

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 свободного ПСА в сыворотке (плазме) крови

«свПСА-ИФА»

1. НАЗНАЧЕНИЕ.

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

1.2. Простато-специфический антиген (ПСА) — гликопротеин с молекулярной массой 34000 Да, 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, свПСА) находится вне этих комплексов, сумму свПСА и связанной формы ПСА можно назвать «общий ПСА» (обПСА). В данной тест-системе для «захвата» используются моноклональные антитела PS2, равномерно (эквивалентно) распознающие обе формы ПСА — свободную и связанную. Для «проявления» свПСА используются специфичные для этой формы моноклональные антитела PSI. свойства обоих антител подтверждены результатами независимых исследований в Университете Турку, Финляндия. Исследования последних лет показали, что величина соотношения свПСА/обПСА дает дополнительную диагностическую информацию по сравнению с определением уровня обПСА. Это соотношение выше в случаях доброкачественной гиперплазии и ниже при злокачественных заболеваниях простаты. У мужчин с уровнем обПСА в диапазоне 4-10 нг/мл определение соотношения позволяет получить важную дополнительную информацию для дифференциальной диагностики доброкачественных и злокачественных заболеваний простаты.

1.3. Диагностическая значимость определения.

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

■ 1.4. Область применения - клиническая лабораторная диагностика.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА.

Копия
верна

2.1. Принцип работы Набора. Определение свободного ПСА основано на использовании «сэндвич» варианта твердофазного иммуноферментного анализа. На внутренней поверхности лунок иммобилизованы мышинные моноклональные антитела к общему ПСА человека. В лунках планшета, при добавлении исследуемого образца, во время инкубации одновременно происходит связывание свПСА, содержащегося в исследуемом образце, с антителами на твердой фазе. Образовавшийся комплекс выявляется с помощью конъюгата мышинных моноклональных антител к свПСА 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 свПСА в исследуемом образце. Концентрацию свПСА в исследуемых образцах определяют по калибровочному графику зависимости оптической плотности (ОП450) от содержания свПСА в калибровочных пробах.

2.2. Состав Набора:

планшет 96-луночный полистироловый, стрипированный с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок мышинными моноклональными антителами; готов к использованию - 1 шт..

калибровочные пробы на основе трис-буфера (рН 7.2-7.4), содержащие известные количества свободного ПСА — 0; 0,25; 0,75; 2,5 и 5 нг/мл; концентрации свПСА в калибровочных пробах могут несколько отличаться от указанных величин, точные величины указаны на этикетках пробирок (флаконов); готовы к использованию - 5 пробирок или флаконов (по 0,8 мл каждая);

конъюгат; готов к использованию - 1 флакон (14 мл);

ИФА-Буфер, готов к использованию - 1 флакон (14 мл);

раствор субстрата тетраметилбензидина (ТМБ); готов к использованию - флакон (14 мл);

контрольная сыворотка на основе сыворотки крови человека с известным содержанием свПСА; готова к использованию - 1 пробирка или флакон (0,8 мл);

концентрат отмывочного раствора 26х-кратный концентрат - 1 флакон (22 мл);

СТОП-реагент; готов к использованию - 1 флакон (14 мл);

липкая лента с бумажной подложкой для заклеивания планшета; готова к использованию — 2 шт;

Инструкция по применению Набора реагентов «свПСА-ИФА»;

Паспорт контроля качества Набора реагентов «свПСА-ИФА».

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.

3.1. Специфичность. Не обнаружено перекрестной реакции мышинных моноклональных антител к ПСА (PS 1) с ПСА-АХТ комплексом.

3.2. Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая Набором реагентов «свПСА-ИФА» концентрация свПСА в сыворотке (плазме) крови не превышает 0,015 нг/мл.

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

3.4. Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» соответствие измеренной концентрации свПСА предписанной, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы 0,75 нг/мл

Процент «открытия» составляет 90-110%.

3.5. Линейность. Зависимость концентрации свПСА в образцах сыворотки (плазмы) крови при разведении их сывороткой (плазмой) крови, не содержащей свПСА, имеет линейный характер в диапазоне концентраций 0,25-5 нг/мл и составляет- 10,0%.

3.6. Клиническая проверка. Нормальные значения.

Соотношения свПСА/обПСА, %. Применять только при значениях обПСА более 4,0нг/мл.

доброкачественные состояния	>10.0
Аденокарцинома простаты	<10.0

В соответствии с требованиями GLP (Good Laboratory Practice, Хорошая Лабораторная Практика) рекомендуется в каждой клинко-диагностической лаборатории при использовании Набора реагентов «свПСА-ИФА» уточнить значения концентрации свПСА, 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 $+37 \pm 0,1$ °с;
- 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 «свПСА-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 свободного 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 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 1000 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 26 раз (1 объем концентрата + 25 объемов дистиллированной воды).

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

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА.

7.1. Внести во все лунки планшета по 50 мкл ИФА-Буфера.

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

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

7.3. Аккуратно перемешать содержимое планшета круговыми движениями по горизонтальной поверхности, заклеить планшет липкой лентой для заклеивания планшета и инкубировать его в течение 30 мин при комнатной температуре (+18 -25 °с) и постоянном встряхивании со скоростью 600-800 об/мин.

7.4. По окончании инкубации удалить содержимое лунок аспирацией (например, с 5 помощью водоструйного насоса) или декантированием и промыть лунки планшета 3 раза 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.

7.5. Внести во все лунки по 100 мкл конъюгата.

7.6. Заклеить планшет бумагой для заклеивания планшета и инкубировать его в течение 30 минут при комнатной температуре (+18-25 °с) и постоянном встряхивании со скоростью 600-800 об/мин.

7.7. 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.

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

Инкубировать планшет в темноте при комнатной температуре (+18-25 °C) в течение 20 мин в зависимости от степени развития синего окрашивания.

7.9. 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 полулогарифмических координатах калибровочный график: ось абсцисс (х) — десятичный логарифм концентрации свПСА в калибровочных пробах (нг/мл), ось ординат

(у) — оптическая плотность калибровочных проб (ОП₄₅₀). Для алгоритма обсчета (аппроксимации) калибровочного графика использовать интервальный (кусочно-линейный, «от точки к точке») метод. Приравняйте концентрацию свПСА в калибровочной пробе 0 нг/мл к несущественно малой величине, например 0,001 нг/мл.

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

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА.

10.1. Набор реагентов «свПСА-ИФА» должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре +2-8 °C в течение всего срока годности (18 мес.).

Допускается хранение (транспортировка) Набора при температуре до +25 °C не более 5 сут.

Допускается однократное замораживание (-20 °C) калибровочных проб и контрольной сыворотки в аликвотах.

10.2. Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 42 неизвестных образцов, 5 калибровочных проб и 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 °C в течение всего срока годности Набора;

-ИФА-Буфер, конъюгат, субстрат и стоп-реагент после вскрытия флакона следует

хранить при температуре +2-8 °C в течение всего срока годности Набора;

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

- приготовленный отмывочный раствор следует хранить при комнатной температуре (+18-25 °C) не более 15 сут. или при температуре +2-8 °C не более 45 сут.;
- оставшийся неиспользованным концентрат отмывочного раствора следует хранить при температуре +2-8 °C 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 «свПСА-ИФА», следует обращаться в ООО «ХЕМА» по адресу: 105264, Москва, ул. 9-ая Парковая, д. 48, к. 4, тел/факс (495) 73700

Руководитель исследовательского
отдела ООО «ХЕМА»  К. Б. н. Д. С. Кострикин
11 января 2011 г.



«СОГЛАСОВАНО»

Заведующий кафедрой клинической
лабораторной диагностики

ГОУ ДПО РМАПО Росздрава



д.м.н., профессор В. В. Долгов

Подпись 
удостоверяю; специалист по
кадровой работе ГОУ ДПО
РМАПО Росздрава
подпись: 

