е-1, Е-2 - по 25 мкл «Калибратора 4», в лунки F-1, F-2 - по 25 мкл «Калибратора 5», в лунки G1, G2 - по 25 мкл контрольной сыворотки. Лунки Н1 и Н2 оставить для измерения оптической плотности ТМБ-Субстратного раствора.

В остальные лунки внести дозатором по 25 мкл исследуемых сывороток в двух повторах.

Внимание! Время внесения образцов не должно превышать 10 мин!

8.2. Из чистой емкости с отобранным необходимым количеством конъюгата (см. п.7.4.), внести пипеточным дозатором по 100 мкл конъюгата во все лунки планшета, кроме лунок Н1 и Н2. Перемешать содержимое лунок вращением планшета на поверхности стола в течение 10 сек.

Стрипы планшета закрыть крышкой и инкубировать в течение 60 мин при температуре $(37,0 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$ во влажной камере в термостате.

Для создания влажной камеры планшет закрыть крышкой, на которую положить смоченную водой фильтровальную бумагу, планшет поместить в полиэтиленовый пакет, после чего края пакета завернуть вниз.

8.3. По истечении указанного времени содержимое лунок удалить с помощью вошера (или многоканальной пипетки) в ёмкость для сбора инфицированного материала, иммуносорбент промыть 5 раз рабочим ПР, заливая его до краев лунок (не менее 300 мкл в лунку) и удаляя промывочный раствор с помощью вошера (или многоканальной пипетки) в ёмкость для сбора инфицированного материала. По окончании промывки тщательно удалить остатки жидкости из лунок постукиванием рамки со стрипами в перевернутом положении по фильтровальной бумаге. Не допускать остатка жидкости в лунках планшета.

8.4. Из чистой емкости с отобраным необходимым количеством ТМБ-Субстратного раствора (см. п.7.7.), внести пипеточным дозатором по 100 мкл раствора во все лунки отмытого планшета. Планшет выдержать в течение 20 мин в защищённом от света месте при температуре от 18 до 24 $^\circ\text{C}$.

8.5. Реакцию остановить добавлением во все лунки стрипов по 150 мкл стоп-реагента, осторожно постучать по краю планшета или встряхивать стрипы на шейкере в течение 10 секунд и провести учет результатов. Время между остановкой реакции и измерением ОП не должно превышать 20 мин.

9. Регистрация результатов

Регистрацию результатов проводить спектрофотометрически при длине волны: 450 нм с настройкой прибора по «воздуху».

Желательно использовать программу спектрофотометра, позволяющую вычитать величину ОП в лунках с калибровочной пробой «Калибратор 0» (A1 и A2) из значений ОП всех остальных лунок. Если фотометр не позволяет вычитать величину ОП лунок A1 и A2, то для расчетов

концентраций следует использовать величину разности ОП образца – ОП A_{1A2} , где ОП образца – среднее значение ОП в лунках, содержащих калибровочные или искомые пробы, а ОП A_{1A2} - среднее значение ОП лунок A1 и A2.

10. Учет результатов

Реакцию следует учитывать, если среднее значение оптической плотности (ОП) в лунках с контролем субстрата (Н1 и Н2) - не более 0,1.

На бланке для построения калибровочной кривой в линейных координатах по оси абсцисс X откладывают соответствующие значения концентрации общего ПСА, выраженной в нг/мл, по оси ординат Y откладывают средние значения ОП калибровочных проб. По полученным точкам строят калибровочную кривую.

Для исследуемых образцов определяют концентрацию общего ПСА по калибровочному графику. Для этого на оси ординат Y отмечают значение ОП исследуемого образца, проводят прямую до пересечения с калибровочной кривой, от полученной точки проводят перпендикуляр до оси абсцисс X. Точка пересечения покажет значение концентрации общего ПСА в исследуемом образце, выраженную в нг/мл.

Контрольная сыворотка служит для проверки точности и достоверности результатов. Полученные величины концентраций общего ПСА в образцах считать достоверными, если вычисленное по калибровочному графику значение концентрации общего ПСА в контрольном образце попадает в пределы, указанные на этикетке флакона.

Если значения содержания общего ПСА в исследуемом образце выше значения калибровочной пробы «Калибратор 5», образец следует развести калибровочной пробой «Калибратор 0» в 10 раз, повторить анализ, полученное значение содержания общего ПСА умножить на фактор разведения.

11. Условия хранения и эксплуатации набора

11.1. Набор реагентов должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре от 2 до 8 °С в защищённом от света месте в течение всего срока годности. Срок годности набора – 13 месяцев.

11.2. Транспортирование набора реагентов проводить при температуре от 2 до 8 °С. Допустимо транспортирование при температуре от 9 до 20 °С не более 10 суток.

11.3. В случае дробного использования компоненты набора необходимо хранить следующим образом:

- Иммуносорбент - пакет с неиспользованными стрипами и силикагелем тщательно герметизировать. После первого вскрытия пакета иммуносорбент стабилен в течение 1 месяца при хранении при температуре от 2 до 8 °С.

- ПР (концентрат х 25) - после вскрытия флакона оставшийся неиспользованным ПР (концентрат х 25) хранить во флаконе, плотно закрытом винтовой крышкой, на протяжении срока годности набора при температуре от 2 до 8 °С;

- Рабочий промывочный раствор, подготовленный к использованию, хранить не более 3-х суток при температуре от 2 до 8 °С.

- Конъюгат –после вскрытия флакона оставшийся неиспользованным конъюгат хранить во флаконе, плотно закрытом винтовой крышкой, на протяжении месяца при температуре от 2 до 8 °С.

- Калибровочные пробы - после вскрытия флакона оставшиеся неиспользованными калибровочные пробы хранить во флаконах, плотно закрытых винтовыми крышками на протяжении месяца при температуре от 2 до 8 °С.

- Контрольная сыворотка - после вскрытия флакона оставшуюся неиспользованной контрольную сыворотку хранить во флаконе, плотно закрытом винтовой крышкой, на протяжении месяца при температуре от 2 до 8 °С.

- ТМБ-Субстратный раствор –после вскрытия флакона оставшийся неиспользованным ТМБ-Субстратный раствор хранить во флаконе, плотно закрытом винтовой крышкой, на протяжении месяца при температуре от 2 до 8 °С.

- Стоп-реагент - после вскрытия флакона оставшийся неиспользованным Стоп-реагент хранить во флаконе, плотно закрытом винтовой крышкой, на протяжении срока годности набора при температуре от 2 до 8 °С.

11.4. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции.

Рекламации на специфические и физические свойства препарата направлять в адрес предприятия-изготовителя - ООО «Научно-производственное объединение «Диагностические системы» 603093, Россия, г. Нижний Новгород, ул. Яблоневая, 22, тел./факс: (831) 434-86-83 или тел.: (831) 434-97-12.

Директор ООО
«Научно-производственное объединение
«Диагностические системы»
по производству

 Г. А. Полянская

«СОГЛАСОВАНО»
Зав. кафедрой клинической
лабораторной диагностики ГОУ ДПО
«РМАПО Росздрава»

 Профессор Долгов В.В.
2008 г.

Подпись В.В. Долгове
удостоверяю: специалист по
кадровой работе ГОУ ДПО
РМАПО Росздрава
подпись: 25.01.08