

ВЕКТОР



Набор реагентов
для иммуноферментного определения
концентрации свободной фракции
простат-специфического антигена
в сыворотке крови

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

ПСА свободный – ИФА – БЕСТ

НАБОР РЕАГЕНТОВ
T-8460

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «ПСА свободный – ИФА – БЕСТ» предназначен для количественного определения концентрации свободной фракции простат-специфического антигена (ПСА_{св.}) в сыворотке крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА).

1.2. ПСА представляет собой гликопротеин с молекулярной массой около 32 000 Да, обладающий энзиматической активностью. Продукция ПСА и его секреция в семенную жидкость осуществляется предстательной железой. ПСА существует в виде свободной фракции, а также образует стабильные комплексы с различными ингибиторами протеаз, при этом основная часть ПСА в сыворотке крови представлена в виде комплекса с α_1 - антихимотрипсином.

Диагностически значимым является определение соотношения концентрации свободного ПСА к концентрации общего ПСА, которое может использоваться для дифференциальной диагностики рака простаты и доброкачественной гиперплазии предстательной железы у пациентов с повышенным содержанием общего ПСА (от 3 до 30 нг/мл). Доля свободной фракции ПСА выше в случае доброкачественной гиперплазии в сравнении с долей свободной фракции ПСА при раке предстательной железы.

1.3. В комплексе с другими диагностическими методами количественное определение

содержания ПСА_{св.} в сыворотке крови может быть использовано для диагностики заболеваний простаты, для мониторинга терапии и прогноза развития опухоли простаты.

1.4. Набор рассчитан на проведение анализа 41 неизвестного образца, 6 калибровочных проб и одного контрольного образца в дублях при одновременном использовании всех стрипов планшета.

2. ПРИНЦИП МЕТОДА

2.1. ПРИНЦИП МЕТОДА

Метод определения основан на твердофазном иммуноферментном анализе с применением моноклональных антител. В лунках планшета при добавлении исследуемого образца во время первой инкубации происходит связывание молекулы ПСА_{св.} с моноклональными антителами, иммобилизованными на внутренней поверхности лунок. Во время второй инкубации конъюгат моноклональных антител к ПСА_{св.} с пероксидазой связывается с ПСА_{св.}, иммобилизованным в ходе первой инкубации. Во время инкубации с раствором тетраметилбензидина происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски пропорциональна концентрации ПСА_{св.} в анализируемых пробах. После измерения величины оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочной графика рассчитывается концентрация ПСА_{св.} в анализируемых образцах.

2.2. СОСТАВ НАБОРА

- планшет разборный (12 восьмилучных стрипов) с иммобилизованными на внутренней поверхности моноклональными антителами к ПСА_{св.}, готовый для использования – 1 шт.;
- стандартные калибровочные пробы, аттестованные относительно стандартов ПСА фирмы CanAg diagnostics АВ (Швеция), содержащие известные количества ПСА_{св.} – 0; 0,25; 0,50; 1,00; 2,50; 5,00 нг/мл, концентрации ПСА_{св.} в калибровочных пробах могут несколько отличаться от указанных величин, точные величины указаны на этикетках флаконов, готовы для использования – 6 фл. по 0,7 мл;
- контрольный образец с известным содержанием ПСА_{св.}, готовый для использования – 1 фл., 0,7 мл;
- конъюгат моноклональных антител к ПСА_{св.} с пероксидазой хрена, готовый для использования – 1 фл., 13 мл;
- раствор для разведения сывороток (PPC) – 1 фл., 12 мл;
- концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25) – 1 фл. 28 мл;
- раствор тетраметилбензидина (раствор ТМБ плюс), готовый для использования – 1 фл., 13 мл;
- стоп-реагент, готовый для использования – 1 фл., 12 мл;
- пленка для заклеивания планшета – 3 шт.;
- трафарет для построения калибровочного графика – 1 шт.;
- инструкция по применению – 1 шт.;
- пластиковая ванночка для реагентов – 2 шт.;
- наконечники для пипетки – 16 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность. Используемые в наборе моноклональные антитела взаимодействуют со свободной фракцией ПСА и не взаимодействуют с ПСА в составе стабильных комплексов.

3.2. Воспроизводимость. Коэффициент вариации результатов определения содержания ПСА_{св.} в одном и том же образце сыворотки крови с использованием набора «ПСА свободный-ИФА-БЕСТ» не превышает 8%.

3.3. Линейность. Отклонение от расчетной величины концентрации ПСА_{св.} при разведении анализируемых проб раствором для разведения сывороток не превышает 10% в диапазоне концентраций 0,25–5,00 нг/мл.

3.4. Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» – соответствие измеренной концентрации ПСА_{св.} предписанной в пробе, полученной путем смешивания равных объемов контрольного образца и калибровочной пробы 0,5 нг/мл ПСА_{св.}. Процент «открытия» составляет 90–110%.

3.5. Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая набором концентрация ПСА_{св.}, не превышает 0,1 нг/мл.

3.6. Рекомендуются в каждой лаборатории при использовании набора уточнить пороговые значения соотношений свободного и общего ПСА у обследуемого контингента людей.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2а.

4.2. Все компоненты набора являются нетоксичными.

Стоп-реагент обладает раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. *В случае попадания стоп-реагента на кожу и слизистые необходимо промыть пораженный участок большим количеством проточной воды.*

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. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусных инфекций.

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

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

4.7. Для дезинфекции исследуемых образцов, посуды и материалов, контактирующих с исследуемыми и контрольными образцами, следует использовать дезинфицирующие средства, не оказывающие негативного воздействия на качество ИФА, например, комбинированные средства на основе ЧАС (четвертичных аммониевых соединений), спиртов, третичных аминов.

Использование дезинфицирующих средств, содержащих активный кислород и хлор (H_2O_2 , деохлор, хлорамин), приводит к серьезному искажению результатов ИФА.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ:

- спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках стрипов в двухволновом режиме: при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620–655 нм; или при длине волны 450 нм;
- шейкер термостатируемый орбитального типа, позволяющий производить встряхивание при температуре $(37 \pm 1)^\circ C$ и 650 об/мин;
- пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости от 5 до 5000 мкл;

- пипетка полуавтоматическая многоканальная со сменными наконечниками, позволяющая отбирать объемы жидкости от 50 до 300 мкл;
- флаконы стеклянные вместимостью 10–15 мл;
- цилиндр мерный вместимостью 500 мл;
- колба вместимостью 1000 мл;
- вода дистиллированная;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- бумага фильтровальная лабораторная.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Для проведения анализа не следует использовать гемолизованную, мутную сыворотку крови, а также сыворотку крови, содержащую азид натрия.

6.2. Образцы сыворотки крови можно хранить при температуре 2–8°C не более 5 суток или при температуре минус 20°C не более 3 мес.

Повторное размораживание и замораживание образцов сыворотки крови не допускается.

6.3. Образцы сывороток крови, содержащие осадок, необходимо очистить центрифугированием при 1000–1500 об/мин в течение 10 мин при температуре 18–25°C.

7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

7.1. Перед работой извлечь набор из холодильника, вскрыть упаковку и выдержать все компоненты набора, в том числе запечатанный пакет с планшетом, и исследуемые образцы сыворотки крови при температуре 18–25°C не менее 30 мин.

7.2. Калибровочные пробы, контрольный образец, конъюгат, раствор тетраметилбензидаина и стоп-реагент готовы к использованию и не требуют дополнительного разведения.

7.3. ПРАВИЛА РАБОТЫ ПРИ ДРОБНОМ ИСПОЛЬЗОВАНИИ НАБОРА

7.3.1. Растворы из флаконов отбирать только одноразовыми индивидуальными наконечниками для пипеток.

7.3.2. После первого вскрытия флаконы сразу плотно закрыть завинчивающимися крышками, поместить в холодильник и хранить при 2–8°C в течение 3 месяцев, но в пределах срока годности набора.

7.4. ПОДГОТОВКА ПЛАНШЕТА

Вскрыть пакет выше замка и установить на рамку необходимые для проведения анализа количество стрипов. Оставшиеся неиспользованные стрипы немедленно поместить вновь в пакет с влагопоглотителем, удалить из него воздух, плотно закрыть замок и поместить в холодильник.

Хранить при температуре от 2 до 8°C в течение 3 месяцев.

Таблица расхода компонентов набора реагентов

Кол-во используемых стрипов	Конъюгат, мл	Раствор ТМБ плюс, мл	Промывочный раствор	
			ФСБ-Т, концентрат, мл	Вода дистил., мл
2	2,0	2,0	4,0	до 100
3	3,0	3,0	6,0	до 150
4	4,0	4,0	8,0	до 200
5	5,0	5,0	10,0	до 250
6	6,0	6,0	12,0	до 300
7	7,0	7,0	14,0	до 350
8	8,0	8,0	16,0	до 400
9	9,0	9,0	18,0	до 450
10	10,0	10,0	20,0	до 500
11	11,0	11,0	22,0	до 550
12	12,0	12,0	24,0	до 600

7.5. ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПРОМЫВОЧНОГО РАСТВОРА

Промывочный раствор готовить разведением исходного концентрата ФСБ-Т в 25 раз. Для этого в соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов) внести в мерный цилиндр необходимое количество концентрата ФСБ-Т и довести до соответствующего объема дистиллированной водой.

При выпадении осадка солей в концентрате необходимо прогреть его при температуре 30–40°C до полного растворения осадка.

Хранение: до 5 суток при 2–8°C.

7.6. ПОДГОТОВКА КОНЬЮГАТА

Перед использованием конъюгат перемешать встряхиванием!

В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов) отобрать в чистый флакон или в пластиковую ванночку для реагента необходимое количество конъюгата.

Остатки конъюгата из флакона или ванночки утилизировать (*не сливать во флакон с исходным конъюгатом*).

7.7. ПОДГОТОВКА РАСТВОРА ТМБ

В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов), отобрать в чистый флакон или в пластиковую ванночку для реагента необходимое количество раствора ТМБ плюс.

Остатки раствора тетраметилбензида из флакона или ванночки утилизировать (*не сливать во флакон с исходным раствором ТМБ*).

Внимание! Для работы с раствором ТМБ необходимо использовать только одноразовые наконечники. Посуду, предназначенную для раствора ТМБ, нельзя отмывать с применением синтетических моющих средств, поскольку

даже их следы ведут к неконтролируемому разложению ТМБ в ходе реакции. После работы посуду ополоснуть водой, промыть 70% этиловым спиртом и тщательно отмыть дистиллированной водой.

8. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

8.1. Внести во все лунки по 50 мкл раствора для разведения сывороток.

8.2. Внести в соответствующие лунки в дублях по 50 мкл каждой стандартной калибровочной пробы и по 50 мкл контрольного образца. В остальные лунки внести в дублях по 50 мкл анализируемых образцов сыворотки крови. Внесение образцов необходимо производить быстро, в течение времени не более 15–20 мин.

8.3. Планшет заклеить пленкой и инкубировать в течение 60 мин при встряхивании на шейкере при температуре 37°C, с интенсивностью перемешивания 650 об/мин.

8.4. По окончании инкубации снять липкую пленку и поместить в сосуд с дезинфицирующим раствором. С помощью промывочного устройства или многоканальной пипетки промыть лунки планшета 5 раз промывочным раствором (п. 7.5.), чередуя аспирацию и немедленное заполнение лунок каждого стрипа. В каждую лунку вносить не менее 350 мкл жидкости в процессе каждого цикла промывки. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек.

Необходимо добиваться полного опорожнения лунок после каждого их заполнения. По окончании промывки остатки влаги из лунок тщательно удалить, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.

8.5. Во все лунки внести по 100 мкл конъюгата (п. 7.6.), заклеить планшет пленкой и инкубировать в течение 60 мин при встряхивании на шейкере при температуре 37°C, с интенсивностью перемешивания 650 об/мин.

Для внесения конъюгата использовать пластиковую ванночку и одноразовые наконечники, входящие в состав набора. Остатки конъюгата утилизировать (не сливать во флакон с исходным конъюгатом!).

8.6. По окончании инкубации удалить содержимое лунок и промыть планшет 5 раз промывочным раствором так, как это указано в п. 8.4.

8.7. Внести во все лунки по 100 мкл раствора ТМБ плюс (п. 7. 7.), заклеить планшет пленкой и инкубировать в темноте в течение 15 мин на шейкере при температуре 37°C с интенсивностью перемешивания 650 об/мин.

Для внесения раствора ТМБ использовать пластиковую ванночку и одноразовые наконечники, входящие в состав набора. Остатки раствора ТМБ утилизировать (не сливать во флакон с исходным раствором ТМБ!).

8.8. Внести во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор те-

траметилбензидина, по 100 мкл стоп-реагента. Встряхнуть планшет на шейкере в течение 10–15 сек; при этом содержимое лунок окрашивается в желтый цвет.

9. РЕГИСТРАЦИЯ И ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты анализа регистрировать с помощью спектрофотометра, измеряя оптическую плотность в двухволновом режиме: основной фильтр – 450 нм, референс-фильтр – в диапазоне 620–655 нм. Допускается регистрация результатов только с фильтром 450 нм.

Измерение проводить через 2–3 мин после остановки реакции. Время между остановкой реакции и измерением оптической плотности не должно превышать 10 мин.

10. КРАТКАЯ СХЕМА ИФА

Использовать только после тщательного ознакомления с инструкцией!

- Внести:** по 50 мкл РРС;
по 50 мкл контрольного образца и стандартных калибровочных проб в дублях;
по 50 мкл исследуемых сывороток в дублях.
- Инкубировать:** 60 мин, 37°C, 650 об/мин.
- Промыть:** промывочным раствором, 350 мкл, 5 раз.
- Внести:** по 100 мкл конъюгата.
- Инкубировать:** 60 мин, 37°C, 650 об/мин.
- Промыть:** промывочным раствором, 350 мкл, 5 раз.
- Внести:** по 100 мкл раствора тетраметилбензидина.
- Инкубировать:** 15 мин, 37°C, 650 об/мин.
- Внести:** по 100 мкл стоп-реактента.
- Измерить:** ОП при 450 нм / референсная длина волны 620–655 нм.

11. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

11.1. По результатам измерения вычислить среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках с анализируемыми образцами.

11.2. Построить калибровочный график зависимости оптической плотности (ось ординат) от концентрации ПСА_{св.} (ось абсцисс) в калибровочных пробах. Для этого на прилагаемом трафарете для построения графика против концентрации каждой калибровочной пробы отложить соответствующее ей среднее значение оптической плотности. Последовательно соединить полученные точки отрезками прямых линий.

Пример калибровочного графика представлен на рисунке.

11.3. Определить содержание концентраций в контрольном образце и анализируемых образцах по калибровочному графику. Для этого на оси ординат отметить среднее значение ОП анализируемого образца. Провести прямую линию, параллельно оси абсцисс, до пересечения с калибровочным графиком. От точки пересечения опустить перпендикуляр на ось абсцисс. По полученной точке пересечения определить значение концентрации ПСА_{св.} в образце (см. пример 1).

11.4. Если концентрация ПСА_{св.} в анализируемых образцах сыворотки крови превышает 5,0 нг/мл, образец следует развести раствором для разведения сывороток в 20 раз (20 мкл исследуемого образца + 380 мкл раствора для разведе-

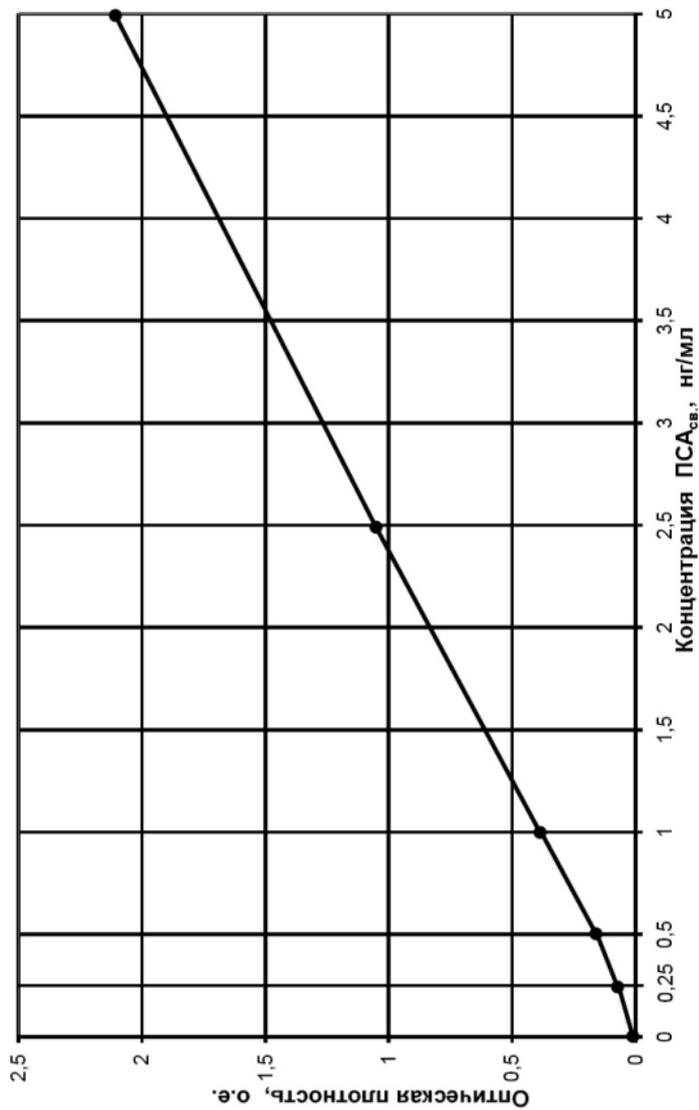


Рис. Пример зависимости оптической плотности от концентрации ПСА_{св.} в калибровочных пробах.

Пример 1

Калибровочная проба, содержащая ПСА _{св.}	Значение ОП о.е.	Конц-ция ПСА _{св.} (определенная по графику)
0 нг/мл	0,034	–
0,25 нг/мл	0,102	–
0,5 нг/мл	0,185	–
1,0 нг/мл	0,362	–
2,5 нг/мл	1,059	–
5нг/мл	2,098	–
Контрольный образец	0,310	0,82 нг/мл
Анализируемый образец	0,4	1,09 нг/мл

ния сывороток), повторить анализ и полученный результат умножить на 20.

11.5. РАСЧЕТ ЗНАЧЕНИЯ ДОЛИ СВОБОДНОЙ ФРАКЦИИ ПСА

Рассчитать значение доли свободной фракции ПСА по формуле:

$$\frac{\text{концентрация ПСА}_{\text{св.}}}{\text{концентрация ПСА}_{\text{общ.}}} \times 100 \%$$

Если доля ПСА_{св.} выше 15% – высока вероятность доброкачественной гиперплазии простаты.

Значение доли ПСА_{св.} менее 10% с достаточно высокой вероятностью свидетельствует о наличии злокачественных новообразований.

При значении этого соотношения в диапазоне от 10 до 15% необходимо дальнейшее дообследование пациента, повторное исследование содержания ПСА через 6 месяцев.

Концентрации ПСА_{общ.} должна быть измерена в той же анализируемой пробе сыворотки крови с применением исключительно «Набора реагентов для количественного определения концентрации общего простат-специфического антигена в сыворотке крови человека» («ПСА общий – ИФА – БЕСТ», кат № Т-8458) производства ЗАО «Вектор-Бест».

11.6. Контрольный образец служит для проверки правильности результатов. Полученные значения концентраций исследуемых образцов достоверны, если вычисленное по калибровочному графику значение концентрации ПСА_{св.} в контрольном образце попадает в пределы, указанные на этикетке флакона.

При использовании для расчетов концентраций компьютерного или встроенного в спектрофотометр программного обеспечения в настройках выбрать метод, соответствующий кусочно-линейной аппроксимации.

11.7. При динамическом наблюдении пациента для получения результатов адекватно отражающих изменение концентрации ПСА_{св.} в крови необходимо использовать наборы реагентов одного наименования (одного предприятия-изготовителя).

12. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

12.1. Набор реагентов «ПСА свободный – ИФА – БЕСТ» следует хранить и транспортировать в упаковке предприятия-изготовителя при температуре 2–8°C в течение всего срока годности (12 мес). Допускается транспортирование набора при температуре до 25°C не более 10 суток.

Замораживание набора не допускается!

12.2. Дробное использование набора может быть реализовано не позднее 3 мес. с момента проведения первого иммуноферментного анализа, но в пределах срока годности. В случае дробного использования набора построение калибровочного графика необходимо проводить для каждого независимого эксперимента, а также рекомендуется определение концентрации ПСА_{св.} в контрольном образце.

12.3. При постановке ИФА нельзя использовать компоненты из наборов разных серий или смешивать их при приготовлении растворов, кроме неспецифических компонентов (ФСБ-Т, стоп-реагент), которые взаимозаменяемы во всех наборах ЗАО «Вектор-Бест».

Запрещается использовать реагенты из наборов других фирм-производителей!

12.4. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

По вопросам, касающимся качества набора,
следует обращаться в ЗАО «Вектор-Бест» по адресу:

630559, Новосибирская обл.,
Новосибирский район, п. Кольцово, а/я 121,
тел. /факс (383) 336-73-46,
E-mail: vbobtk@vector-best.ru

За справками и консультацией обращаться:
в лабораторию ИФА гормонов и опухолевых маркеров,
тел. (383) 336-55-55

29.10.10.

**ЗАКРЫТОЕ АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО
«ВЕКТОР-БЕСТ»**

Федеральная лицензия № 99-04-000086
на производство, хранение и реализацию
лекарственных средств

**КРУПНЕЙШИЙ В РОССИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЬ
ИММУНОФЕРМЕНТНЫХ
ДИАГНОСТИКУМОВ**

Вирусные гепатиты А, В, С, D
Инфекции, передаваемые
половым путем
ВИЧ-инфекция
TORCH-инфекции
Клещевой энцефалит
Паразитарные болезни
Диагностика беременности
Лабораторное оборудование

***Стабильное качество
и точный результат
для Вашей лаборатории!***

Наш адрес: 630117, Новосибирск-117, а/я 492

Тел./факс: (383) 227-73-60 (многоканальный)

Тел.: (383) 332-37-10, 332-37-58, 332-36-34,
332-67-49, 332-67-52

E-mail: vbmarket@vector-best.ru

Internet: www.vector-best.ru