

"УТВЕРЖДАЮ"

Генеральный директор

ЗАО "ЭКОлаб"



В.Ю.Борисов

2021 г.

ИНСТРУКЦИЯ по применению набора реагентов

«Тест- система иммуноферментная для количественного определения общего простатического специфического антигена (ПСА)» "ИФА-общий ПСА"

Регистрационное удостоверение №РЗН 2015/2753 от 01.02.2018г.

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «Тест-система иммуноферментная для количественного определения общего простатического специфического антигена (ПСА)» "ИФА-общий ПСА" предназначен для количественного определения общего простатического специфического антигена (ПСА) в сыворотке крови человека с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) на твердофазном носителе.

Функциональное назначение: диагностика заболеваний предстательной железы.

Применение изделия не имеет популяционных и демографических ограничений.

Для однократного применения набора по назначению.

Для клинической лабораторной диагностики *in vitro*.

Показания и противопоказания к применению изделия

Измерение концентрации ПСА в сыворотке крови в динамике используется в мониторинге эффективности хирургического или иного лечения, для раннего обнаружения рецидива опухоли после радикальной простатэктомии или лучевой терапии, а также при скрининге в группах риска.

Противопоказаний не существует.

Потенциальные потребители изделия

Лабораторные подразделения лечебно-профилактических учреждений.

Профессиональный уровень потенциальных пользователей

Врач клинической лабораторной диагностики, медицинский лабораторный техник.

Описание целевого анализа, сведения о его научной обоснованности.

Простатический специфический антиген является полипептидом, состоящим из 237 остатков аминокислот, имеет несколько дисульфидных мостиков. Белок гликозилирован и вырабатывается как нормальными, так и опухолевыми клетками выводных протоков желёз простаты. В норме обнаруживается в сыворотке крови в низких концентрациях. Содержание ПСА в сыворотке крови значительно повышается при онкологических заболеваниях предстательной железы. Существует корреляция между содержанием ПСА в сыворотке крови и степенью злокачественности и распространения опухолевых процессов.

СОСТАВ И КОМПЛЕКТАЦИЯ НАБОРА

Иммуносорбент	моноклональные антитела к ПСА, сорбированные в лунках стрипов 96-луночного разборного полистиролового планшета для иммунологических реакций с плоским дном	12 стрипов
	<i>допускается раздельная упаковка стрипов (по 1-4 стрипа в пакете)</i>	
Калибровочные пробы (КП₁₋₆; КП₄₀)	буферные растворы, содержащие известную концентрацию ПСА. В КП ₁ – 0 нг/мл, в КП ₂ – 1,56 нг/мл; в КП ₃ – 3,1 нг/мл; в КП ₄ – 6,25 нг/мл; в КП ₅ – 12,5 нг/мл; в КП ₆ – 25 нг/мл; КП ₄₀ – 40 нг/мл (значения концентраций указываются на этикетках флаконов); прозрачные жидкости красного цвета	(КП ₁) – 1 фл. (10 мл) (КП ₂₋₆ ; КП ₄₀) – 6 фл. (по 0,5 мл)
Контрольный положительный образец (К⁺)	сыворотка крови человека, содержащая ПСА в известном диапазоне концентраций (указывается на этикетке флакона для каждой серии набора); прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость красного цвета	1 фл. (0,5 мл)
Конъюгат	мышинные моноклональные антитела к ПСА, меченные пероксидазой; прозрачная жидкость синего цвета	1 фл. (15,0 мл)
Раствор индикаторный (РИ)	раствор, содержащий тетраметилбензидин и перекись водорода; прозрачная бесцветная жидкость	1 фл. (15,0 мл)
Стоп-реагент	прозрачная бесцветная жидкость	1 фл. (15,0 мл)
Одноразовые наконечники для автоматических пипеток		16 шт.

Примечания.

1. Набор включает все реагенты, необходимые для постановки ИФА, кроме очищенной (дистиллированной или деионизированной) воды.

2. Все реагенты готовы к использованию.

3. В составе изделия отсутствуют материалы, вступающие в непосредственный или опосредованный контакт с организмом пациента и персонала, использующего изделие, при выполнении требований эксплуатационной документации (инструкции по применению).

4. В составе изделия отсутствуют лекарственные средства и фармацевтические субстанции.

Набор укомплектован принадлежностями:

- вспомогательными пластиковыми емкостями (4 шт.),
- клейкой пленкой для планшетов (4 шт.).

Компоненты набора упакованы в коробку, в коробку вложена инструкция по применению и бланк калибровочного графика.

ОСНОВНЫЕ ПОТРЕБИТЕЛЬСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Базовый вариант комплектации позволяет одномоментное дублированное исследование 48 образцов, включая калибровочные и контрольные (на каждый образец используется 2 лунки, при этом на калибровочные и контрольные образцы используется 14 лунок). Предусмотрена возможность проведения раздельных исследований с использованием необходимого количества стрипов:

Число стрипов	2	4	6	8	10	12
Число иссл. обр.	1	2-9	10-17	18-25	26-33	34-41

Методы стерилизации изделия

Изделие не требует стерилизации.

Программное обеспечение работы изделия

Отсутствует.

Техническое обслуживание и ремонт изделия

Изделие не требует технического обслуживания и не подлежит ремонту.

ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

Используется «сэндвич» вариант ИФА с двумя видами моноклональных антител, полученных к разным эпитопам ПСА. Моноклональные антитела к одному эпитопу антигена нанесены на поверхность лунок иммуносорбента, антитела к другому эпитопу связаны с ферментом (пероксидазой) и входят в состав конъюгата. При внесении в лунки иммуносорбента исследуемого образца сыворотки и конъюгата при наличии в образце ПСА происходит образование комплекса /антитело иммуносорбента/-ПСА/-антитело конъюгата/. Его наличие выявляется по цветной реакции с ТМБ, интенсивность окрашивания реакционной смеси пропорциональна концентрации ПСА в образце.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Чувствительность (минимальная определяемая концентрация ПСА) – не более 0,1 нг/мл.

Коэффициент вариации –8 %.

Процент открытия составляет 90-110%

Линейность: зависимость концентрации ПСА в образцах сыворотки крови при разведении их калибровочной пробой №1 имеет линейный характер в диапазоне от 1,56 нг/мл до 25 нг/мл; отклонение от линейности в указанном диапазоне составляет 90-110%

Интерсепт, в пределах
20%: 3,2-5,5
50%: 9,5 -13,5
80%: 17,5 – 21,5

"Hook-эффект" (обратно пропорциональная зависимость ОП от концентрации аналита, возникающая при высоких его концентрациях) не наблюдается до концентрации ПСА 1000 нг/мл.

При исследовании образцов с содержанием гемоглобина 200 г/л, триглицеридов 5,0 мг/дл; билирубина –7,0 мг/дл; интерференция не наблюдалась.

Коэффициент корреляции результатов составил $\geq 0,95$ при постановке испытуемого набора в ручном режиме и при автоматической постановке.

ИССЛЕДУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Сыворотка крови человека объемом не менее 25 мкл.

Сбор образцов крови должен производиться в соответствии с надлежащей практикой методом венепункции (ГОСТ Р 53079.4-2008 «Обеспечение качества клинических лабораторных исследований»).

Образцы сыворотки до исследования хранить при температуре от 2 до 8 °С. При необходимости хранения образцов более 7 дней рекомендуется разделить их на аликвоты и хранить при температуре от минус 20 до минус 70 °С. Размороженные образцы перед исследованием нужно тщательно перемешать. При работе с размороженными образцами следует учитывать, что каждый цикл оттаивания-замораживания, снижает качество

исследуемого материала. С целью получения достоверных результатов исследования рекомендуется использовать только однократное замораживание-оттаивание образцов.

Не допускается использование для исследования образцов с повышенным содержанием липидов и (или) с признаками гемолиза, и (или) с видимым микробным простом.

Образцы, содержащие осадок, перед анализом отцентрифугировать в течение 10-15 мин при 2500-3000 об/мин.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Потенциальный риск применения набора – класс 26 (Приказ МЗ РФ №4н от 6 июня 2012 г.).

Меры предосторожности при работе с набором – соблюдение правил "Инструкции по мерам профилактики распространения инфекционных заболеваний при работе в клиничко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений" (Утв. Минздравом СССР 17 января 1991 г.), ГОСТ Р 52905–2007 (ИСО 15190:2003).

Набор биологически безопасен, однако с исследуемыми образцами необходимо обращаться как с потенциально инфицированным материалом.

Контрольный положительный образец (K⁺) содержит проклин в концентрации 0,1 %. Данная концентрация является безопасной.

Стоп-реагент при попадании на незащищенную кожу и слизистые может вызывать химические ожоги. В случае попадания на кожу – немедленно промойте пораженный участок водой.

Набор реагентов, в соответствии с СанПиН 2.1.3684-21 "Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий" относится к классу А - отходы, не имеющие контакта с биологическими жидкостями пациентов, инфекционными больными и классу Б (эпидемиологически опасные отходы) – инфицированные и потенциально инфицированные отходы, материалы и инструменты, предметы, загрязненные кровью и/или другими биологическими жидкостями.

Утилизацию или уничтожение, дезинфекцию наборов реагентов следует проводить в соответствии с СанПиН 2.1.3684-21 "Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий" и МУ-287-113 "Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения".

СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ

Оборудование и материалы (для "ручной" постановки)

Дозаторы пипеточные (пипетки полуавтоматические одноканальные на 25 мкл и 100 мкл и многоканальные на 100 мкл) для внесения реагентов в лунки планшета с погрешностью дозирования не более 5 % с наконечниками полипропиленовыми одноразовыми.

Ручные, или автоматические промыватели, или восьми- и двенадцатиканальные пипеточные дозаторы для промывания лунок планшета.

Термостатируемый шейкер орбитального типа, позволяющий проводить встряхивание при 400-800 об/мин и температуре 37 ± 1 °С.

Спектрофотометр вертикального сканирования для измерения оптической плотности в лунках планшета при 450 нм и/или в двухволновом режиме при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620-650 нм.

Центрифуга лабораторная на 2,5-3,0 тыс. об/мин, холодильник бытовой, фильтровальная бумага.

Вода очищенная (ФС.2.2.0020.15).

70 %-ный раствор спирта этилового и 6 %-ный раствор перекиси водорода (дез.растворы) или растворы иных дезинфектантов, разрешенных к применению СП 1.32322-08, кроме хлорсодержащих.

Анализатор иммуноферментный автоматический. «Еволис» (Evolis).

ПРОВЕДЕНИЕ ИФА ("ручная" постановка)

Перед работой извлечь набор из холодильника, вскрыть упаковку и выдержать все реагенты перед проведением анализа не менее 30 мин при температуре от 18 до 25 °С (пакет с иммуносорбентом выдерживать при указанной температуре **до вскрытия!**). Жидкие реагенты тщательно перемешать. Извлечь из пакета планшет, вскрыв выше замка «zip-lock», и установить на рамку необходимое для проведения ИФА количество стрипов. Неиспользованные стрипы немедленно поместить обратно в пакет с влагопоглотителем, удалить из него воздух, плотно закрыть «zip-lock» и поместить в холодильник.

Сохранность иммуносорбента между операциями 15 мин.

Исследуемые образцы с концентрацией ПСА, выходящей за пределы калибровки, предварительно развести КП₁ таким образом, чтобы измеряемая концентрация ПСА находилась в пределах от 1,56 нг/мл до 25 нг/мл)

Внимание! Соблюдение указанных ниже температуры и времени инкубации планшетов на каждой стадии постановки крайне важно для получения достоверных результатов.

Рекомендуемая схема внесения образцов при использовании 12 стрипов

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	КП1	КП1	ИО2	ИО2	ИО10	ИО10	ИО18	ИО18	ИО26	ИО26	ИО34	ИО34
B	КП2	КП2	ИО3	ИО3	ИО11	ИО11	ИО19	ИО19	ИО27	ИО27	ИО35	ИО35
C	КП3	КП3	ИО4	ИО4	ИО12	ИО12	ИО20	ИО20	ИО28	ИО28	ИО36	ИО36
D	КП4	КП4	ИО5	ИО5	ИО13	ИО13	ИО21	ИО21	ИО29	ИО29	ИО37	ИО37
E	КП5	КП5	ИО6	ИО6	ИО14	ИО14	ИО22	ИО22	ИО30	ИО30	ИО38	ИО38
F	КП6	КП6	ИО7	ИО7	ИО15	ИО15	ИО23	ИО23	ИО31	ИО31	ИО39	ИО39
G	К+	К+	ИО8	ИО8	ИО16	ИО16	ИО24	ИО24	ИО32	ИО32	ИО40	ИО40
H	ИО1	ИО1	ИО9	ИО9	ИО17	ИО17	ИО25	ИО25	ИО33	ИО33	ИО41	ИО41

При необходимости расширения диапазона калибровки дополнительно используется калибровочная проба КП₄₀. В таком случае КП₄₀ вносят в лунки G1, G2, К⁺ вносят в лунки H1, H2.

1. Внести в лунки планшета (как можно ближе ко дну каждой лунки) по 25 мкл контрольных проб и исследуемых образцов в соответствии со схемой их внесения и добавить в каждую лунку по 100 мкл конъюгата.

Внимание! Максимальная воспроизводимость результатов обеспечивается соблюдением одного и того же порядка внесения реагентов. Общее время внесения образцов на должно превышать 15 мин. В противном случае калибраторы следует вносить в отведенные для них лунки после пипетирования первой половины проб. Если для анализа используется больше одного планшета, калибровку следует выполнять для каждого планшета.

2. Инкубировать планшет при температуре 37°C на шейкере при 500 об/мин в течение 1 ч.

3. По окончании инкубации удалить содержимое лунок в контейнер для сбора жидких отходов и промыть лунки 5 раз водой очищенной, заполняя лунки до краев и выдерживая их с водой каждый раз по 30 с.

4. Внести во все лунки по 100 мкл РИ и выдержать стрипы 15 - 20 мин в защищенном от света месте при температуре от 18 до 25°C или 15 мин в термошейкере при температуре 37°C.

5. Добавить по 100 мкл стоп-реагента в каждую лунку, соблюдая последовательность и скорость внесения в них РИ и не более чем через 15 мин приступить к учету результатов.

Регистрация и учет результатов

Результаты ИФА регистрировать спектрофотометрически, измеряя оптическую плотность (ОП) при двух длинах волн – 450 нм и 620-650 нм. При отсутствии референс-фильтра на 620-650 нм оптическую плотность (ОП) измерять при длине волны 450 нм, а выведение спектрофотометра на нулевой уровень ("бланк") осуществлять по воздуху.

Результаты ИФА учитывать при следующих условиях:

ОП_{450нм} КП₁ – менее 0,150.

ОП_{450нм} КП₆ – более 0,700.

В противном случае исследование необходимо повторить.

Построить калибровочную кривую по точкам, ординатами которых являются полученные в ИФА значения ОП КП, а абсциссами – концентрации ПСА в этих пробах, указанные на этикетках флаконов, и определить по данной кривой концентрации ПСА в К⁺ и исследованных образцах (для разведенных образцов полученную по графику концентрацию ПСА необходимо умножить на степень разведения образца).

При наличии соответствующих компьютерных программ расчета концентрации ПСА по результатам ИФА использовать эти программы. Для построения калибровочной кривой рекомендуется использовать метод линейной регрессии (при использовании калибратора КП₄₀ рекомендуется использовать метод кусочно-линейной аппроксимации).

Полученные значения концентраций ПСА в исследуемых образцах учитывать только при условии попадания полученного значения концентрации ПСА в К⁺ в диапазон концентраций на этикетке флакона.

Интерпретация результатов

Содержание ПСА в норме **0,2-4,0 нг/мл.**

Допустимые нормальные значения ПСА зависят от возраста:

мужчины от 40 до 49 лет - 2,5 нг/мл;

мужчины от 50 до 59 лет - 3,5 нг/мл;

мужчины от 60 до 69 лет - 4,5 нг/мл;

мужчины от 70 до 79 лет - 6,5 нг/мл.

Более высокие концентрации указывают на возможность наличия доброкачественной гиперплазии простаты или рака простаты.

Примечание: Каждой лаборатории рекомендуется самостоятельно определять диапазон нормальных концентраций ПСА с учетом используемого оборудования, способа взятия крови и методики анализа.

ПОСТАНОВКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИФА-АНАЛИЗАТОРОВ

Подготовить прибор в соответствии с инструкцией по эксплуатации, ввести программу анализа, соответствующую используемому набору, и провести анализ.

СРОК ГОДНОСТИ

Срок годности набора – 18 месяцев. Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит.

ХРАНЕНИЕ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ

Хранение

Замораживание не допускается.

Хранение наборов должно осуществляться в холодильных камерах или холодильниках, обеспечивающих регламентируемый температурный режим, в упаковке предприятия-изготовителя при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности.

После вскрытия упаковок неиспользованные реагенты допускается хранить в плотно закрытых упаковках в холодильных камерах или холодильниках, обеспечивающих регламентируемый температурный режим, при температуре от 2 до 8 °С до 6 мес.

Транспортирование

Транспортирование наборов – при температуре от 2 до 8°С транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида. Допускается транспортирование при температуре от 9 до 25°С в течение 15 суток.

УСЛОВИЯ ОТПУСКА

Для учреждений здравоохранения.

ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

Набор реагентов «Тест-система иммуноферментная для количественного определения общего простатического специфического антигена (ПСА)» "ИФА-общий ПСА" соответствует ТУ 9398-186-70423725-2014 с изм. №,1 № 2 национальным стандартам РФ и нормативным документам в части требований безопасности и эффективности.

По вопросам, касающимся качества и обращения набора реагентов "ИФА-общий ПСА" следует обращаться по адресу: 142530 Московская обл., г. Электрогорск, ул. Буденного, д. 1-1а. Закрытое Акционерное Общество «ЭКОлаб» (ЗАО "ЭКОлаб"); 8(49643) 3-23-11; 3-30-93; тел./ факс (49643)3-30-85; тел. 8-800-333-33-47, ekolab-sekretar@mail.ru.

При предъявлении рекламации по поводу несоответствия физических и специфических характеристик набора реагентов заявленным для проведения объективного расследования производителем причин несоответствия потребитель должен предоставить:

1. набор реагентов той серии, на которую предъявляется рекламация;
2. все спорные исследуемые образцы пациентов;
3. протоколы анализа с указанием наименования, серии и сроков годности использованного набора реагентов.
4. протоколы исследования с использованием других методов/наборов реагентов с указанием серии, сроков годности, производителя примененных наборов реагентов.

Директор ЗАО "ЭКОлаб" по научной работе

С.Г. Марданлы

"СОГЛАСОВАНО"

Генеральный директор ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»

П.К. Варнавичус

« 01 » 09 2021г.

**КРАТКАЯ СХЕМА ПОСТАНОВКИ ИФА
(ИФА-общий ПСА)**

Использовать только после тщательного ознакомления с инструкцией!	
Внести	в соответствии со схемой постановки по 25 мкл КП ₁₋₆ , КП ₄₀ , К ⁺ , исследуемых образцов и по 100 мкл конъюгата
Инкубация	1 ч, 37 °С на шейкере при 500 об/мин
Промыть	5 раз водой очищенной
Внести	по 100 мкл РИ в каждую лунку
Инкубация	15-20 мин, 18-25°С в защищенном от света месте или 15 мин в термошейкере при температуре 37°С
Внести	по 100 мкл стоп-реагента в каждую лунку
Измерить	ОП при 450 нм (референс 620-650 нм), «бланк» - по воздуху

ПРОШИТО
В КОЛИЧЕСТВЕ 8 ЛИСТОВ

«01» 09 2021 год

Ген. Директор
ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»
Варнавичус П.К.



Прошнуровано, пронумеровано
и скреплено печатью

лист 06
Ген. Директор ЗАО "ЭКОлаб"
Борисов В.Ю.
" " 09 2021 г.



общ. ПСА

ОнкоИФА-общий ПСА

В-12.2015-02

«УТВЕРЖДЕНА»

Приказом Росздравнадзора

от «18» апреля 2012г. № 1820-Пр/12

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

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «ОнкоИФА-общий ПСА» предназначен для количественного определения общего простат-специфического антигена (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-общий 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-общий 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 конъюгата анти-ПСА-пероксидаза, во время инкубации одновременно происходит иммобилизация ПСА, содержащегося в исследуемом образце, и связывание образовавшегося комплекса с конъюгатом.

Несвязавшиеся компоненты удаляются промывкой. Количество связавшегося конъюгата прямо пропорционально количеству 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 ПСА в анализируемых пробах. После измерения оптической плотности раствора в

лунках на основании калибровочного графика рассчитывается концентрация 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 ПСА» — 1 упаковка;
- калибровочные пробы (КП), содержащие известные количества ПСА. Флаконы маркированы «Калибровочная проба №1», «Калибровочная проба №2», «Калибровочная проба №3», «Калибровочная проба №4», «Калибровочная проба №5», «Калибровочная проба №6»; точные значения концентраций ПСА в калибровочных пробах указаны на этикетках флаконов, ориентировочные - 0; 1; 2,5; 5; 10; 30 нг/мл - 6 флаконов (лиофилизированные препараты или жидкости по 0,5 мл);
- конъюгат анти-ПСА-пероксидаза, маркирован «Конъюгат Е» — 1 флакон (14 мл);
- водно-солевой раствор для разведения образцов сыворотки крови, маркирован «Буфер Д» — 1 флакон (3,0 мл);
- концентрированный водно-солевой раствор для промывки лунок, маркирован «Буфер Р» — 1 флакон (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 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. Оба моноклональных антитела, использованные в наборе, демонстрируют эквивалентное взаимодействие, как со свободным ПСА, так и с ПСА-АХТ комплексом.

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

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

3.4. Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» ПСА — проверка соответствия значения определяемой концентрации 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 ПСА в сыворотке крови человека не превышает 0,2 нг/мл.

3.6. Хук-эффект высоких концентраций. В наборах реагентов, основанных на «сэндвич»-принципе анализа, при высоких концентрациях аналита зависимость величины оптической плотности от концентрации становится обратно пропорциональной (так называемый хук-эффект высоких концентраций). При использовании набора «ОнкоИФА-общий

ПСА» хук-эффект не обнаружен вплоть до концентрации ПСА 1200 нг/мл.

3.7. Диапазон ожидаемых значений. Диапазон значений концентраций ПСА до 4 нг/мл был определен как нормальный. Концентрация ПСА от 4 нг/мл до 10 нг/мл характерна для незлокачественных урологических заболеваний; выше — для злокачественных опухолей простаты.

Диапазон ожидаемых значений зависит от многих факторов: специфичности метода, особенностей исследуемой популяции, точности метода в конкретной лаборатории. По этой причине каждой лаборатории рекомендуется использовать предоставленные изготовителем значения только до тех пор, пока специалистами лаборатории не будут определены диапазоны ожидаемых значений, характерных 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 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 объемы 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 алиquotировать 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 ($+18...+25^{\circ}\text{C}$) 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 Д готов к использованию.

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.

7.1.9. Разведение исследуемых образцов сывороток крови. Если по предварительным данным или по результатам анализа (см. п. 9.3.) значения концентрации ПСА в исследуемых образцах выше КП №6, образцы следует последовательно развести буфером Д в 5 и в 25 раз:

Образец №1 (разведение в 5 раз):
120 мкл буфера Д + 30 мкл исследуемого образца.

Образец №2 (разведение в 25 раз):
120 мкл буфера Д + 30 мкл Образца №1.

При каждом разведении необходимо тщательное перемешивание.

Разводить образцы сыворотки крови следует только в день проведения анализа.

Если после измерения оптическая плотность Образца №2 остается выше ОП КП №6, то следует продолжить разведение и приготовить следующие образцы:

Образец №3 (разведение в 50 раз):

50 мкл буфера Д + 50 мкл Образца №2

Образец №4 (разведение в 100 раз):

50 мкл буфера Д + 50 мкл Образца №3

Примечание: при разведении образцов необходимо ставить в анализ оба разведенных образца (в 5 и 25 раз или в 50 и 100 раз, соответственно).

Допускается использовать другие разведения. Если концентрация в образце определяется по разведениям, то сначала необходимо выбрать те образцы, для которых полученное значение ОП попадает в диапазон ОП КП №2 - ОП КП №6. Затем умножить концентрацию выбранного образца, полученную в анализе, на фактор разведения. Если разведений, отвечающих этому условию, несколько, необходимо взять среднее арифметическое полученных после умножения на соответствующие факторы разведения концентраций.

На странице 22 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 конъюгата.

7.2.3. Внести в соответствующие лунки по 20 мкл калибровочных проб и контрольной сыворотки, в оставшиеся лунки — по 20 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°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 добавлять 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 по 100 мкл раствора ТМБ. Инкубировать стрипы в темноте при комнатной температуре (+18...25°C) в течение 15–30 минут в зависимости от степени развития окраски.

7.2.7. 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.

7.2.8. Если невозможно измерить оптическую плотность в лунках планшета непосредственно после выполнения п. 7.2.7., 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 А1 и А2 из значений оптических плотностей всех остальных лунок.

Примечание: среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках А1 и А2 не должно превышать 0,09 ед.ОП.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Построить калибровочный график зависимости оптических плотностей от концентрации 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 А1 и А2, 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 А1 и А2.

9.2. Определить содержание ПСА в пробах по калибровочному графику. В случае дополнительного разведения образцов необходимо измеренную концентрацию ПСА умножить на фактор разведения.

9.3. Экстраполяция калибровочного графика для значений концентрации ПСА, превышающих номинал КП №6, не допускается. Для точного определения концентрации ПСА в

таких образцах необходимо выполнить их разведение в соответствии с п. 7.1.9.

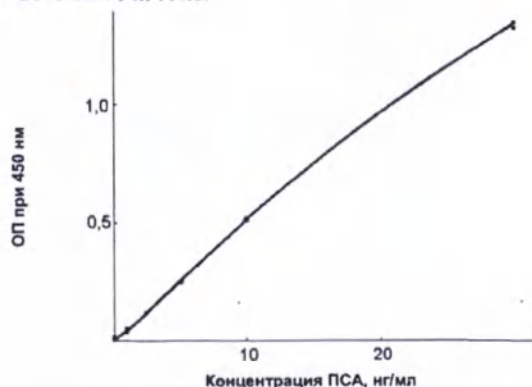


Рисунок 2. Типичный калибровочный график
Запрещается использовать для оценки реальных
экспериментальных данных!

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1. Набор «ОнкоИФА-общий 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 сначала в пакет с этикеткой, затем в пластиковый пакет с замком и герметично закрыть. Хранить в герметично закрытом пакете 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, буфер Д 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 Р и стоп-реагент после вскрытия флаконов хранить при температуре +2...8°C в течение всего срока годности.

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

- для каждого независимого эксперимента необходимо построение нового калибровочного графика и рекомендуется определение концентрации 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, входящих в состав данного набора реагентов.

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

10.7. Запрещается использовать промывочные растворы производства Алкор Био с буквенными обозначениями, отличными от указанного в инструкции к набору.

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

10.9. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции.

СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

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

Примечания:

- КП — калибровочная проба;
КС — контрольная сыворотка;
ОП — оптическая плотность;
КТ — комнатная температура (+18...25°C);
ПО — программное обеспечение.

По вопросам качества набора «ОнкоИФА-общий ПСА» следует обращаться по адресу: 192148, г. Санкт-Петербург, Железнодорожный пр., д. 40, Лит. А, тел/факс: (812) 677-87-79.

Прошнуровано, пронумеровано
и скреплено печатью

13 лист 06

Зам. Ген. директора ЗАО "ЭКОлаб"

Гашенко Т.Ю.

2021 г.

