

«УТВЕРЖДЕНА»

Приказом Росздравнадзора

от «__» ____ 20__ г. № ____

«УТВЕРЖДАЮ»



Генеральный директор
ООО «Компания Алкор Био»
Швырев М.В.
«25» марта 2011 г.

**ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ
НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ИММУНОФЕРМЕНТНОГО
ОПРЕДЕЛЕНИЯ
СВОБОДНОГО ПРОСТАТ-СПЕЦИФИЧЕСКОГО АНТИГЕНА
В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА
(«ОнкоИФА-свободный ПСА»)**

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «ОнкоИФА-свободный ПСА» предназначен для количественного определения свободной фракции простат-специфического антигена (свободного ПСА) в сыворотке крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. ПСА представляет собой гликопротеин с молекулярной массой около 32 000 Да, состоящий из одной полипептидной цепи. ПСА является сериновой протеазой, продуцируемой эпителием человеческой простаты. В норме ПСА секретируется в семенную жидкость в высоких концентрациях, где он является ферментативно активным и напрямую вовлечен в разжижение семенного сгустка. В кровотоке ПСА присутствует в низких концентрациях. Увеличение концентрации ПСА в сыворотке крови свидетельствует о патологиях простаты, таких как доброкачественная гиперплазия и злокачественное перерождение ткани простаты. Определение ПСА широко используется для обнаружения и мониторинга пациентов с раком простаты.

Показано, что ПСА образует стабильные комплексы с различными ингибиторами протеаз. Основная часть ПСА в сыворотке крови человека присутствует в виде комплекса с α_1 -антихимотрипсином (ПСА-АХТ). Однако существует большая разница в соотношении свободного ПСА и ПСА-АХТ комплекса среди различных пациентов. Доля свободного ПСА выше в случае доброкачественной гиперплазии в сравнении с раком простаты.

1.3. Набор «ОнкоИФА-свободный ПСА» рассчитан на проведение анализа в дубликатах 40 неизвестных, 6 калибровочных проб, одной пробы контрольной сыворотки и одной пробы для определения оптической плотности раствора ТМБ при использовании всех стрипов одновременно (всего 96 определений).

***Примечание:** в случае дробного применения набор может быть использован только в течение месяца после вскрытия компонентов набора.*

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип действия

В наборе «ОнкоИФА-свободный ПСА» использован «сэндвич»-вариант твердофазного иммуноферментного анализа. Для реализации этого варианта использованы два моноклональных антитела с различной эпитопной специфичностью к ПСА. Одно из них иммобилизовано на твердой фазе (внутренняя поверхность лунок), второе конъюгировано с пероксидазой хрена. В лунках, при добавлении исследуемого образца и аналитического бу-

фера, во время первой инкубации происходит связывание свободного ПСА с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок моноклональными антителами, специфичными к уникальному эпитопу на молекуле свободного ПСА. Во время второй инкубации конъюгат моноклональных антител к ПСА с пероксидазой связывается со свободным ПСА, иммобилизованным в ходе первой инкубации.

Несвязавшиеся компоненты удаляются промывкой. Количество связавшегося конъюгата прямо пропорционально концентрации свободного ПСА в исследуемом образце (Рисунок 1).

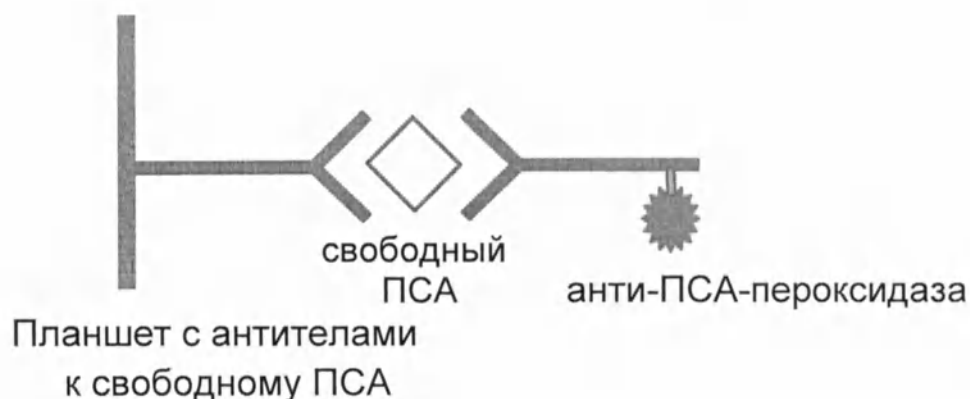


Рисунок 1. Схема анализа

Во время инкубации с раствором ТМБ происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски прямо пропорциональна концентрации свободного ПСА в анализируемых пробах. После измерения оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочного графика рассчитывается концентрация свободного ПСА в исследуемых образцах.

2.2. Состав набора

- комплект из двенадцати восьмилуночных стрипов в рамке с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок моноклональными антителами к ПСА, маркирован «Стрипы с моноклональными антителами к свободному ПСА» — 1 упаковка;
- калибровочные пробы (КП), содержащие известные количества свободного ПСА. Флаконы маркированы «Калибровочная проба №1», «Калибровочная проба №2», «Калибровочная проба №3», «Калибровочная проба №4», «Калибровочная проба №5», «Калибровочная проба №6»; точные значения концентраций свободного ПСА в калибровочных пробах указаны на этикетках флаконов, ориентировочные - 0; 0,2; 0,5; 2; 5; 10 нг/мл - 6 флаконов (лиофилизированные препараты или жидкости по 0,5 мл);
 - аналитический водно-солевой раствор, маркирован «Буфер А» — 1 флакон (14 мл);
 - конъюгат анти-ПСА-пероксидаза, маркирован «Конъюгат Е» — 1 флакон (14 мл);
 - концентрированный водно-солевой раствор для промывки лунок, маркирован «Буфер Р» — 2 флакона (по 14 мл);
 - раствор тетраметилбензидина, маркирован «Раствор ТМБ» — 1 флакон (14 мл);
 - стоп-реагент (1 Н соляная кислота), маркирован «Стоп-реагент» — 1 флакон (14 мл);
 - контрольная сыворотка с известным содержанием свободного ПСА, маркирована «Контрольная сыворотка» — 1 флакон (лиофилизированный препарат или жидкость 0,5 мл);
 - прозрачный пластиковый пакет с замком (при упаковке стрипов в пакет из 2-слойного полиэтилена).

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность. Не обнаружено перекрестной реакции моноклональных антител к свободному ПСА с АФП, РЭА, СА 19-9, СА 125, РАРР-А, альбумином, гликопротеином, билирубином и человеческим IgG.

3.2. Коэффициент вариации результатов определения свободного ПСА в одном и том же образце сыворотки крови человека с использованием набора «ОнкоИФА-свободный ПСА» не превышает 8%.

3.3. Линейность. Зависимость концентрации свободного ПСА в образцах сыворотки крови при разведении их калибровочной пробой №1 имеет линейный характер в диапазоне концентраций калибровочных проб №2 - №6 и составляет 90-110%.

3.4. Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» свободного ПСА — проверка соответствия значения определяемой концентрации свободного ПСА расчетной величине, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы №3. Процент открытия составляет 90–110%.

3.5. Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая набором концентрация свободного ПСА в сыворотке крови человека не превышает 0,08 нг/мл.

3.6. Ожидаемое пороговое соотношение. Отношение концентрации свободного ПСА к концентрации общего ПСА может быть использовано как критерий для дифференциальной диагностики рака простаты и доброкачественной гиперплазии предстательной железы (ДГПЖ) у пациентов с умеренно увеличенным (4-10 нг/мл) уровнем общего ПСА. Отношение концентрации свободного ПСА к концентрации общего ПСА выражается в процентах и имеет вид:

$$\frac{\text{Концентрация свободного ПСА}}{\text{Концентрация общего ПСА}} \times 100\%$$

Значение соотношения концентраций свободного и общего ПСА ниже определенного уровня (по данным литературы — 14–16%) с большой вероятностью свидетельствует о наличии рака предстательной железы, однако конкретный уровень этого порогового соотношения в различных лабораториях и клиниках подвержен некоторым колебаниям.

Измерение концентрации одного только свободного ПСА в сыворотке (без измерения концентрации общего ПСА и расчета их соотношения) не имеет самостоятельного диагностического значения. Для получения корректных значений соотношения свободного и общего ПСА необходимо измерять их в один день, не допуская повторного замораживания-размораживания образца.

Ожидаемое пороговое соотношение зависит от многих факторов: специфичности метода, особенностей исследуемой популяции, точности метода в конкретной лаборатории. По этой причине каждой лаборатории рекомендуется использовать предоставленное изготовителем соотношение только до тех пор, пока специалистами лаборатории не будет определено ожидаемое пороговое соотношение, характерное для конкретной популяции в месте расположения лаборатории.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- 4.1. Потенциальный риск применения набора — класс 2б.
- 4.2. Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.
- 4.3. При работе с набором следует соблюдать требования ГОСТ Р 52905-2007 «Лаборатории медицинские. Требования безопасности».
- 4.4. Стоп-реагент представляет собой 1 Н раствор соляной кислоты. 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.
- 4.5. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, т.к. производные крови, входящие в состав набора, и исследуемые образцы являются потенциально инфицированным материалом, способным длительное время сохранять и передавать возбудителей различных вирусных инфекций.
- 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

- Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках при длине волны 450 нм;
- прибор для встряхивания рамки со стрипами (термостатируемый шейкер), позволяющий производить встряхивание со скоростью 400–800 об/мин при температуре +37°C;
- пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками с изменяемым объемом отбора жидкостей: на 5–50 мкл; на 40–200 мкл; на 200–1000 мкл; на 1000–5000 мкл;
- пипетка полуавтоматическая восьмиканальная со сменными наконечниками, позволяющая отбирать объемы жидкости до 300 мкл;
- цилиндр мерный, позволяющий отмерять 50–500 мл;
- стакан стеклянный подходящего объема;
- вода дистиллированная;
- бумага фильтровальная;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- 1% раствор гипохлорита натрия или 6% раствор перекиси водорода;
- контейнер для дезинфекции;
- ванночки для внесения реагентов восьмиканальной пипеткой.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Забор крови из вены осуществляют с соблюдением правил асептики. После формирования сгустка сыворотку отделяют путем центрифугирования. После центрифугирования сыворотку переносят в отдельную пробирку.

6.2. Для проведения анализа не следует использовать плазму крови, гемолизированную или мутную сыворотку, а также образцы сыворотки, содержащие азид натрия.

6.3. Образцы сыворотки крови разрешается хранить при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$ не более 2-х суток; при необходимости более длительного хранения (до 3-х месяцев) рекомендуется аликвотировать образец и хранить в замороженном виде при температуре -20°C и ниже. Не допускается повторное замораживание образца.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Подготовка реагентов

7.1.1. Стрипы. Перед вскрытием пакет со стрипами необходимо выдержать при комнатной температуре ($+18...25^{\circ}\text{C}$) не менее 30 минут. Вскрыть пакет и переставить на свободную рамку необходимое количество стрипов.

7.1.2. Жидкие калибровочные пробы и контрольная сыворотка готовы к использованию.

Для восстановления лиофилизированных калибровочных проб и контрольной сыворотки перед вскрытием флаконов легким постукиванием стряхнуть частицы, прилипшие к стенкам флаконов или к крышкам. Открыть флаконы и положить крышки перевернутыми на сухую поверхность. В каждый флакон с калибровочной пробой и контрольной сывороткой внести по 0,5 мл дистиллированной воды и закрыть крышками. Выдержать флаконы в течение 10 минут при комнатной температуре без перемешивания. Затем, аккуратно наклоняя и вращая флаконы, перемешать их содержимое до полного растворения, избегая пенообразования. В течение следующих 10 минут выдержать флаконы при комнатной температуре, периодически перемешивая.

7.1.3. Конъюгат готов к использованию. Расход конъюгата на один стрип составляет 1,15 мл.

7.1.4. Буфер А готов к использованию. Расход буфера А на один стрип составляет 1,15 мл.

7.1.5. Промывочный раствор. Необходимое количество буфера Р развести дистиллированной водой в 20 раз.

Например:

5 мл буфера Р + 95 мл дистиллированной воды.

Тщательно перемешать, избегая пенообразования.

7.1.6. Раствор тетраметилбензидина (ТМБ) готов к использованию. Расход ТМБ на один стрип составляет 1,15 мл.

7.1.7. Стоп-реагент готов к использованию. Расход стоп-реагента на один стрип составляет 1,15 мл.

7.1.8. Все реагенты перед проведением анализа должны быть тщательно перемешаны и доведены до комнатной температуры.

В Приложении 1 приведена схема проведения анализа.

7.2. Постановка анализа

7.2.1. Составить протокол маркировки лунок. Лунки промаркировать следующим образом:

- | | | |
|--------|---|--|
| A1, A2 | – | № 1 - для измерения величины оптической плотности раствора ТМБ; |
| B1, B2 | – | № 2 - для измерения величины оптической плотности КП №1; |
| C1, C2 | – | № 3 - для измерения величины оптической плотности КП №2; |
| D1, D2 | – | № 4 - для измерения величины оптической плотности КП №3; |
| E1, E2 | – | № 5 - для измерения величины оптической плотности КП №4; |
| F1, F2 | – | № 6 - для измерения величины оптической плотности КП №5; |
| G1, G2 | – | № 7 - для измерения величины оптической плотности КП №6; |
| H1, H2 | – | № 8 - для измерения величины оптической плотности контрольной сыворотки. |

7.2.2. Во все лунки, кроме лунок A1 и A2, внести по 100 мкл буфера А.

7.2.3. Внести в соответствующие лунки по 50 мкл калибровочных проб и контрольной сыворотки, в оставшиеся лунки – по 50 мкл исследуемой сыворотки крови в дубликатах.

***Примечание:** общее время внесения калибровочных проб, контрольной сыворотки и исследуемых сывороток крови не должно превышать 15 минут, иначе время инкубации разных образцов будет значительно различаться, что приведет к неправильным результатам.*

7.2.4. Инкубировать стрипы в течение 60 минут при встряхивании в термостатируемом шейкере при температуре $+37^{\circ}\text{C}$ со скоростью 500–800 об/мин.

7.2.5. По окончании инкубации удалить содержимое лунок в контейнер с дезинфицирующим раствором (1% раствором гипохлорита натрия или 6% раствором перекиси водорода) и промыть лунки пять раз. При каждой промывке во все лунки добавить по 300 мкл промывочного раствора, приготовленного по п. 7.1.5., встряхнуть рамку на шейкере в течение 5–10 секунд с последующим декантированием. После последнего декантирования тщательно удалить остатки жидкости из лунок постукиванием рамки со стрипами в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

Допускается промывка лунок при помощи автоматического промывочного устройства.

7.2.6. Немедленно внести во все лунки, кроме лунок A1 и A2, по 120 мкл конъюгата.

7.2.7. Инкубировать стрипы согласно п. 7.2.4.

7.2.8. По окончании инкубации удалить содержимое лунок декантированием и промыть лунки согласно п. 7.2.5.

7.2.9. Немедленно внести во все лунки по 100 мкл раствора ТМБ. Инкубировать стрипы в темноте при комнатной температуре ($+18...25^{\circ}\text{C}$) в течение 15–30 минут в зависимости от степени развития окраски.

7.2.10. Добавить во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор ТМБ, по 100 мкл стоп-реагента для остановки ферментной реакции, перемешать на шейкере в течение 1–2 минут при комнатной температуре.

7.2.11. Если невозможно измерить оптическую плотность в лунках планшета непосредственно после выполнения п. 7.2.10., то следует иметь в виду, что окраска в лунках планшета стабильна не более 20 минут при комнатной температуре.

***Примечание:** максимальная оптическая плотность не должна превышать пределов линейного измерения спектрофотометра. Рабочий диапазон спектрофотометра необходимо уточнять в паспорте прибора. Рекомендуются максимальная оптическая плотность не более 2,5 ед. ОП.*

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Измерить на фотометре вертикального сканирования оптическую плотность раствора в лунках при длине волны 450 нм.

При регистрации результатов **необходимо вычитать** величину оптической плотности в лунках A1 и A2 из значений оптических плотностей всех остальных лунок.

Примечание: среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках A1 и A2 не должно превышать 0,09 ед. ОП.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Построить калибровочный график зависимости оптических плотностей от концентрации свободного ПСА (нг/мл) в калибровочных пробах (Рисунок 2). Внешний вид графика зависит от способа преобразования осей.

Примечание 1: для построения калибровочных графиков рекомендуется использовать Программное обеспечение «ИФА Мастер».

Примечание 2: для построения калибровочного графика на масштабной бумаге необходимо использовать данные оптических плотностей после вычитания из них средней величины оптической плотности лунок с ТМБ.

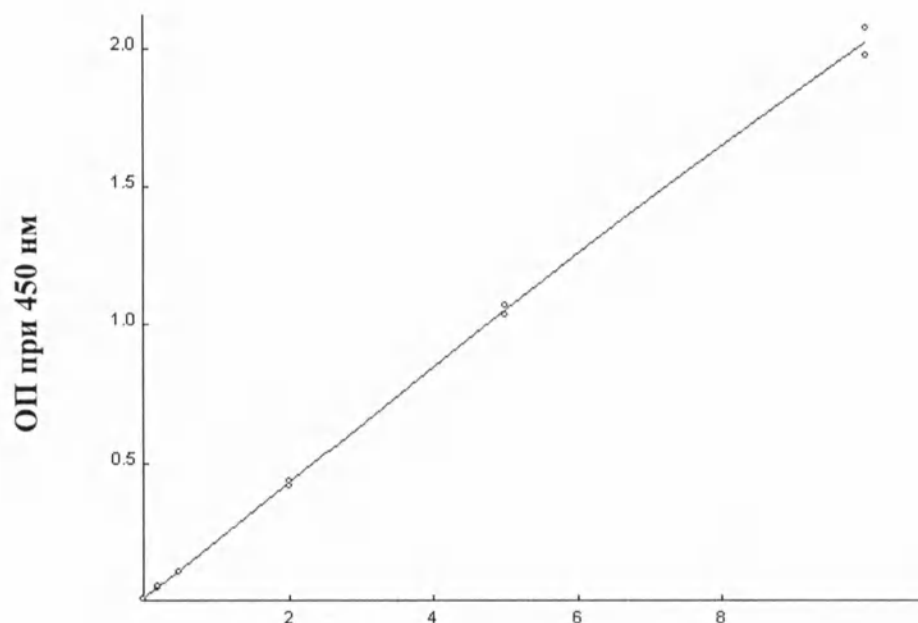
Если программа фотометра не позволяет вычитать величину оптической плотности лунок A1 и A2, то необходимо пользоваться формулой:

$$B - B_T$$

где B – среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках, содержащих калибровочные или исследуемые пробы;

B_T – среднее арифметическое значение оптической плотности лунок A1 и A2.

9.2. Определить содержание свободного ПСА в пробах по калибровочному графику.



Концентрация свободного ПСА, нг/мл

Рисунок 2. Типичный калибровочный график
Запрещается использовать для оценки реальных
экспериментальных данных!

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1. Набор «ОнкоИФА-свободный ПСА» должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности. Допускается хранение набора при температуре до $+25^{\circ}\text{C}$ не более 5 суток.

Срок годности набора — 12 месяцев.

10.2. Набор следует вынимать из холодильника не более чем за 1 час до начала анализа, но не позже, чем за 30 минут до проведения анализа.

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

- стрипы поместить в пакет с этикеткой, затем в пластиковый пакет с замком и стрипы поместить в пакет с этикеткой, затем в пластиковый пакет с замком и герметично закрыть. Хранить в герметично закрытом пакете с замком при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности;
- жидкие, готовые к использованию, калибровочные пробы и контрольную сыворотку после вскрытия флаконов хранить при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$ не более 1 месяца;
- восстановленные (растворенные) из лиофилизированных препаратов калибровочные пробы и контрольную сыворотку хранить при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$ не более 1 месяца;
- конъюгат и раствор ТМБ после вскрытия флаконов хранить при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$ не более 1 месяца;
- промывочный раствор, подготовленный к использованию, хранить закрытым при комнатной температуре ($+18...25^{\circ}\text{C}$) не более 5 суток;
- буфер А, буфер Р и стоп-реагент после вскрытия флаконов хранить при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности.

10.4. При использовании набора для проведения нескольких независимых анализов необходимо иметь в виду следующее:

- количество независимых экспериментов, которое можно провести с помощью данного набора (4 эксперимента), ограничено объемом калибровочных проб;
- для каждого независимого эксперимента необходимо построение нового калибровочного графика и рекомендуется определение концентрации свободного ПСА в контрольной сыворотке;
- запрещается возвращать избыток конъюгата, ТМБ и стоп-реагента из ванночек во флаконы;
- из флаконов с открытыми крышками происходит испарение, которое может привести к получению некорректных результатов при повторном использовании реагентов. После окончания внесения реагентов в лунки планшета на каждой стадии анализа необходимо плотно закрывать крышки флаконов и помещать в рекомендуемые условия хранения.

10.5. Не допускается смешивание или одновременное использование реагентов из разных партий, за исключением ТМБ, стоп-реагента и концентрированного промывочного раствора, входящего в состав данного набора реагентов.

10.6. Запрещается использовать концентрированный промывочный раствор, стоп-реагент и ТМБ из наборов реагентов других фирм-производителей.

10.7. К работе с набором допускается только специально обученный персонал.

10.8. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции.

По вопросам качества набора «ОнкоИФА-свободный ПСА» следует обращаться в ООО «Компания Алкор Био» по адресу: 192148, г. Санкт-Петербург, Железнодорожный проспект, д.40, тел/факс: (812) 677-87-79.

Генеральный директор
ООО «Компания АлкорБио»



Швырев М.В.

Руководитель лаборатории разработки ИФА-систем
ООО «Компания АлкорБио»

Сусорова А.С.

СОГЛАСОВАНО:
Заместитель директора
ФГУ «ФЦСКЭ им.В.А.Алмазова»
Минздравсоцразвития России
по научно-исследовательской работе,
профессор



Конради А.О.

СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

Приложение 1

№	Стадия (операция)	Реагенты	Темпера- тура	Время	Примечания
1	Внесение реагентов	100 мкл буфера А в лунки для исследуемых образцов	КТ +18 ... +25°C	Внесение КП, КС и исследуемых образцов не более 15'	В лунки для определения ОП ТМБ ничего не вносить
2		50 мкл КП и КС			
3		50 мкл исследуемых образцов			
4	Инкубация №1	—	+37°C	60'	Термостатируемый шейкер, 500 – 800 об/мин
5	Промывка	300 мкл в лунку 1*промывочного раствора (5 раз)			1*промывочный раствор = 14 мл буфера Р + 266 мл H ₂ O
6	Внесение конъюгата	120 мкл конъюгата			Конъюгат не вносить в лунки для определения ОП ТМБ
7	Инкубация №2	—	+37°C	60'	Термостатируемый шейкер, 500 – 800 об/мин
8	Промывка	300 мкл в лунку 1*промывочного раствора (5 раз)			1*промывочный раствор = 14 мл буфера Р + 266 мл H ₂ O
9	Внесение хромогена	100 мкл ТМБ			
10	Инкубация с ТМБ	—	КТ	15-30'	В темноте
11	Остановка ферментной реакции	100 мкл стоп-реагента			
12	Перемешивание		КТ	1 – 2'	шейкер
13	Регистрация результатов	—		В течение 20' после остановки ферментной реакции	Фотометр, 450 нм
14	Обработка результатов				Калькулятор и масштабная бумага/соответствующее ПО

Примечания: КП — калибровочная проба; КС — контрольная сыворотка;

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU кая плотность; КТ — комнатная температура (+18...+25°C); ПО — программное обеспечение.

Прошито, пронумеровано, скреплено
печатью 10 (десять) лист об

Генеральный директор
ООО «Компания Алкор Био»
М.В. Швырев



«УТВЕРЖДЕНА»

Приказом Росздравнадзора
от «__» ____ 20__ г. № _____

«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный директор
ООО «Компания Алкор Био»
Швырев М.В.
«25» марта 2011 г.



**ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ
НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ИММУНОФЕРМЕНТНОГО
ОПРЕДЕЛЕНИЯ
СВОБОДНОГО ПРОСТАТ-СПЕЦИФИЧЕСКОГО АНТИГЕНА
В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА
(«ОнкоИФА-свободный ПСА»)**

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «ОнкоИФА-свободный ПСА» предназначен для количественного определения свободной фракции простат-специфического антигена (свободного ПСА) в сыворотке крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. ПСА представляет собой гликопротеин с молекулярной массой около 32 000 Да, состоящий из одной полипептидной цепи. ПСА является сериновой протеазой, продуцируемой эпителием человеческой простаты. В норме ПСА секретируется в семенную жидкость в высоких концентрациях, где он является ферментативно активным и напрямую вовлечен в разжижение семенного сгустка. В кровотоке ПСА присутствует в низких концентрациях. Увеличение концентрации ПСА в сыворотке крови свидетельствует о патологиях простаты, таких как доброкачественная гиперплазия и злокачественное перерождение ткани простаты. Определение ПСА широко используется для обнаружения и мониторинга пациентов с раком простаты.

Показано, что ПСА образует стабильные комплексы с различными ингибиторами протеаз. Основная часть ПСА в сыворотке крови человека присутствует в виде комплекса с α_1 -антихимотрипсином (ПСА-АХТ). Однако существует большая разница в соотношении свободного ПСА и ПСА-АХТ комплекса среди различных пациентов. Доля свободного ПСА выше в случае доброкачественной гиперплазии в сравнении с раком простаты.

1.3. Набор «ОнкоИФА-свободный ПСА» рассчитан на проведение анализа в дубликатах 40 неизвестных, 6 калибровочных проб, одной пробы контрольной сыворотки и одной пробы для определения оптической плотности раствора ТМБ при использовании всех стрипов одновременно (всего 96 определений).

***Примечание:** в случае дробного применения набор может быть использован только в течение месяца после вскрытия компонентов набора.*

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип действия

В наборе «ОнкоИФА-свободный ПСА» использован «сэндвич»-вариант твердофазного иммуноферментного анализа. Для реализации этого варианта использованы два моноклональных антитела с различной эпитопной специфичностью к ПСА. Одно из них иммобилизовано на твердой фазе (внутренняя поверхность лунок), второе конъюгировано с пероксидазой хрена. В лунках, при добавлении исследуемого образца и аналитического бу-

фера, во время первой инкубации происходит связывание свободного ПСА с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок моноклональными антителами, специфичными к уникальному эпитопу на молекуле свободного ПСА. Во время второй инкубации конъюгат моноклональных антител к ПСА с пероксидазой связывается со свободным ПСА, иммобилизованным в ходе первой инкубации.

Несвязавшиеся компоненты удаляются промывкой. Количество связавшегося конъюгата прямо пропорционально концентрации свободного ПСА в исследуемом образце (Рисунок 1).

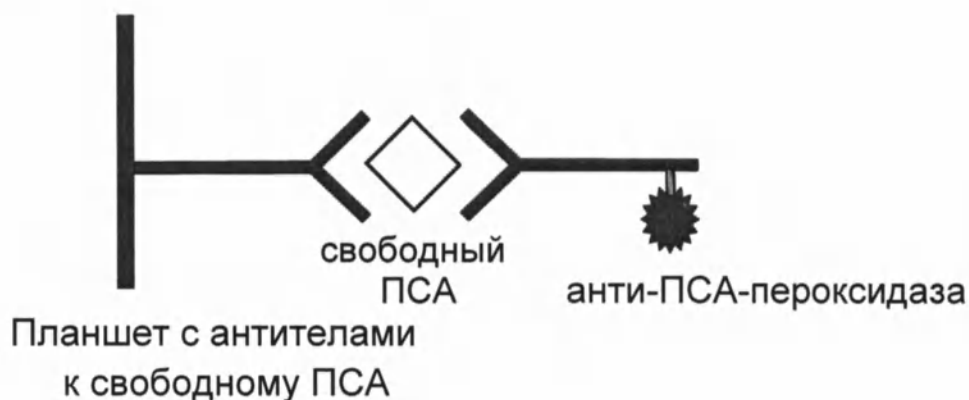


Рисунок 1. Схема анализа

Во время инкубации с раствором ТМБ происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски прямо пропорциональна концентрации свободного ПСА в анализируемых пробах. После измерения оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочного графика рассчитывается концентрация свободного ПСА в исследуемых образцах.

2.2. Состав набора

- комплект из двенадцати восьмилуночных стрипов в рамке с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок моноклональными антителами к ПСА, маркирован «Стрипы с моноклональными антителами к свободному ПСА» — 1 упаковка;
- калибровочные пробы (КП), содержащие известные количества свободного ПСА. Флаконы маркированы «Калибровочная проба №1», «Калибровочная проба №2», «Калибровочная проба №3», «Калибровочная проба №4», «Калибровочная проба №5», «Калибровочная проба №6»; точные значения концентраций свободного ПСА в калибровочных пробах указаны на этикетках флаконов, ориентировочные - 0; 0,2; 0,5; 2; 5; 10 нг/мл - 6 флаконов (лиофилизированные препараты или жидкости по 0,5 мл);
- аналитический водно-солевой раствор, маркирован «Буфер А» — 1 флакон (14 мл);
- конъюгат анти-ПСА-пероксидаза, маркирован «Конъюгат Е» — 1 флакон (14 мл);
- концентрированный водно-солевой раствор для промывки лунок, маркирован «Буфер Р» — 2 флакона (по 14 мл);
- раствор тетраметилбензидина, маркирован «Раствор ТМБ» — 1 флакон (14 мл);
- стоп-реагент (1 Н соляная кислота), маркирован «Стоп-реагент» — 1 флакон (14 мл);
- контрольная сыворотка с известным содержанием свободного ПСА, маркирована «Контрольная сыворотка» — 1 флакон (лиофилизированный препарат или жидкость 0,5 мл);
- прозрачный пластиковый пакет с замком (при упаковке стрипов в пакет из 2-слойного полиэтилена).

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность. Не обнаружено перекрестной реакции моноклональных антител к свободному ПСА с АФП, РЭА, СА 19-9, СА 125, РАРР-А, альбумином, гликопротеином, билирубином и человеческим IgG.

3.2. Коэффициент вариации результатов определения свободного ПСА в одном и том же образце сыворотки крови человека с использованием набора «ОнкоИФА-свободный ПСА» не превышает 8%.

3.3. Линейность. Зависимость концентрации свободного ПСА в образцах сыворотки крови при разведении их калибровочной пробой №1 имеет линейный характер в диапазоне концентраций калибровочных проб №2 - №6 и составляет 90-110%.

3.4. Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» свободного ПСА — проверка соответствия значения определяемой концентрации свободного ПСА расчетной величине, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы №3. Процент открытия составляет 90–110%.

3.5. Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая набором концентрация свободного ПСА в сыворотке крови человека не превышает 0,08 нг/мл.

3.6. Ожидаемое пороговое соотношение. Отношение концентрации свободного ПСА к концентрации общего ПСА может быть использовано как критерий для дифференциальной диагностики рака простаты и доброкачественной гиперплазии предстательной железы (ДГПЖ) у пациентов с умеренно увеличенным (4-10 нг/мл) уровнем общего ПСА. Отношение концентрации свободного ПСА к концентрации общего ПСА выражается в процентах и имеет вид:

$$\frac{\text{Концентрация свободного ПСА}}{\text{Концентрация общего ПСА}} \times 100\%$$

Значение соотношения концентраций свободного и общего ПСА ниже определенного уровня (по данным литературы — 14–16%) с большой вероятностью свидетельствует о наличии рака предстательной железы, однако конкретный уровень этого порогового соотношения в различных лабораториях и клиниках подвержен некоторым колебаниям.

Измерение концентрации одного только свободного ПСА в сыворотке (без измерения концентрации общего ПСА и расчета их соотношения) не имеет самостоятельного диагностического значения. Для получения корректных значений соотношения свободного и общего ПСА необходимо измерять их в один день, не допуская повторного замораживания-размораживания образца.

Ожидаемое пороговое соотношение зависит от многих факторов: специфичности метода, особенностей исследуемой популяции, точности метода в конкретной лаборатории. По этой причине каждой лаборатории рекомендуется использовать предоставленное изготовителем соотношение только до тех пор, пока специалистами лаборатории не будет определено ожидаемое пороговое соотношение, характерное для конкретной популяции в месте расположения лаборатории.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- 4.1. Потенциальный риск применения набора — класс 2б.
- 4.2. Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.
- 4.3. При работе с набором следует соблюдать требования ГОСТ Р 52905-2007 «Лаборатории медицинские. Требования безопасности».
- 4.4. Стоп-реагент представляет собой 1 Н раствор соляной кислоты. 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.
- 4.5. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, т.к. производные крови, входящие в состав набора, и исследуемые образцы являются потенциально инфицированным материалом, способным длительное время сохранять и передавать возбудителей различных вирусных инфекций.
- 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

- Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках при длине волны 450 нм;
- прибор для встряхивания рамки со стрипами (термостатируемый шейкер), позволяющий производить встряхивание со скоростью 400–800 об/мин при температуре +37°C;
- пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками с изменяемым объемом отбора жидкостей: на 5–50 мкл; на 40–200 мкл; на 200–1000 мкл; на 1000–5000 мкл;
- пипетка полуавтоматическая восьмиканальная со сменными наконечниками, позволяющая отбирать объемы жидкости до 300 мкл;
- цилиндр мерный, позволяющий отмерять 50–500 мл;
- стакан стеклянный подходящего объема;
- вода дистиллированная;
- бумага фильтровальная;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- 1% раствор гипохлорита натрия или 6% раствор перекиси водорода;
- контейнер для дезинфекции;
- ванночки для внесения реагентов восьмиканальной пипеткой.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Забор крови из вены осуществляют с соблюдением правил асептики. После формирования сгустка сыворотку отделяют путем центрифугирования. После центрифугирования сыворотку переносят в отдельную пробирку.

6.2. Для проведения анализа не следует использовать плазму крови, гемолизированную или мутную сыворотку, а также образцы сыворотки, содержащие азид натрия.

6.3. Образцы сыворотки крови разрешается хранить при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$ не более 2-х суток; при необходимости более длительного хранения (до 3-х месяцев) рекомендуется аликвотировать образец и хранить в замороженном виде при температуре -20°C и ниже. Не допускается повторное замораживание образца.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Подготовка реагентов

7.1.1. Стрипы. Перед вскрытием пакет со стрипами необходимо выдержать при комнатной температуре ($+18...25^{\circ}\text{C}$) не менее 30 минут. Вскрыть пакет и переставить на свободную рамку необходимое количество стрипов.

7.1.2. Жидкие калибровочные пробы и контрольная сыворотка готовы к использованию.

Для восстановления лиофилизированных калибровочных проб и контрольной сыворотки перед вскрытием флаконов легким постукиванием стряхнуть частицы, прилипшие к стенкам флаконов или к крышкам. Открыть флаконы и положить крышки перевернутыми на сухую поверхность. В каждый флакон с калибровочной пробой и контрольной сывороткой внести по 0,5 мл дистиллированной воды и закрыть крышками. Выдержать флаконы в течение 10 минут при комнатной температуре без перемешивания. Затем, аккуратно наклоняя и вращая флаконы, перемешать их содержимое до полного растворения, избегая пенообразования. В течение следующих 10 минут выдержать флаконы при комнатной температуре, периодически перемешивая.

7.1.3. Конъюгат готов к использованию. Расход конъюгата на один стрип составляет 1,15 мл.

7.1.4. Буфер А готов к использованию. Расход буфера А на один стрип составляет 1,15 мл.

7.1.5. Промывочный раствор. Необходимое количество буфера Р развести дистиллированной водой в 20 раз.

Например:

5 мл буфера Р + 95 мл дистиллированной воды.

Тщательно перемешать, избегая пенообразования.

7.1.6. Раствор тетраметилбензидина (ТМБ) готов к использованию. Расход ТМБ на один стрип составляет 1,15 мл.

7.1.7. Стоп-реагент готов к использованию. Расход стоп-реагента на один стрип составляет 1,15 мл.

7.1.8. Все реагенты перед проведением анализа должны быть тщательно перемешаны и доведены до комнатной температуры.

В Приложении 1 приведена схема проведения анализа.

7.2. Постановка анализа

7.2.1. Составить протокол маркировки лунок. Лунки промаркировать следующим образом:

A1, A2	–	№ 1 - для измерения величины оптической плотности раствора ТМБ;
B1, B2	–	№ 2 - для измерения величины оптической плотности КП №1;
C1, C2	–	№ 3 - для измерения величины оптической плотности КП №2;
D1, D2	–	№ 4 - для измерения величины оптической плотности КП №3;
E1, E2	–	№ 5 - для измерения величины оптической плотности КП №4;
F1, F2	–	№ 6 - для измерения величины оптической плотности КП №5;
G1, G2	–	№ 7 - для измерения величины оптической плотности КП №6;
H1, H2	–	№ 8 - для измерения величины оптической плотности контрольной сыворотки.

7.2.2. Во все лунки, кроме лунок A1 и A2, внести по 100 мкл буфера А.

7.2.3. Внести в соответствующие лунки по 50 мкл калибровочных проб и контрольной сыворотки, в оставшиеся лунки – по 50 мкл исследуемой сыворотки крови в дубликатах.

***Примечание:** общее время внесения калибровочных проб, контрольной сыворотки и исследуемых сывороток крови не должно превышать 15 минут, иначе время инкубации разных образцов будет значительно различаться, что приведет к неправильным результатам.*

7.2.4. Инкубировать стрипы в течение 60 минут при встряхивании в термостатируемом шейкере при температуре $+37^{\circ}\text{C}$ со скоростью 500–800 об/мин.

7.2.5. По окончании инкубации удалить содержимое лунок в контейнер с дезинфицирующим раствором (1% раствором гипохлорита натрия или 6% раствором перекиси водорода) и промыть лунки пять раз. При каждой промывке во все лунки добавить по 300 мкл промывочного раствора, приготовленного по п. 7.1.5., встряхнуть рамку на шейкере в течение 5–10 секунд с последующим декантированием. После последнего декантирования тщательно удалить остатки жидкости из лунок постукиванием рамки со стрипами в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

Допускается промывка лунок при помощи автоматического промывочного устройства.

7.2.6. Немедленно внести во все лунки, кроме лунок A1 и A2, по 120 мкл конъюгата.

7.2.7. Инкубировать стрипы согласно п. 7.2.4.

7.2.8. По окончании инкубации удалить содержимое лунок декантированием и промыть лунки согласно п. 7.2.5.

7.2.9. Немедленно внести во все лунки по 100 мкл раствора ТМБ. Инкубировать стрипы в темноте при комнатной температуре ($+18...25^{\circ}\text{C}$) в течение 15–30 минут в зависимости от степени развития окраски.

7.2.10. Добавить во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор ТМБ, по 100 мкл стоп-реагента для остановки ферментной реакции, перемешать на шейкере в течение 1–2 минут при комнатной температуре.

7.2.11. Если невозможно измерить оптическую плотность в лунках планшета непосредственно после выполнения п. 7.2.10., то следует иметь в виду, что окраска в лунках планшета стабильна не более 20 минут при комнатной температуре.

***Примечание:** максимальная оптическая плотность не должна превышать пределов линейного измерения спектрофотометра. Рабочий диапазон спектрофотометра необходимо уточнять в паспорте прибора. Рекомендуемая максимальная оптическая плотность не более 2,5 ед. ОП.*

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Измерить на фотометре вертикального сканирования оптическую плотность раствора в лунках при длине волны 450 нм.

При регистрации результатов **необходимо вычитать** величину оптической плотности в лунках A1 и A2 из значений оптических плотностей всех остальных лунок.

Примечание: среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках A1 и A2 не должно превышать 0,09 ед. ОП.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Построить калибровочный график зависимости оптических плотностей от концентрации свободного ПСА (нг/мл) в калибровочных пробах (Рисунок 2). Внешний вид графика зависит от способа преобразования осей.

Примечание 1: для построения калибровочных графиков рекомендуется использовать Программное обеспечение «ИФА Мастер».

Примечание 2: для построения калибровочного графика на масштабной бумаге необходимо использовать данные оптических плотностей после вычитания из них средней величины оптической плотности лунок с ТМБ.

Если программа фотометра не позволяет вычитать величину оптической плотности лунок A1 и A2, то необходимо пользоваться формулой:

$$B - B_T,$$

где B – среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках, содержащих калибровочные или исследуемые пробы;

B_T – среднее арифметическое значение оптической плотности лунок A1 и A2.

9.2. Определить содержание свободного ПСА в пробах по калибровочному графику.

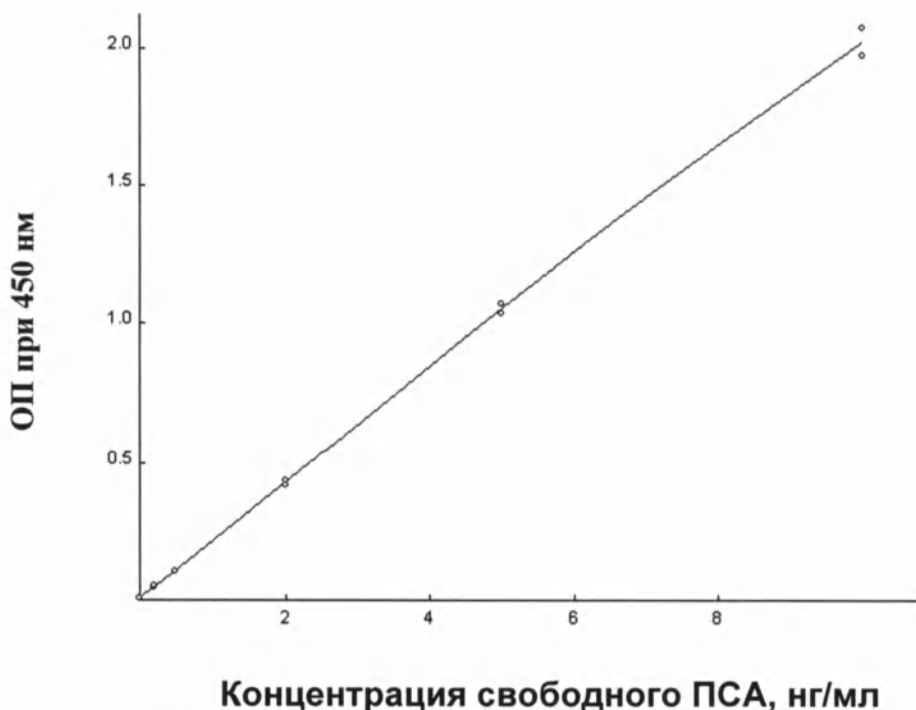


Рисунок 2. Типичный калибровочный график
Запрещается использовать для оценки реальных экспериментальных данных!

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1. Набор «ОнкоИФА-свободный ПСА» должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности. Допускается хранение набора при температуре до $+25^{\circ}\text{C}$ не более 5 суток.

Срок годности набора — 12 месяцев.

10.2. Набор следует вынимать из холодильника не более чем за 1 час до начала анализа, но не позже, чем за 30 минут до проведения анализа.

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

- стрипы поместить в пакет с этикеткой, затем в пластиковый пакет с замком и стрипы поместить в пакет с этикеткой, затем в пластиковый пакет с замком и герметично закрыть. Хранить в герметично закрытом пакете с замком при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности;
- жидкие, готовые к использованию, калибровочные пробы и контрольную сыворотку после вскрытия флаконов хранить при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$ не более 1 месяца;
- восстановленные (растворенные) из лиофилизированных препаратов калибровочные пробы и контрольную сыворотку хранить при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$ не более 1 месяца;
- конъюгат и раствор ТМБ после вскрытия флаконов хранить при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$ не более 1 месяца;
- промывочный раствор, подготовленный к использованию, хранить закрытым при комнатной температуре ($+18...25^{\circ}\text{C}$) не более 5 суток;
- буфер А, буфер Р и стоп-реагент после вскрытия флаконов хранить при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности.

10.4. При использовании набора для проведения нескольких независимых анализов необходимо иметь в виду следующее:

- количество независимых экспериментов, которое можно провести с помощью данного набора (4 эксперимента), ограничено объемом калибровочных проб;
- для каждого независимого эксперимента необходимо построение нового калибровочного графика и рекомендуется определение концентрации свободного ПСА в контрольной сыворотке;
- запрещается возвращать избыток конъюгата, ТМБ и стоп-реагента из ванночек во флаконы;
- из флаконов с открытыми крышками происходит испарение, которое может привести к получению некорректных результатов при повторном использовании реагентов. После окончания внесения реагентов в лунки планшета на каждой стадии анализа необходимо плотно закрывать крышки флаконов и помещать в рекомендуемые условия хранения.

10.5. Не допускается смешивание или одновременное использование реагентов из разных партий, за исключением ТМБ, стоп-реагента и концентрированного промывочного раствора, входящего в состав данного набора реагентов.

10.6. Запрещается использовать концентрированный промывочный раствор, стоп-реагент и ТМБ из наборов реагентов других фирм-производителей.

10.7. К работе с набором допускается только специально обученный персонал.

10.8. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции.

По вопросам качества набора «ОнкоИФА-свободный ПСА» следует обращаться в ООО «Компания Алкор Био» по адресу: 192148, г. Санкт-Петербург, Железнодорожный проспект, д.40, тел/факс: (812) 677-87-79.

Генеральный директор
ООО «Компания АлкорБио»



Швырев М.В.

Руководитель лаборатории разработки ИФА-систем
ООО «Компания АлкорБио»

Сусорова А.С.

СОГЛАСОВАНО:

Ректор
ГБОУ ВПО СЗГМУ им.И.И. Мечникова



Хурцилава О.Г.

СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

Приложение 1

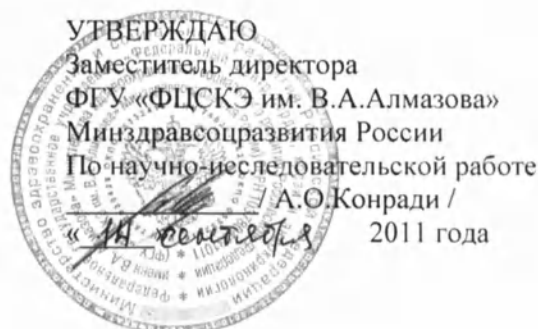
№	Стадия (операция)	Реагенты	Температура	Время	Примечания
1	Внесение реагентов	100 мкл буфера А в лунки для исследуемых образцов	КТ +18 ... +25°C	Внесение КП, КС и исследуемых образцов не более 15'	В лунки для определения ОП ТМБ ничего не вносить
2		50 мкл КП и КС			
3		50 мкл исследуемых образцов			
4	Инкубация №1	—	+37°C	60'	Термостатируемый шейкер, 500 – 800 об/мин
5	Промывка	300 мкл в лунку 1*промывочного раствора (5 раз)			1*промывочный раствор = 14 мл буфера Р + 266 мл H ₂ O
6	Внесение конъюгата	120 мкл конъюгата			Конъюгат не вносить в лунки для определения ОП ТМБ
7	Инкубация №2	—	+37°C	60'	Термостатируемый шейкер, 500 – 800 об/мин
8	Промывка	300 мкл в лунку 1*промывочного раствора (5 раз)			1*промывочный раствор = 14 мл буфера Р + 266 мл H ₂ O
9	Внесение хромогена	100 мкл ТМБ			
10	Инкубация с ТМБ	—	КТ	15-30'	В темноте
11	Остановка ферментной реакции	100 мкл стоп-реагента			
12	Перемешивание		КТ	1 – 2'	шейкер
13	Регистрация результатов	—		В течение 20' после остановки ферментной реакции	Фотометр, 450 нм
14	Обработка результатов				Калькулятор и масштабная бумага/соответствующее ПО

Примечания: КП — калибровочная проба; КС — контрольная сыворотка;

Прошито, пронумеровано, скреплено
печатью 10 (десять) лист об

Генеральный директор
ООО «Компания Алкор Био»
М.В. Швырев





**Акт
проведения клинических испытаний**

**Набора реагентов для количественного иммуноферментного определения свободного
простат-специфического антигена в сыворотке крови человека
(«ОнкоИФА-свободный ПСА»)**

Цель испытаний - оценка медицинских и эксплуатационных качеств изделия с целью определения возможности его использования в практическом здравоохранении и научных исследованиях на территории Российской Федерации.

Место и сроки проведения: медицинские испытания проводились в ФГУ «Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии имени В.А.Алмазова» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации с « 31 » августа по « 14 » сентября 2011 г.

Краткая характеристика изделия: Набор реагентов «ОнкоИФА-свободный ПСА» предназначен для количественного определения свободной фракции простат-специфического антигена (свободного ПСА) в сыворотке крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

В наборе «ОнкоИФА-свободный ПСА» использован «сэндвич»-вариант твердофазного иммуноферментного анализа. Для реализации этого варианта использованы два моноклональных антитела с различной эпитопной специфичностью к ПСА. Одно из них иммобилизовано на твердой фазе (внутренняя поверхность лунок), второе конъюгировано с пероксидазой хрена. В лунках, при добавлении исследуемого образца и аналитического буфера, во время первой инкубации происходит связывание свободного ПСА с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок моноклональными антителами, специфичными к уникальному эпитопу на молекуле свободного ПСА. Во время второй инкубации конъюгат моноклональных антител к ПСА с пероксидазой связывается со свободным ПСА, иммобилизованным в ходе первой инкубации.

Несвязавшиеся компоненты удаляются промывкой. Количество связавшегося конъюгата прямо пропорционально концентрации свободного ПСА в исследуемом образце.

Во время инкубации с раствором ТМБ происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски прямо пропорциональна концентрации свободного ПСА в анализируемых пробах. После измерения оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочного графика рассчитывается концентрация свободного ПСА в исследуемых образцах.

Состав набора:

- комплект из двенадцати восьмилуночных стрипов в рамке с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок моноклональными антителами к ПСА, маркирован «Стрипы с моноклональными антителами к свободному ПСА» — 1 упаковка;
- калибровочные пробы (КП), содержащие известные количества свободного ПСА. Флаконы маркированы «Калибровочная проба №1», «Калибровочная проба №2», «Калибровочная проба №3», «Калибровочная проба №4», «Калибровочная проба №5», «Калибровочная проба №6»; точные значения концентраций свободного ПСА в калибровочных пробах указаны на этикетках флаконов, ориентировочные - 0; 0,2; 0,5; 2; 5; 10 нг/мл - 6 флаконов (лиофилизированные препараты или жидкости по 0,5 мл);
- аналитический водно-солевой раствор, маркирован «Буфер А» — 1 флакон (14 мл);
- конъюгат анти-ПСА-пероксидаза, маркирован «Конъюгат Е» — 1 флакон (14 мл);
- концентрированный водно-солевой раствор для промывки лунок, маркирован «Буфер Р» — 2 флакона (по 14 мл);
- раствор тетраметилбензидина, маркирован «Раствор ТМБ» — 1 флакон (14 мл);
- стоп-реагент (1 Н соляная кислота), маркирован «Стоп-реагент» — 1 флакон (14 мл);
- контрольная сыворотка с известным содержанием свободного ПСА, маркирована «Контрольная сыворотка» — 1 флакон (лиофилизированный препарат или жидкость 0,5 мл);
- прозрачный пластиковый пакет с замком (при упаковке стрипов в пакет из 2-слойного полиэтилена).

Оборудование, необходимое для проведения анализа

- термостатируемый шейкер (+37°C, скорость встряхивания 500-800 об/мин);
- дозаторы 1-канальные и 8-канальные, с переменным объемом;
- автоматический вошер для промывки планшетов;
- спектрофотометр планшетный (длина волны 450 нм).

Метод проведения анализа

Испытания проведены в сравнении с референтной тест-системой «Набор для определения свободного ПСА в сыворотке крови (Elecsys)» (Elecsys[®] free PSA), кат. № 03289788190 производства «Roche Diagnostics GmbH».

Анализ проводили согласно инструкциям по применению фирм-изготовителей наборов «Elecsys[®] free PSA» и «ОнкоИФА-свободный ПСА». Измерение свободного ПСА в пробах проводилось параллельно на двух тест-системах. Оценка результатов количественного определения свободного ПСА проводилась на 100 образцах сывороток крови здоровых мужчин и мужчин, страдающих различными урологическими заболеваниями.

При анализе полученных данных оценивали:

- коэффициент корреляции между результатами измерений концентрации свободного ПСА наборами «ОнкоИФА-свободный ПСА» и «Elecsys[®] free PSA».

Критерии достоверности результатов анализа, проведенного с помощью набора «ОнкоИФА-свободный ПСА»

- ОП калибровочной пробы №6 (B_6) - не менее 1,5 ед.опт.плотн.;
- соотношение ОП калибровочных проб №1 - №6 – $B_1 < B_2 < B_3 < B_4 < B_5 < B_6$;
- отношение $B_2/B_6 \times 100\%$ - 1,0–4,0%;
- отношение $B_5/B_6 \times 100\%$ - 40-65%;
- концентрация свободного ПСА в контрольной сыворотке – 0.45-0.68 нг/мл.

Данные, полученные в течение испытания тест-системы «ОнкоИФА-свободный ПСА» производства ООО «Компания Алкор Био», соответствуют критериям достоверности (Таблица 1):

Таблица 1

	ОП пробы B_6 , ед.опт.плотн.	Соотношение ОП калибровочных проб №1 - №6	Отношение $B_2/B_6 \times 100\%$, %	Отношение $B_5/B_6 \times 100\%$, %	концентрация свободного ПСА в контрольной сыворотке, нг/мл
Норма	не менее 1,5	$B_1 < B_2 < B_3$ $< B_4 < B_5 < B_6$	1,0-4,0	40-65	0.45-0.68
Постановка 1	1.802	0.003 < 0.035 < 0.087 < 0.300 < 0.915 < 1.802	1.90	50.8	0.52
Постановка 2	1.852	0.003 < 0.038 < 0.090 < 0.352 < 0.947 < 1.852	2.05	51.1	0.53
Постановка 3	1.746	0.000 < 0.027 < 0.078 < 0.366 < 0.898 < 1.746	1.5	51.4	0.54
Постановка 4	1.760	0.000 < 0.025 < 0.075 < 0.347 < 0.901 < 1.760	1.4	51.2	0.53
Постановка 5	1.861	0.000 < 0.030 < 0.070 < 0.343 < 0.953 < 1.861	1.6	51.2	0.57
Постановка 6	1.845	0.000 < 0.030 < 0.071 < 0.338 < 0.900 < 1.845	1.6	48.8	0.55