

Код ОКП 939817

УТВЕРЖЕНА

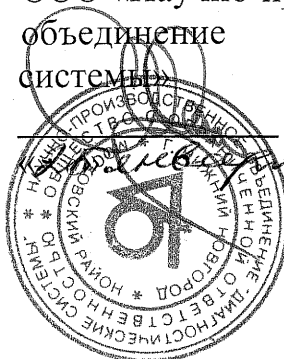
Приказом Росздравнадзора  
от 200 г.  
№

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор  
ООО «Научно-производственное  
объединение «Диагностические  
системы»

И. Е. Колосов

2008 г.



## ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов  
«ДС – ИФА – ПСА свободный»

Тест-система иммуноферментная для количественного определения  
свободного простата-специфического антигена

### 1. Назначение

1.1. Набор реагентов «ДС – ИФА – ПСА свободный» предназначен для количественного определения свободного простата-специфического антигена (ПСА) в сыворотке крови человека методом твёрдофазного иммуноферментного анализа (ИФА).

1.2. ПСА - гликопротеин с молекулярной массой 33 кДА, относящийся к калликреиновому семейству сериновых протеаз. ПСА продуцируется эпителиальными клетками простаты, присутствует в семенной жидкости и в более низких концентрациях в сыворотке крови и моче. ПСА отвечает за разжижение семенной жидкости после эякуляции. Основная форма содержания ПСА в сыворотке крови – комплексы с ингибиторами протеаз, доля свободного ПСА невелика.

Под общим ПСА, определяемым иммунологическими методами, подразумевается суммарное количество ПСА, связанного с альфа-1-антихимотрипсином, и свободной фракции ПСА. Повышение уровня общего ПСА выше 4 нг/мл свидетельствует о патологиях предстательной железы:

доброкачественной гиперплазии и аденокарциноме простаты. Определение соотношения ПСА свободного к ПСА общему служит для разграничения злокачественных и доброкачественных новообразований простаты. Уровень ПСА свободного существенно выше при гиперплазии предстательной железы, чем при раке простаты. Значение соотношения ПСА свободного к ПСА общему  $< 10\%$  с высокой долей вероятности свидетельствует о злокачественной опухоли, при значении  $> 25\%$  рак простаты маловероятен. Определение уровня ПСА является важнейшим средством для контроля эффективности проведенной терапии.

1.3. Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах в 48 пробах (40 неизвестных проб, одна проба контрольной сыворотки, шесть калибровочных проб и одна проба для определения оптической плотности ТМБ-Субстратного раствора) при одновременном использовании всех стрипов планшета.

В случае дробного применения набора: необходимо обязательное использование всех стандартных калибровочных проб при каждой постановке; набор может быть использован в течение месяца после вскрытия реагентов набора.

## **2. Характеристика набора**

### **2.1. Принцип действия.**

В наборе «ДС-ИФА-ПСАсвободный» применен «сэндвич»-вариант твердофазного ИФА. Для реализации его использованы два моноклона антител с разной специфичностью к двум доменам молекулы ПСА: первые (немеченые) иммобилизованы на твердой фазе, вторые (меченные пероксидазой хрена) входят в состав конъюгата. В лунках планшета во время первой инкубации происходит связывание содержащегося в исследуемом образце свободного ПСА с антителами, иммобилизованными на твердой фазе. Во время второй инкубации антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена, связываются со свободным ПСА, иммобилизованным в

ходе первой инкубации. Количество связавшегося конъюгата прямо пропорционально количеству свободного ПСА в образце сыворотки крови.

Во время инкубации с ТМБ-Субстратным раствором происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски прямо пропорциональна количеству свободного ПСА в образце сыворотки крови. После измерения оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочного графика рассчитывается концентрация свободного ПСА в исследуемых образцах.

## 2.2. Состав набора:

- иммуносорбент – планшет полистироловый разборный (12 стрипов по 8 лунок каждый) с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок моноклональными антителами к свободному ПСА, маркирован «Иммуносорбент» — 1 шт;

- конъюгат – моноклональные антитела к свободному ПСА, конъюгированные с пероксидазой хрена; прозрачная или опалесцирующая розового цвета жидкость; маркирован «Конъюгат» — 1 фл. (12,0 мл);

- калибровочные пробы, содержащие известные концентрации свободного ПСА, аттестованные в соответствии с Первым международным стандартом ВОЗ 96/668; прозрачные или опалесцирующие желтого цвета жидкости; калибровочный материал может отличаться от заявленного по значениям концентрации свободного ПСА (нг/мл), значения концентраций свободного ПСА указаны на этикетках флаконов и в аналитическом паспорте качества; маркированы:

«Калибратор 0» (0 нг/мл) - 1 фл. (2,0 мл);

«Калибратор 1» (0,25 нг/мл) - 1 фл. (0,5 мл);

«Калибратор 2» (0,5 нг/мл) - 1 фл. (0,5 мл);

«Калибратор 3» (1,0 нг/мл) - 1 фл. (0,5 мл);

«Калибратор 4» (2,5 нг/мл) - 1 фл. (0,5 мл);

«Калибратор 5» (5,0 нг/мл) - 1 фл. (0,5 мл).

- контрольная сыворотка с известным содержанием свободного ПСА; прозрачная или опалесцирующая желтого цвета жидкость; значение концентрации свободного ПСА в сыворотке указано на этикетке флакона и в аналитическом паспорте качества, маркирована «Контрольная сыворотка» - 1 фл. (0,5 мл);

- блок-раствор для рабочего разведения сывороток и калибровочных проб; прозрачная или опалесцирующая синего цвета жидкость; маркирован «БР» - 1 фл. (6,0 мл);

- промывочный раствор, концентрат; прозрачная или слегка опалесцирующая, бесцветная или светло-жёлтого цвета жидкость, допустимо образование осадка, полностью растворяющегося при температуре от 35 до 39 °С и встряхивании; маркирован «ПР (концентрат x 25)» — 1 фл. (50,0 мл);

- ТМБ-Субстратный раствор, прозрачная бесцветная жидкость; маркирован «ТМБ-Субстратный раствор»— 1 фл. (12,0 мл);

- серная кислота в концентрации 0,2 моль/л; прозрачная бесцветная жидкость; маркирована «Стоп-реагент/0,2М» - 1 фл. (15,0 мл).

- инструкция по применению – 1 шт.

- бланк для построения калибровочной кривой – 1 шт.

Дополнительно в комплект поставки могут быть включены:

-крышка к полистироловым 96-луночным планшетами;

-одноразовые наконечники;

-пластиковая ванночка для жидких реагентов;

-пластиковая скрепка для закрывания пакета с иммуносорбентом.

### **3. Аналитические и диагностические характеристики набора**

3.1. Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая концентрация свободного ПСА в сыворотке крови человека составляет 0,1 нг/мл.

3.2. Специфичность. Используемые в наборе моноклональные антитела взаимодействуют со свободной фракцией ПСА и не взаимодействуют с ПСА-

АХТ комплексом. Не обнаружено перекрестной реакции моноклональных антител к калликреину 2 человека.

3.3. Коэффициент вариации результатов определения свободного ПСА в одном и том же образце с использованием набора не превышает 8%.

3.4. Линейность. Зависимость концентрации сводного ПСА имеет линейный характер в диапазоне концентраций калибровочных проб №1–№5. Значение «линейности» должно находиться в пределах от 90 до 110%.

3.5. Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» свободного ПСА – соответствие измеренной концентрации свободного ПСА предписанной в пробе, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы №1. Процент открытия составляет от 90 до 110%.

3.6. Клиническая проверка. Концентрацию свободного ПСА измеряли в образцах сыворотки крови, взятой с 9 до 11 ч у 156 мужчин в возрасте от 21 до 50 лет. Средняя концентрация свободного ПСА составила  $0,161 \pm 0,160$  нг/мл.

3.7. Рекомендуется в каждой лаборатории при использовании набора уточнить значения концентраций свободного ПСА, соответствующие нормальным значениям для конкретной территории.

#### **4. Меры предосторожности**

4.1. Потенциальный риск применения набора — класс 2а.

5.2. Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

4.3. При работе с набором следует соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

4.4. Стоп-реагент представляет собой 0,2 М раствор серной кислоты. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае

попадания раствора 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. исследуемые образцы сывороток крови являются потенциально инфицированным материалом, в котором длительное время могут сохраняться возбудители ВИЧ, парентеральных вирусных гепатитов и других инфекционных заболеваний.

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, необходимые при работе с набором:**

- спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках планшета при длине волны 450 нм;
- термостатируемый шейкер, позволяющий производить встряхивание со скоростью от 500 до 800 об/мин при температуре от 18 до 24 °С;
- устройство для промывания планшетов (вошер);
- дозаторы пипеточные полуавтоматические одноканальные с изменяемым объемом отбора жидкостей: на 5–50 мкл; на 40–200 мкл; на 200–1000 мкл; на 1000–5000 мкл с наконечниками;
- дозатор пипеточный полуавтоматический восьмиканальный, позволяющий отбирать объемы жидкости до 300 мкл, с наконечниками;
- цилиндр мерный (200 мл, 500 мл);
- стакан стеклянный (500 мл);
- вода дистиллированная;
- бумага фильтровальная лабораторная;
- перчатки резиновые или пластиковые.

#### **6. Подготовка исследуемых образцов сывороток крови человека.**

Для исключения ложных результатов нельзя подвергать исследуемые образцы термоинактивированию, необходимо отбирать и хранить их в условиях, предотвращающих бактериальный рост. Каждый образец исследуемой сыворотки следует отбирать новым наконечником! Отобранные образцы хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 3-х суток. Более длительное хранение допустимо при температуре не выше минус 20 °С (образцы могут подвергаться замораживанию и оттаиванию не более 1 раза). Нельзя использовать образцы с бактериальным ростом, выраженным гемолизом и гиперлипидемией. Образцы сыворотки крови, содержащие агрегаты или осадок, необходимо осветлять центрифугированием при 1000-2000 об/мин в течение 15 мин при температуре от 4 до 8 °С.

## **7. Подготовка реагентов для анализа**

7.1. Нельзя использовать реагенты из наборов разных серий или смешивать их в процессе приготовления растворов, а также использовать реагенты по истечении срока годности!

Перед использованием все реагенты набора выдержать 30 мин при комнатной температуре (от 18 до 24 °С).

7.2. Иммуносорбент. **Внимание: во избежание конденсации влаги внутри лунок необходимо выдержать иммуносорбент при комнатной температуре (от 18 до 24 °С) в закрытом пакете не менее 30 минут.**

**Вскрыть фольгированный пакет, отступив 1,0 см от края пакета. Вынуть из пакета рамку и необходимое количество стрипов, вставить стрипы в рамку.**

7.3. ПР – рабочий промывочный раствор. Содержимое флакона с концентратом промывочного раствора тщательно перемешать. Для приготовления рабочего ПР необходимое количество концентрата промывочного раствора развести в 25 раз водой дистиллированной (согласно таблице № 1). Полученный раствор тщательно перемешать.

7.4. Конъюгат – готов к применению. Перед использованием отобрать необходимое количество в чистую ёмкость.

7.5 Калибровочные пробы - готовы к применению.

7.6. Контрольная сыворотка, готова к применению.

7.7. БР (блок-раствор) – готов к применению.

7.8. ТМБ-Субстратный раствор – готов к применению. Перед использованием отобрать необходимое количество в чистую ёмкость.

7.9. Стоп-реагент - готов к применению.

Таблица № 1

**Расход реагентов набора в зависимости от количества используемых стрипов**

	Рабочий промывочный раствор		Конъюгат (мл)	ТМБ- Субстрат ный раствор (мл)
	ПР (конц x25) (мл)	Вода дистиллированная (мл)		
3	5	120	3,0	3,0
4	5	120	4,0	4,0
5	10	240	5,0	5,0
6	10	240	6,0	6,0
7	15	360	7,0	7,0
8	15	360	8,0	8,0
9	20	480	9,0	9,0
10	20	480	10,0	10,0
11	25	600	11,0	11,0
12	25	600	12,0	12,0

## 8. Проведение анализа.

8.1. Калибровочные пробы и контрольную сыворотку рекомендуется вносить по следующей схеме: в лунки иммуносорбента А-1, А-2 дозатором пипеточным внести по 50 мкл «Калибратора 0», в лунки В-1, В-2 - по 50 мкл «Калибратора 1», в лунки С-1, С-2 - по 50 мкл «Калибратора 2», в лунки D-1, D-2 – по 50 мкл «Калибратора 3», в лунки Е-1, Е-2 - по 50 мкл «Калибратора 4», в лунки F-1, F-2 - по 50 мкл «Калибратора 5», в лунки G1, G2 - по 50 мкл контрольной сыворотки. Лунки H1 и H2 оставить для измерения оптической плотности ТМБ-Субстратного раствора.

В остальные лунки внести дозатором по 50 мкл исследуемых сывороток в двух повторах.



**Внимание! Время внесения образцов не должно превышать 10 мин.!**

8.2. Во все лунки, кроме Н1 и Н2, внести пипеточным дозатором по 50 мкл БР. Перемешать содержимое лунок вращением планшета на поверхности стола в течение 10 сек.

Стрипы планшета закрыть крышкой и инкубировать в течение 60 мин при температуре  $(37,0 \pm 0,5)$  °С во влажной камере в термостате.

Для создания влажной камеры планшет закрыть крышкой, на которую положить смоченную водой фильтровальную бумагу, планшет поместить в полиэтиленовый пакет, после чего края пакета завернуть вниз.

8.3. По истечении указанного времени содержимое лунок удалить с помощью вошера (или многоканальной пипетки) в ёмкость для сбора инфицированного материала, иммуносорбент промыть 4 раза рабочим ПР, заливая его до краев лунок (не менее 300 мкл в лунку) и удаляя промывочный раствор с помощью вошера (или многоканальной пипетки) в ёмкость для сбора инфицированного материала. По окончании промывки тщательно удалить остатки жидкости из лунок постукиванием рамки со стрипами в перевернутом положении по фильтровальной бумаге. Не допускать остатка жидкости в лунках планшета.

8.4. Из чистой емкости с отобранным необходимым количеством конъюгата (см. п.7.4.), внести пипеточным дозатором по 100 мкл конъюгата во все лунки планшета, кроме лунок Н1 и Н2. Стрипы планшета закрыть крышкой и инкубировать в течение 60 мин при температуре  $(37,0 \pm 0,5)$  °С во влажной камере в термостате (см. п.9.2.).

8.5. По истечении указанного времени содержимое лунок удалить в ёмкость для сбора инфицированного материала. Стрипы планшета промыть 5 раз рабочим ПР, как в п.9.3.

8.6. Из чистой емкости с отобранным необходимым количеством ТМБ-Субстратного раствора (см. п.7.8.), внести пипеточным дозатором по 100 мкл

раствора во все лунки отмытого планшета. Планшет выдержать в течение 20 мин в защищённом от света месте при температуре от 18 до 24 °С.

8.7. Реакцию остановить добавлением во все лунки стрипов по 150 мкл стоп-реагента, осторожно постучать по краю планшета или встряхивать стрипы на шейкере в течение 10 секунд и провести учет результатов. Время между остановкой реакции и измерением ОП не должно превышать 20 мин.

### 9. Регистрация результатов

Регистрацию результатов проводить спектрофотометрически при длине волны: 450 нм с настройкой прибора по «воздуху».

Желательно использовать программу спектрофотометра, позволяющую вычитать величину ОП в лунках с калибровочной пробой «Калибратор 0» (A1 и A2) из значений ОП всех остальных лунок. Если фотометр не позволяет вычитать величину ОП лунок A1 и A2, то для расчетов концентраций следует использовать величину разности ОП образца – ОП  $A_{1A2}$ , где ОП образца – среднее значение ОП в лунках, содержащих калибровочные или искомые пробы, а ОП  $A_{1A2}$  - среднее значение ОП лунок A1 и A2.

### 10. Учет результатов

Реакцию следует учитывать, если среднее значение оптической плотности (ОП) в лунках с контролем субстрата (H1 и H2) - не более 0,1.

На бланке для построения калибровочной кривой в линейных координатах по оси абсцисс X откладывают соответствующие значения концентрации свободного ПСА, выраженной в нг/мл, по оси ординат Y откладывают средние значения ОП калибровочных проб. По полученным точкам строят калибровочную кривую.

Для исследуемых образцов определяют концентрацию свободного ПСА по калибровочному графику. Для этого на оси ординат Y отмечают значение ОП исследуемого образца, проводят прямую до пересечения с калибровочной кривой, от полученной точки проводят перпендикуляр до оси

абсцисс Х. Точка пересечения покажет значение концентрации свободного ПСА в исследуемом образце, выраженную в нг/мл.

Контрольная сыворотка служит для проверки точности и достоверности результатов. Полученные величины концентраций свободного ПСА в образцах считать достоверными, если вычисленное по калибровочному графику значение концентрации свободного ПСА в контрольном образце попадает в пределы, указанные на этикетке флакона.

Если значения содержания свободного ПСА в исследуемом образце выше значения калибровочной пробы «Калибратор 5», образец следует развести калибровочной пробой «Калибратор 0» в 10 раз, повторить анализ, полученное значение содержания свободного ПСА умножить на фактор разведения.

10.3. Расчет отношения концентрации свободного ПСА к концентрации общего ПСА производится по следующей формуле:

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

**Применять только при значениях общего ПСА более 4 нг/мл!**

Концентрация общего ПСА должна быть определена с использованием набора «ДС–ИФА–ПСАобщий», производства 000 «Научно производственное объединение «Диагностические системы».

## 11. Условия хранения и эксплуатации набора

11.1. Набор реагентов должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре от 2 до 8 °С в защищённом от света месте в течение всего срока годности. Срок годности набора – 13 месяцев.

11.2. Транспортирование набора реагентов проводить при температуре от 2 до 8 °С. Допустимо транспортирование при температуре от 9 до 20 °С не более 10 суток.

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

- Иммуносорбент - пакет с неиспользованными стрипами и силикагелем тщательно герметизировать. После первого вскрытия пакета

иммуносорбент стабилен в течение 1 месяца при хранении при температуре от 2 до 8 °С.

- ПР (концентрат х 25) - после вскрытия флакона оставшийся неиспользованным ПР (концентрат х 25) хранить во флаконе, плотно закрытом винтовой крышкой, на протяжении срока годности набора при температуре от 2 до 8 °С;

- Рабочий промывочный раствор, подготовленный к использованию, хранить не более 3-х суток при температуре от 2 до 8 °С.

- Конъюгат – после вскрытия флакона оставшийся неиспользованным конъюгат хранить во флаконе, плотно закрытом винтовой крышкой, на протяжении месяца при температуре от 2 до 8 °С.

- Калибровочные пробы - после вскрытия флакона оставшиеся неиспользованными калибровочные пробы хранить во флаконах, плотно закрытых винтовыми крышками на протяжении месяца при температуре от 2 до 8 °С.

- Контрольная сыворотка - после вскрытия флакона оставшуюся неиспользованной контрольную сыворотку хранить во флаконе, плотно закрытом винтовой крышкой, на протяжении месяца при температуре от 2 до 8 °С.

- БР (блок-раствор) – после вскрытия флакона оставшийся неиспользованным БР хранить во флаконе, плотно закрытом винтовой крышкой, на протяжении срока годности набора при температуре от 2 до 8 °С.

- ТМБ-Субстратный раствор – после вскрытия флакона оставшийся неиспользованным ТМБ-Субстратный раствор хранить во флаконе, плотно закрытом винтовой крышкой, на протяжении месяца при температуре от 2 до 8 °С.

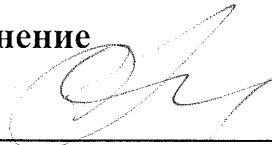
- Стоп-реагент - после вскрытия флакона оставшийся неиспользованным Стоп-реагент хранить во флаконе, плотно закрытом

винтовой крышкой, на протяжении срока годности набора при температуре от 2 до 8 °С.

11.4. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции.

Рекламации на специфические и физические свойства препарата направлять в адрес предприятия-изготовителя - ООО «Научно-производственное объединение «Диагностические системы» 603093, Россия, г. Нижний Новгород, ул. Яблонева, д. 22, тел./факс: (831) 434-86-83 или тел.: (831) 434-97-12.

Директор ООО  
«Научно-производственное объединение  
«Диагностические системы»  
по производству

  
Г. А. Полянская

«СОГЛАСОВАНО»  
Зав. кафедрой клинической  
лабораторной диагностики ГОУ ДПО  
«РМАПО Росздрава»

  
И. И. Долгов, профессор Долгов В.В.  
2008 г.

Подпись *В.В. Долгова*  
удостоверяю: специалист по  
кадровой работе ГОУ ДПО  
РМАПО Росздрава  
подпись: *Лиза 25.04.08*