УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора
от_____2011 г.
№_____

«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный директор ООО «ХЕМА»
_____ Ю. С. Лебедин
11 января 2011 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению Набора реагентов для иммуноферментного определения общего ПСА в сыворотке (плазме) крови«обПСА-ИФА»

1. НАЗНАЧЕНИЕ.

1.1. Набор реагентов «обПСА-ИФА» предназначен для количественного определения концентрации общего ПСА в сыворотке (плазме) крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Простато-специфический антиген (ПСА) — гликопротеин с молекулярной массой 34 кДа, состоящий из одной полипептидной цепи, был обнаружен в эпителиальных клетках нормальной простаты. Его концентрация в крови повышается при доброкачественной гиперплазии и злокачественном перерождении ткани простаты, а также при метастатическом раке простаты. ПСА является сериновой протеазой из семейства калликреинов, его точное название по энзимологической классификации — прекалликреин 3. Высокие концентрации ПСА наблюдаются в молочной железе при лактации и в грудном молоке, поэтому данный белок нельзя считать строго специфичным для простаты. В сыворотке крови ПСА находится преимущественно в комплексе с антипротеазами анти-химотрипсином, альфа-2макроглобулином и антитрипсином. Часть ПСА (свободный ПСА) находится вне этих комплексов. Пара антител, используемых в данной тест-системе (PS2-PS6), равномерно (эквимолярно) распознает обе формы ПСА — свободную и связанную что подтверждено результатами независимых исследований в Университете Турку, Финляндия. У больных аденокарциномой простаты определяется повышение концентрации ПСА даже на ранних стадиях болезни. У больных с выраженным заболеванием отмечена концентрация ПСА 1000 нг/мл и выше. Клиническая значимость данного определения заключается в возможности контроля и прогноза прогрессирования заболевания. Нарастающее или устойчивое повышение концентрации ПСА, свидетельствует об опухолевой прогрессии или неэффективности терапии. Интерпретацию данных необходимо проводить с учетом других клинических данных. Важную дополнительную информацию для дифференциальной диагностики доброкачественных и злокачественных заболеваний простаты позволяет получить определение соотношения свПСА/обПСА. При этом необходимо учитывать возраст пациента и анамнез: так, у мужчин до 60 лет соотношение рекомендуется определять при уровне обПСА выше 4 нг/мл; при этом следует иметь ввиду, что существенное — выше 15 нг/мл — повышение уровня обПСА может наблюдаться не только при злокачественном повреждении ткани простаты, но и при простатите и массаже предстательной железы (по данным ООО «ХЕМА» - до 20 нг/мл и до 80 нг/мл соответственно), а также при эякуляции накануне исследования. У мужчин старше 60 лет, когда доброкачественная гиперплазия наблюдается практически у всех, уровень ПСА до 7 нг/мл целесообразно рассматривать как нормальный, и соотношение свПСА/ПСА определять, начиная с 7 нг/мл.

1.3. Диагностическая значимость определения.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Определение обПСА в сыворотке (плазме) крови используется обычно для клинической лабораторной диагностики заболеваний простаты различной этиологии

1.4. Область применения - клиническая лабораторная диагностика.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА.

2.1. Принцип работы Набора. Определение общего ПСА основано на использовании «сэндвич» - варианта твердофазного иммуноферментного анализа. На внутренней поверхности лунок иммобилизованы мышиные моноклональные антитела к общему ПСА человека. В лунках планшета, при добавлении исследуемого образца, во время инкубации одновременно происходит связывание обПСА, содержащегося в исследуемом образце, с антителами на твердой фазе. Образовавшийся комплекс выявляется с помощью конъюгата мышиных моноклональных антител к обПСА человека с пероксидазой хрена.

В результате образуется связанный с пластиком «сэндвич», содержащий пероксидазу. Во время инкубации с раствором субстрата тетраметилбензидина (ТМБ) происходит окрашивание содержимого лунок. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации обПСА в исследуемом образце. Концентрацию обПСА в исследуемых образцах определяют по калибровочному графику зависимости оптической плотности (ОП450) от содержания обПСА в калибровочных пробах.

2.2. Состав Набора:

- планшет 96-луночный полистироловый, стрипированный с иммобилизированными на внутренней поверхности лунок мышиными моноклональными антителами; готов к использованию - 1 шт;
- калибровочные пробы на основе трис-буфера(рн 7,2-7,4), содержащие известные количества общего ПСА — 0; 1,5; 5; 10 и 30 нг/мл; концентрации обПСА в калибровочных пробах могут несколько отличаться от указанных величин, точные величины указаны на этикетках пробирок (флаконов); готовы к использованию - 5 пробирок или флаконов (калибровочная проба 0 нг/мл — 6 мл, остальные по 0,8 мл каждая);
- конъюгат; готов к использованию - флакон (14 мл);
- раствор субстрата тетраметилбензидина (ТМБ); готов к использованию - 1 флакон (14 мл);
- контрольная сыворотка на основе сыворотки крови человека с известным содержанием обПСА; готова к использованию - 1 пробирка или флакон (0,8 мл);
- концентрат отмывочного раствора (солевой раствор с твин-20 и бензойной кислотой)26х-кратный - 1 флакон (22 мл);
- стоп-реагент; готов к использованию - 1 флакон (14 мл);
- липкая лента с бумажной подложкой для заклеивания планшета; готова к использованию - 2шт. –
- Инструкция по применению Набора реагентов «обПСА-ИФА»;
- Паспорт контроля качества Набора реагентов «обПСА-ИФА».

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.

КОПИЯ ВЕРНА

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

3.1. Специфичность. Оба мышиных моноклональных антитела, использованные в данном Наборе, демонстрируют эквимолярное взаимодействие, как со свободным ПСА так и с ПСА-АХТ комплексом.

3.2. Чувствительность Минимальная достоверно определяемая Набором реагентов «обПСА-ИФА» концентрация обПСА в сыворотке (плазме) крови не превышает 0,005 нг/мл.

3.3. Воспроизводимость. Коэффициент вариации результатов определения содержания обПСА в исследуемых образцах сыворотки (плазмы) крови с использованием Набора реагентов «обПСА-ИФА» не превышает 8,0%.

3.4. Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» соответствие измеренной концентрации обПСА предписанной, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы 5 нг/мл

Процент «открытия» составляет 90-11094.

3.5. Линейность. Зависимость концентрации обПСА в образцах сыворотки (плазмы) крови при разведении их сывороткой (плазмой) крови, не содержащей обПСА, имеет линейный характер в диапазоне концентраций 1,5-30 нг/мл и составляет +- 10,%.

3.6. Клиническая проверка. Нормальные значения.

Исследуемая группа	Единицы	
	нг/мл	
	Нижний предел	Верхний предел
Мужчины		
<40 лет		4,0
41-60 лет		5,5
<61 года		7,0
Женщины		0,45

В соответствии с требованиями GLP (Good Laboratory Practice, Хорошая ЛабораторнаяПрактика) рекомендуется в каждой клинико-диагностической лаборатории при использовании Набора реагентов «обПСА-ИФА» уточнить значения концентрации обПСА, соответствующие нормальным у обследуемого контингента.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.

4.1. Потенциальный риск применения Набора - класс 26 (ГОСТ Р 51609-2000).

4.2. Меры предосторожности-соблюдение «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.).

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

- фотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках при длине волны 450 нм;
- термостат, поддерживающий температуру +37±0,1 °с;

КОПИЯ ВЕРНА

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- дозаторы со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости в диапазоне 5,0-250 мкл;
- цилиндр мерный вместимостью 1000 мл;
- вода дистиллированная;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- бумага фильтровальная.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА.

6.1. Перед проведением анализа компоненты Набора и исследуемые образцы сыворотки (плазмы) крови следует выдержать при комнатной температуре (+18-25 °с) не менее 30 мин.

6.2. Образцы сыворотки (плазмы) крови, используемые для анализа, допускается хранить при температуре +2-8 °с не более 24 ч или при температуре минус 20 °с не более 2 недель.

6.3. Для проведения анализа не следует использовать гемолизированные, мутные образцы сыворотки (плазмы) крови, а также исследуемые образцы, содержащие азид натрия в качестве консерванта.

6.4. Исключается использование для анализа образцов сыворотки (плазмы) крови людей, получавших для диагностики или терапии препараты, в состав которых входят мышиные антитела.

6.5. При использовании Набора реагентов «обПСА-ИФА» для проведения нескольких независимых серий анализов следует иметь в виду, что для каждого независимого определения необходимо построение нового калибровочного графика; кроме этого, рекомендуется определение концентрации общего ПСА в контрольной сыворотке.

6.6. Приготовление планшета.

Вскрыть пакет с планшетом и установить на рамку необходимое количество стрипов.

Вскрытые стрипы следует использовать в течение Т ч, длительному хранению не подлежат. Оставшиеся неиспользованными стрипы, чтобы предотвратить воздействие на них влаги, необходимо тщательно заклеить липкой лентой для заклеивания планшета и хранить в упаковке при температуре +2-8 °с в течение всего срока годности Набора.

6.7. Приготовление отмывочного раствора,

Содержимое флакона с концентратом отмывочного раствора перенести в мерный цилиндр вместимостью 500 мл, добавить 440 мл дистиллированной воды и тщательно перемешать.

В случае дробного использования Набора следует отобрать необходимое количество концентрата отмывочного раствора и развести дистиллированной водой в 21 раз (1 объем концентрата + 20 объемов дистиллированной воды).

Приготовленный отмывочный раствор допускается хранить при комнатной температуре (+18-25 °с) не более 2 сут. или при температуре +2-8 °с не более 10 сут.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА.

7.1. Если предполагаемая концентрация общего ПСА в исследуемом образце превышает 30 нг/мл, его следует развести используя калибровочную пробу 0 нг/мл.

7.2. Внести во все лунки планшета по 100 мкл конъюгата.

7.3. Внести в соответствующие лунки в дубликатах по 50 мкл каждой калибровочной пробы и контрольной сыворотки. В остальные лунки внести в дубликатах по 50 мкл исследуемых образцов сыворотки (плазмы) крови.

Внесение образцов в лунки планшета необходимо произвести в течение 5-10 мин.

7,4. Заклеить планшет липкой лентой для заклеивания планшета и инкубировать его в течение 60 мин при температуре +37 °с .

7.5. По окончании инкубации удалить содержимое лунок аспирацией (например, с помощью водоструйного насоса) или декантированием и промыть лунки планшета 5 раз путем добавления во все лунки по 250 мкл отмывочного раствора. Перемешать содержимое планшета круговыми движениями по горизонтальной поверхности с последующей аспирацией или декантированием. При каждом декантировании необходимо тщательно удалять остатки жидкости из лунок постукиванием планшета в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

7.6. Внести во все лунки планшета по 100 мкл раствора субстрата тетраметилбензидина (ТМБ). Внесение раствора субстрата тетраметилбензидина (ТМБ) в лунки планшета необходимо произвести в течение 2-3мин.

Инкубировать планшет в темноте при комнатной температуре (+18-25 °с) в течение 1020 мин в зависимости от степени развития синего окрашивания.

7.7. Внести во все лунки планшета с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор субстрата тетраметилбензидина (ТМБ), по 100 мкл стоп-реагента; при этом содержимое лунок окрашивается в ярко-желтый цвет.

Внесение стоп-реагента в лунки планшета необходимо произвести в течение 1-2 мин.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.

8.1. Измерить величину оптической плотности (ОП) в лунках планшета на фотометре вертикального сканирования при длине волны 450 нм. Измерение ОП растворов в лунках планшета необходимо произвести в течение 15 мин после внесения стоп-реагента.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ.

9.1. Построить в линейных координатах калибровочный график: ось абсцисс -концентрация общего ПСА в калибровочных пробах (нг/мл), ось ординат - оптическая плотность калибровочных проб (011450). Для алгоритма обсчета (аппроксимации) калибровочного графика используйте интервальный (кусочно-линейный, «от точки к точке») метод.

9.2. Определить по калибровочному графику содержание обПСА в исследуемых образцах.

9.3. Если исследуемый образец сыворотки (плазмы) дополнительно разводили (см. п.7.1 .), умножить полученный результат на фактор разведения.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

10.1. Набор реагентов «обПСА-ИФА» должен храниться в упаковке предприятияизготовителя при температуре +2-8 °с в течение всего срока годности (18 мес.).

Допускается хранение (Транспортировка) Набора при температуре до +25 °с не более 15 сут.

Допускается однократное замораживание (-20^0 С) калибровочных проб и контрольной сыворотки в аликвотах.

10.2. Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 42 исследуемых образцов, 5 калибровочных проб и 1 пробы контрольной сыворотки всего 96 определений при использовании всего комплекта стрипов.

10.3. В случае дробного использования Набора компоненты следует хранить следующим образом:

– оставшиеся неиспользованными стрипы необходимо тщательно заклеить липкой лентой для заклеивания планшета и хранить в упаковке при температуре +2-8 °с в течение всего срока годности Набора;

– конъюгат, субстрат и стоп-реагент после вскрытия флакона допускается хранить при температуре +2-8 °с в течение всего срока годности Набора;

– калибровочные пробы и контрольную сыворотку после вскрытия пробирок (флаконов) следует хранить при температуре +2-8 °с не более 2 мес.; при необходимости более длительного хранения - при температуре минус 20 °с в течение всего срока годности Набора;

- приготовленный отмывочный раствор следует хранить при комнатной температуре (+18-25 °с) не более 15 сут. или при температуре +2-8 °с не более 45 сут.;

- оставшийся неиспользованным концентрат отмывочного раствора следует хранить при температуре +2-8 °с в течение всего срока годности Набора;

10.4. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение Инструкции по применению Набора.

По вопросам, касающимся качества Набора реагентов «обПСА-ИФА», следует обращаться в ООО «ХЕМА» по адресу: 105264, Москва, ул. 9-ая Парковая, д. 48, к. 4, тел/факс (495) 7370040.

Руководитель исследовательского
отдела ООО «ХЕМА» _____ к. б. н. Д. С. Кострикин
11 января 2011 г.

М.П.

«СОГЛАСОВАНО»
Заведующий кафедрой клинической
лабораторной диагностики
ГОУ ДПО РМАПО Росздрава _____ д.м.н., профессор В. В. Долгов

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

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru