

Контрольный

УТВЕРЖДАЮ  
Заместитель министра  
Здравоохранения  
Республики Беларусь



В.Е.Шевчук

“12” 05 2009 г.

ИНСТРУКЦИЯ  
ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ  
ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СВОБОДНОГО ПРОСТАТ-СПЕЦИФИЧЕСКОГО  
АНТИГЕНА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА  
МЕТОДОМ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

ОнкоИФА-свободный ПСА  
Комплект 1

СП ООО "Фармлэнд",  
Генеральный директор



В.В.Голынников  
2008 г.

## 1 Назначение набора

1.1 Набор предназначен для количественного содержания концентрации свободной фракции простат-специфического антигена (свободного ПСА) в сыворотке крови методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2 ПСА представляет собой гликопротеин с молекулярной массой около 32000 Да, состоящий из одной полипептидной цепи. ПСА является сериновой протеазой, продуцируемой исключительно 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  $\alpha_1$ -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.

## 2 Характеристика и принцип работы набора

### 2.1 Состав набора:

Наименование компонента	Количество
Иммуносорбент	1 комплект
Калибровочная проба С <sub>0</sub> *	1 флакон; 0,5 мл или 1 флакон, лиофилизированный препарат
Калибровочная проба С <sub>1</sub> *	1 флакон; 0,5 мл или 1 флакон, лиофилизированный препарат
Калибровочная проба С <sub>2</sub> *	1 флакон; 0,5 мл или 1 флакон, лиофилизированный препарат
Калибровочная проба С <sub>3</sub> *	1 флакон; 0,5 мл или 1 флакон, лиофилизированный препарат
Калибровочная проба С <sub>4</sub> *	1 флакон; 0,5 мл или 1 флакон, лиофилизированный препарат
Калибровочная проба С <sub>5</sub> *	1 флакон; 0,5 мл или 1 флакон, лиофилизированный препарат
Контрольная сыворотка	1 флакон; 0,5 мл или 1 флакон, лиофилизированный препарат
Конъюгат анти-ПСА-пероксидаза (Конъюгат Е)	1 флакон; 14 мл
Аналитический буферный раствор (Буферный раствор А)	1 флакон; 14 мл

Концентрированный буферный раствор для промывания лунок (Буферный раствор Р)	2 флакона по 14 мл
Раствор тетраметилбензидина (Раствор ТМБ)	1 флакон, 14 мл
Стоп-реагент	1 флакон; 14 мл
Закрывающийся пакет из полиэтиленовой пленки**	1 пакет
*Значения концентрации свободного ПСА в калибровочных пробах указаны на этикетках флаконов.	
**При упаковывании иммуносорбента в пакет из 2-слойного полиэтилена.	

**2.2** Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 40 неизвестных, 6 калибровочных проб, одной пробы контрольной сыворотки и одной пробы для измерения значения оптической плотности (ОП) раствора ТМБ. Всего – 96 определений при использовании всех стрипов одновременно.

Набор рассчитан на 4 постановки иммуноферментного анализа: 1 постановка – 3 стрипа (24 лунки).

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

**2.3** Набор позволяет определять концентрацию свободного ПСА в сыворотке крови человека в диапазоне от 0,2 до 10 нг/мл.

**2.4** Продолжительность анализа составляет 2 ч 15 мин.

**2.5** Принцип работы набора. 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 буферного раствора, 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.

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

### 3 Меры предосторожности при работе с набором

**3.1** Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными. Однако работа со всеми исследуемыми образцами сывороток (плазмы), которые следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита В или любой другой возбудитель вирус-

ной инфекции, с отработанными растворами и жидкостями, различным оборудованием, которое может быть загрязнено в процессе анализа, требует определенных мер безопасности при использовании набора:

- работу необходимо проводить в специально оборудованном помещении;
- работать необходимо с применением средств индивидуальной защиты и с соблюдением мер предосторожности в соответствии с требованиями [1], [2];
- в случае пролива сыворотки крови на рабочие поверхности, необходимо проводить дезинфекцию в соответствии с требованиями [3].

**3.2** Стоп-реагент, представляющий собой 1N раствор соляной кислоты, обладает раздражающим действием. При попадании на кожу и слизистые немедленно промыть большим количеством воды.

**3.3** При работе с набором рабочие места должны быть обеспечены приточно-вытяжной вентиляцией.

**3.4** Все лица, занятые при производстве наборов, должны проходить обязательный медицинский осмотр в соответствии с требованиями [4].

**3.5** Утилизация медицинских отходов и/или неиспользованных наборов с истекшим сроком годности должна производиться в соответствии с требованиями [5].

#### **4 Правила работы с набором**

**4.1** Для исключения ложных результатов исследуемые образцы необходимо готовить и хранить в условиях, предотвращающих бактериальный пророст. Необходимо осветлять образцы сывороток, содержащие агрегированные компоненты сыворотки или осадок, при помощи центрифугирования. Образцы сывороток можно хранить при температуре (2-8)°С не более 48 ч. Замороженные образцы (желательно до температуры минус 20 °С и ниже) можно хранить до 3 месяцев. Необходимо избегать повторных циклов замораживания-оттаивания образцов.

Для проведения анализа не следует использовать плазму крови, образцы сыворотки крови с гемолизом, гиперлипидемией, бактериальным проростом, а также длительно хранившиеся без замораживания.

Надежность результатов зависит от выполнения следующих правил:

- не допускается использование набора после окончания срока годности, а также смешивание компонентов наборов разных серий;
- для приготовления каждого реагента должна использоваться отдельная емкость;
- вся используемая для приготовления реагентов посуда должна быть тщательно вымыта и сполоснута дистиллированной водой;
- необходимо обратить внимание на тщательное перемешивание реагентов;
- каждый образец сыворотки, а также реагенты набора необходимо отбирать отдельным наконечником.
- не допускается подсыхание лунок на всех этапах постановки ИФА;
- необходимо использовать пипетки полуавтоматические со сменными наконечниками, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 3%);
- во время проведения анализа следует избегать попадания прямых солнечных лучей на рабочую поверхность.

**4.2** При вскрытии и растворении лиофилизованных компонентов необходимо следить, чтобы на крышке и стенках флаконов не оставалось сухого вещества.

**4.3** При использовании набора для проведения нескольких независимых серий анализов необходимо иметь в виду, что для каждого независимого эксперимента необходимо построение новой калибровочной кривой и рекомендуется определение концентрации свободного ПСА в контрольной сыворотке.

## **5 Оборудование и материалы, необходимые для проведения анализа**

**5.1** Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках планшета при длине волны 450 нм;

- термостатируемый шейкер типа «iEMS Incubator/Shaker», позволяющий производить встряхивание с амплитудой колебаний (3-4) мм и частотой (8-13) Гц ((500-800) об/мин) при температуре 37 °С или аналогичный ему по характеристикам;

- полу- или автоматическое устройство для промывания планшетов (вошер);

- пипетки одноканальные автоматические со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости от 0,005 до 5,0 мл (от 5 до 5000 мкл);

- пипетки 8-ми канальные автоматические со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости до 0,5 мл (до 500 мкл);

- мерный цилиндр вместимостью 1000 мл;

- ванночки для реагентов или чашки Петри (диаметр 100 мм);

- вата медицинская гигроскопическая;

- бумага фильтровальная;

- перчатки резиновые хирургические;

- раствор с объемной долей этилового спирта 70%;

- раствор с массовой долей перекиси водорода 6 %;

- вода дистиллированная;

- контейнер для сбора твердых отходов;

- контейнер для слива жидких отходов.

## **6 Подготовка к проведению анализа**

**6.1** Набор реагентов перед проведением анализа извлечь из холодильника, открыть крышку коробки и выдержать компоненты набора при температуре (18-25) °С в течение 30 мин.

Все образцы сывороток и реагенты перед проведением анализа тщательно перемешать.

### **6.2 Подготовка растворов калибровочных проб и контрольной сыворотки**

Для восстановления лиофилизованных калибровочных проб и контрольной сыворотки перед вскрытием флаконов легким постукиванием стряхнуть частицы, прилипшие к стенкам флаконов или пробкам. Открыть флаконы и положить пробки перевернутыми на сухую поверхность. В каждый флакон с калибровочной пробой и контрольной сывороткой внести по 0,5 мл дистиллированной воды. Флаконы закрыть пробками, выдержать в течение 10 мин при температуре (18-25) °С и аккуратно наклоняя и вращая флаконы, перемешать их содержимое до полного растворения, избегая образования пены. В течение следующих 10 мин выдержать флаконы при температуре (18-25) °С, периодически перемешивая их содержимое.

Жидкие калибровочные пробы и контрольная сыворотка готовы к использованию.

Растворенные калибровочные пробы и контрольную сыворотку, а также вскрытые флаконы с жидкими калибровочными пробами и контрольной сывороткой можно хранить при температуре (2-8) °С не более 1 месяца.

### **6.3 Приготовление буферного раствора для промывания лунок иммуносорбента**

В мерный цилиндр вместимостью 1000 мл внести содержимое флаконов с буферным раствором Р, затем добавить дистиллированной воды до метки 560 мл и аккуратно перемешать раствор, избегая образования пены.

В случае использования одного или несколько стрипов содержимое флакона с буферным раствором Р интенсивно встряхнуть в течение (20-30) с, отобрать необходимое количество буферного раствора Р в мерный стакан или цилиндр и развести его дистиллированной водой в 20 раз.

*Пример – В мерный цилиндр внести 5 мл буферного раствора Р и 95 мл дистиллированной воды, перемешать раствор, избегая образования пены.*

Раствор можно хранить закрытым при температуре (2-8) °С не более 5 суток.

Неиспользованный буферный раствор Р можно хранить в закрытом флаконе при температуре (2-8) °С в течение срока годности набора.

### **6.4 Подготовка иммуносорбента**

Открыть пакет и установить на рамку необходимое количество стрипов. Оставшиеся стрипы поместить в пакет с этикеткой (при упаковывании иммуносорбента в пакет из 2-слойного полиэтилена), который затем вложить в закрывающийся пакет из полиэтиленовой пленки и герметично закрыть. Стрипы можно хранить в пакете с герметично закрытым замком при температуре (2-8) °С не более 1 месяца.

### **6.5 Подготовка конъюгата Е, и раствора ГМБ**

Конъюгат Е и раствор ГМБ готовы к использованию. После вскрытия флаконов растворы можно хранить при температуре (2-8) °С не более 1 месяца.

### **6.6 Подготовка буферного раствора А стоп-реагента**

Буферный раствор А и стоп-реагент готов к использованию. После вскрытия флаконов растворы можно хранить при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности.

## **7 Требования к промыванию планшета**

**7.1** Для промывания планшета рекомендуется использовать автоматический или полуавтоматический промыватель – вошер; в случае отсутствия вошера можно промывать лунки 8-канальной пипеткой;

- на всех этапах промывания необходимо контролировать заполнение всех лунок и полное удаление (аспирацию) жидкости из них;

- необходимо при каждом промывании все лунки заполнить раствором до краев (0,30-0,35 мл в лунку), без переполнения и перетекания жидкости из соседних лунок, встряхнуть планшет на шейкере в течение (5-10) с с последующим декантированием;

- при каждом декантировании тщательно удалять остатки жидкости из лунок постукиванием рамкой со стрипами в перевернутом положении по сложенной в несколько раз фильтровальной бумаге, положенной на лист полиэтилена;
- некачественное промывание планшета приводит к получению некорректных результатов.

## 8 Проведение анализа

**8.1** Составить протокол маркирования лунок в соответствии с рисунком 1. Лунки маркировать следующим образом:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	T	T	№1									
<b>B</b>	C <sub>0</sub>	C <sub>0</sub>	№1									
<b>C</b>	C <sub>1</sub>	C <sub>1</sub>	№2									
<b>D</b>	C <sub>2</sub>	C <sub>2</sub>	№2									
<b>E</b>	C <sub>3</sub>	C <sub>3</sub>	№3									
<b>F</b>	C <sub>4</sub>	C <sub>4</sub>	№3									
<b>G</b>	C <sub>5</sub>	C <sub>5</sub>	№4									
<b>H</b>	KC	KC	№4									

**Рисунок 1**

- A1, A2 — для измерения величины ОП раствора ТМБ (Т);
- B1, B2 — для измерения величины ОП калибровочной пробы C<sub>0</sub>;
- C1, C2 — для измерения величины ОП калибровочной пробы C<sub>1</sub>;
- D1, D2 — для измерения величины ОП калибровочной пробы C<sub>2</sub>;
- E1, E2 — для измерения величины ОП калибровочной пробы C<sub>3</sub>;
- F1, F2 — для измерения величины ОП калибровочной пробы C<sub>4</sub>;
- G1, G2 — для измерения величины ОП калибровочной пробы C<sub>5</sub>;
- H1, H2 — для измерения величины ОП контрольной сыворотки (КС);
- A3, B3 - .... — для измерения величины ОП образцов исследуемых сывороток крови человека №1 - ....

**8.2** Внести во все лунки, кроме лунок A1 и A2, по 0,1 мл (100 мкл) буферного раствора А.

**8.3** Внести в дубликатах в соответствующие лунки по 0,05 мл (50 мкл) калибровочных проб и контрольной сыворотки, в оставшиеся лунки – по 0,05 мл (50 мкл) проб исследуемых образцов сыворотки крови.

**Внимание!** Общее время внесения калибровочных проб, контрольной сыворотки и проб исследуемых образцов сыворотки крови не должно превышать 15 мин, иначе время инкубации разных образцов будет значительно различаться, что приведет к неправильным результатам!

**8.4** Инкубировать планшет на термостатируемом шейкере со скоростью (500-800) об/мин при температуре (37±) °С в течение 1 ч.

**8.5** Удалить содержимое лунок с помощью промывателя, затем промыть лунки планшета буферным раствором для промывания лунок иммуносорбента (п 6.3) **пять раз**.

**8.6** Внести немедленно во все лунки, кроме лунок А1 и А2, по 0,12 мл (120 мкл) конъюгата Е.

**8.7** Инкубировать планшет на термостатируемом шейкере со скоростью (500-800) об/мин при температуре (37±) °С **в течение 1 ч**.

**8.8** Удалить содержимое лунок с помощью промывателя, затем промыть лунки планшета буферным раствором для промывания лунок иммуносорбента (п 6.3) **пять раз**.

**8.9** Внести немедленно во все лунки по 0,1 мл (100 мкл) раствора ТМБ и инкубировать планшет **в защищенном от света месте при температуре (18-25)° С в течение 15 мин**.

**8.7** Остановить реакцию путем внесения во все лунки планшета по 0,1мл (100 мкл) стоп-реагента. Планшет встряхнуть на шейкере в течение **(1-2) мин**.

**8.8** Не позже чем через 1 мин после остановки реакции, определить ОП в лунках в одноволновом режиме при длине волны **450 нм** против воздуха.

В случае невозможности по техническим причинам своевременно измерить ОП растворов в лунках на фотометре, планшет можно хранить при температуре **(2-8) °С не более 20 мин**.

**8.9** Схема анализа приведена в таблице 1.

## **9 Обработка результатов анализа**

**9.1** Если программа фотометра позволяет вычитать среднее арифметическое значение ОП растворов в лунках А1 и А2 из значений ОП растворов всех остальных лунок, то для дальнейших расчетов необходимо использовать величину В — среднее арифметическое значение ОП растворов в лунках, содержащих калибровочные или исследуемые пробы образцов сыворотки крови, ОЕ.

Если программа фотометра не позволяет вычитать среднее арифметическое значение ОП растворов в лунках А1 и А2, то необходимо пользоваться формулой  $V - V_T$ , где  $V_T$  — среднее арифметическое значение ОП растворов в лунках А1 и А2, ОЕ; В — среднее значение ОП растворов в лунках, содержащих калибровочные или исследуемые пробы образцов сыворотки крови, ОЕ.

**9.2** Рассчитать величину В, ОЕ, для каждой пары лунок, содержащих калибровочные пробы, контрольную сыворотку, пробы исследуемых образцов сыворотки крови.

**9.3** В линейных координатах построить для калибровочных проб график зависимости величины В, ОЕ, от концентрации свободного ПСА в калибровочных пробах, нг/мл, откладывая на оси ординат значения ОП, ОЕ, а по оси абсцисс — значения концентраций свободного ПСА, нг/мл, в соответствующих калибровочных пробах.

**9.4** Определить по калибровочному графику концентрацию свободного ПСА в пробах исследуемых образцов сыворотки крови, нг/мл.



Таблица 1 – Схема проведения анализа

Стадия анализа и реагенты	Номер пары лунок в соответствии с протоколом маркировки лунок по п 8.1								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9-48
Буферный раствор А, мкл	–	100	100	100	100	100	100	100	100
КП С <sub>0</sub> , мкл	–	50	–	–	–	–	–	–	–
КП С <sub>1</sub> , мкл	–	–	50	–	–	–	–	–	–
КП С <sub>2</sub> , мкл	–	–	–	50	–	–	–	–	–
КП С <sub>3</sub> , мкл	–	–	–	–	50	–	–	–	–
КП С <sub>4</sub> , мкл	–	–	–	–	–	50	–	–	–
КП С <sub>5</sub> , мкл	–	–	–	–	–	–	50	–	–
КС, мкл	–	–	–	–	–	–	–	50	–
С <sub>х</sub> , мкл	–	–	–	–	–	–	–	–	50
Инкубация №1	37° С, термостатируемый шейкер, 1 ч								
5-кратная промывка: буферный раствор для промывания лунок иммуносорбента, мкл	5× 300	5× 300	5× 300	5× 300	5× 300	5× 300	5× 300	5× 300	5× 300
Конъюгат Е, мкл	–	120	120	120	120	120	120	120	120
Инкубация №2	37° С, термостатируемый шейкер, 1 ч								
5-кратная промывка: буферный раствор для промывания лунок иммуносорбента, мкл	5× 300	5× 300	5× 300	5× 300	5× 300	5× 300	5× 300	5× 300	5× 300
Раствор ТМБ, мкл	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Инкубация №3	(18-25)° С, 15 мин, защищенное от света место								
Стоп-реагент, мкл	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Перемешивание	(18-25)° С, шейкер, (1-2) мин								
Измерение ОП растворов в лунках стрипов иммуносорбента, ОЕ	Спектрофотометр, 450 нм								
Расчет результатов	Калькулятор и масштабная бумага либо соответствующая компьютерная программа								
Примечания	1 КП – калибровочная проба; 2 КС – контрольная сыворотка; 3 С <sub>х</sub> – анализируемые пробы.								

## 10 Аналитические характеристики набора

**10.1 Специфичность.** Не обнаружено перекрестной реакции моноклональных антител к свободному ПСА с ПСА-АХТ комплексом.

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

**10.3 Линейность.** Зависимость концентрации свободного ПСА в образцах сыворотки крови при разведении их калибровочной пробой  $C_0$  имеет линейный характер в диапазоне концентраций (0,2-10) нг/мл и составляет  $\pm 10\%$ .

**10.4 Точность.** Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» свободного ПСА – отношение измеренной к расчетной концентрации свободного ПСА в пробе, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы  $C_2$ . Процент открытия составляет 90–110.

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

**10.6 Клиническая проверка.** 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.

**10.7 Конкретный уровень порогового соотношения** в различных лабораториях и клиниках подвержен некоторым колебаниям. Рекомендуются в каждой лаборатории при использовании набора уточнить пороговое соотношение концентраций ПСА.

## 11 Форма выпуска набора

**11.1** Набор выпускается в двух вариантах комплектации:

1 **комплект 1** – проведение анализа ручным способом. Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 40 неизвестных, 6 калибровочных проб, одной

пробы контрольной сыворотки и одной пробы для измерения значения ОП раствора ТМБ. Набор рассчитан на **4 постановки ИФА**: 1 постановка – 3 стрипа (24 лунки). Всего – **96 определений**;

**2 комплект 2** – для проведения анализа на автоматическом анализаторе открытого типа. Набор рассчитан на проведение анализа в монопликатах 88 неизвестных, 6 калибровочных проб, одной пробы контрольной сыворотки и одной пробы для измерения значения ОП раствора ТМБ. Набор рассчитан на 6 постановок иммуноферментного анализа: 1 постановка – 2 стрипа (16 лунок). Всего – 96 определений.

## 12 Условия хранения и применения набора

**12.1** Хранение набора должно производиться в чистом, защищенном от влаги и света помещении при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности. Допускается хранение набора при температуре до 25 °С не более 5 суток.

Запрещается замораживать компоненты набора.

**12.2** Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

**12.3** Срок годности набора – 12 месяцев.

## Библиография

- [1] Приказ № 66 от 20.04.93 г.  
О мерах по снижению заболеваемости вирусными гепатитами в Республике Беларусь
- [2] Приказ №351 от 16.12.98г.  
Сборник нормативных документов по проблеме ВИЧ/СПИД
- [3] ОСТ 42-21-2-85  
Стерилизация и дезинфекция изделий медицинского назначения. Методы, средства и режимы
- [4] Постановление № 33 Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 08.08.2000 г.  
О порядке проведения обязательных медицинских осмотров работников
- [5] Санитарные нормы и правила  
СанПиН № 2.1.7.14-20-2005 Правила обращения с медицинскими отходами

Инструкция составлена  
сотрудниками СП ООО «Фармлэнд»:

Главным специалистом  
СП ООО «Фармлэнд»

Ведущим-технологом

Ведущим специалистом по  
диагностическим тест-системам

Ю.В.Сенчук

Е.И.Лаврецкой

И.М.Богдановской

Контрольный

УТВЕРЖДАЮ  
Заместитель министра  
Здравоохранения  
Республики Беларусь

  
В.Е.Шевчук

“ 12 ” 05 2009 г.



ИНСТРУКЦИЯ  
ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ  
ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СВОБОДНОГО ПРОСТАТ-СПЕЦИФИЧЕСКОГО  
АНТИГЕНА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА  
МЕТОДОМ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

ОнкоИФА-свободный ПСА  
Комплект 2

СП ООО "Фармлэнд",  
Генеральный директор



  
В.В.Голынников

“ 12 ” 11 2008 г.

## 1 Назначение набора

1.1 Набор предназначен для количественного определения содержания свободной фракции простат-специфического антигена (свободного ПСА) в сыворотке крови методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2 ПСА представляет собой гликопротеин с молекулярной массой около 32000 Да, состоящий из одной полипептидной цепи. ПСА является сериновой протеазой, продуцируемой исключительно 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  $\alpha_1$ -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.

## 2 Характеристика и принцип работы набора

### 2.1 Состав набора:

Наименование компонента	Количество
Иммуносорбент	1 планшет
Калибровочная проба С <sub>0</sub> *	1 флакон; 0,5 мл
Калибровочная проба С <sub>1</sub> *	2 флакона по 0,5 мл
Калибровочная проба С <sub>2</sub> *	1 флакон; 0,5 мл
Калибровочная проба С <sub>3</sub> *	1 флакон; 0,5 мл
Калибровочная проба С <sub>4</sub> *	2 флакона по 0,5 мл
Калибровочная проба С <sub>5</sub> *	1 флакон; 0,5 мл
Контрольная сыворотка*	2 флакона по 0,5 мл
Конъюгат анти-ПСА-пероксидаза (Конъюгат Е)	1 флакон; 17 мл
Аналитический буферный раствор (Буферный раствор А)	1 флакон; 14 мл
Концентрированный буферный раствор для промывания лунок (Буферный раствор Р)	2 флакона по 14 мл
Раствор тетраметилбензидина (раствор ТМБ)	2 флакона по 14 мл
Стоп-реагент	1 флакон; 48 мл
Многоцелевые пробирки	100 штук
Концентрированный раствор Триала (Триал)	1 флакон; 50 мл
Закрывающийся пакет из полиэтиленовой пленки	1 пакет
*Значения концентрации свободного ПСА в калибровочных пробах указаны на этикетках флаконов.	

2.1 Набор рассчитан на проведение анализа в монопликатах 88 неизвестных, 6 калибровочных проб, одной пробы контрольной сыворотки и одной пробы для из-

мерения значения оптической плотности (ОП) раствора ТМБ. Всего – 96 определений при использовании всех стрипов одновременно.

Набор рассчитан на 6 постановок иммуноферментного анализа: 1 постановка – 2 стрипа (16 лунок).

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

**2.3** Набор позволяет определять концентрацию свободного ПСА в сыворотке крови человека в диапазоне от 0,2 до 10 нг/мл.

**2.4** Продолжительность анализа составляет 2 ч 15 мин.

**2.5** Принцип работы набора. 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 буферного раствора, 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.

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

### **3 Меры предосторожности при работе с набором**

**3.1** Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными. Однако работа со всеми исследуемыми образцами сывороток (плазмы), которые следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита В или любой другой возбудитель вирусной инфекции, с отработанными растворами и жидкостями, различным оборудованием, которое может быть загрязнено в процессе анализа, требует определенных мер безопасности при использовании набора:

- работу необходимо проводить в специально оборудованном помещении;
- работать необходимо с применением средств индивидуальной защиты и с соблюдением мер предосторожности в соответствии с требованиями [1], [2];
- в случае пролива сыворотки крови на рабочие поверхности, необходимо проводить дезинфекцию в соответствии с требованиями [3].

**3.2** Стоп-реагент, содержащий соляную кислоту, обладает раздражающим действием. При попадании на кожу и слизистые немедленно промыть большим количеством воды.

**3.3** При работе с набором рабочие места должны быть обеспечены приточно-вытяжной вентиляцией.

**3.4** Все лица, занятые при производстве наборов, должны проходить обязательный медицинский осмотр в соответствии с требованиями [4].

**3.5** Утилизация медицинских отходов и/или неиспользованных наборов с истекшим сроком годности должна производиться в соответствии с требованиями [5].

#### **4 Правила работы с набором**

**4.1** Для исключения ложных результатов исследуемые образцы необходимо готовить и хранить в условиях, предотвращающих бактериальный пророст. Необходимо осветлять образцы сывороток, содержащие агрегированные компоненты сыворотки или осадок, при помощи центрифугирования. Образцы сывороток можно хранить при температуре (2-8)°С не более 48 ч. Замороженные образцы (желательно до температуры минус 20 °С и ниже) можно хранить до 3 месяцев. Необходимо избегать повторных циклов замораживания-оттаивания образцов.

Для проведения анализа не следует использовать плазму крови, образцы сыворотки крови с гемолизом, гиперлипидемией, бактериальным проростом, а также длительно хранившиеся без замораживания.

Надежность результатов зависит от выполнения следующих правил:

- не допускается использование набора после окончания срока годности, а также смешивание компонентов наборов разных серий;
- для приготовления каждого реагента должна использоваться отдельная емкость;
- вся используемая для приготовления реагентов посуда должна быть тщательно вымыта и сполоснута дистиллированной водой;
- необходимо обратить внимание на тщательное перемешивание реагентов;

**4.2** В случае дробного применения набора необходимо извлечь калибровочные пробы и контрольную сыворотку из автоматического анализатора после их внесения в лунки планшета, участвующие в постановке анализа и, плотно закрыв крышками, убрать в холодильник. Не допускается повторное использование калибровочных проб и контрольной сыворотки, находившихся на борту анализатора в течение всей сессии, вне зависимости от ее длительности. Остальные жидкие реагенты убрать в холодильник сразу по окончании сессии. Эти ограничения обусловлены естественным испарением жидкостей, приводящим к получению некорректных результатов измерения при последующем использовании реагентов.

**4.3** При использовании набора для проведения нескольких независимых серий анализов необходимо иметь в виду, что для каждого независимого эксперимента необходимо построение новой калибровочной кривой и рекомендуется определение концентрации свободного ПСА в контрольной сыворотке.

#### **5 Оборудование и материалы, необходимые для проведения анализа**

**5.1** Автоматический иммуноферментный анализатор открытого типа «Alisei» или аналогичный ему;

- мерный цилиндр вместимостью 1000 мл;
- вата медицинская гигроскопическая;
- перчатки резиновые хирургические;
- раствор с объемной долей этилового спирта 70%;

- раствор с массовой долей перекиси водорода 6 %;
- вода дистиллированная;
- контейнер для сбора твердых отходов;
- контейнер для слива жидких отходов.

## **6 Подготовка к проведению анализа**

**6.1** Набор реагентов перед проведением анализа извлечь из холодильника, открыть крышку коробки и выдержать компоненты набора при температуре (18-25) °С в течение 30 мин.

### **6.2 Подготовка растворов калибровочных проб и контрольной сыворотки**

Калибровочные пробы и контрольная сыворотка готовы к использованию.

Вскрытые флаконы с калибровочными пробами и контрольной сывороткой можно хранить при температуре (2-8) °С не более 1 месяца.

### **6.3 Приготовление буферного раствора для промывания лунок иммуносорбента**

В мерный цилиндр вместимостью 1000 мл внести содержимое флаконов с буферным раствором Р, затем добавить дистиллированной воды до метки 560 мл и аккуратно перемешать раствор, избегая образования пены.

В случае использования одного или несколько стрипов содержимое флакона с буферным раствором Р интенсивно встряхнуть в течение (20-30) с, отобрать необходимое количество буферного раствора Р в мерный стакан или цилиндр и развести его дистиллированной водой в 20 раз.

*Пример – В мерный цилиндр внести 5 мл буферного раствора Р и 95 мл дистиллированной воды, перемешать раствор, избегая образования пены.*

Раствор можно хранить закрытым при температуре (18-25) °С не более 5 суток.

Неиспользованный буферный раствор Р можно хранить в закрытом флаконе при температуре (2-8) °С в течение срока годности набора.

### **6.4 Приготовление рабочего раствора Триала для промывания внутренних магистралей и игл автоматического анализатора**

В стеклянную колбу вместимостью 6000 мл внести содержимое флакона с раствором Триала, затем добавить 4950 мл дистиллированной водой и аккуратно перемешать раствор, избегая образования пены.

Раствор можно хранить закрытым при температуре (18-25) °С не более 5 суток.

### **6.5 Подготовка иммуносорбента**

Открыть пакет и установить на рамку необходимое количество стрипов. Оставшиеся стрипы поместить в пакет с этикеткой (при упаковке иммуносорбента в пакет из 2-слойного полиэтилена), который затем вложить в закрывающийся пакет из полиэтиленовой пленки и герметично закрыть. Стрипы можно хранить в пакете с герметично закрытым замком при температуре (2-8) °С не более 1 месяца.

### **6.6 Подготовка конъюгата Е и раствора ТМБ**

Конъюгат Е и раствор ТМБ готовы к использованию. После вскрытия флаконов растворы можно хранить при температуре (2-8) °С не более 1 месяца.



## 6.7 Подготовка буферного раствора А стоп-реагента

Буферный раствор А и стоп-реагент готов к использованию. После вскрытия флаконов растворы можно хранить при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности.

## 7 Проведение анализа

**7.1** Иммуноферментный анализатор «Alisei» имеет полностью автоматизированный процесс проведения анализа: внесение реагентов, промывка, инкубирование, измерение оптической плотности, обработка результатов. Программа определения концентрации ПСА введена в память анализатора.

## 8 Аналитические характеристики набора

**8.1 Специфичность.** Не обнаружено перекрестной реакции моноклональных антител к свободному ПСА с ПСА-АХТ комплексом.

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

**8.3 Линейность.** Зависимость концентрации свободного ПСА в образцах сыворотки крови при разведении их калибровочной пробой  $C_0$  имеет линейный характер в диапазоне концентраций (0,2-10) нг/мл и составляет  $\pm 10\%$ .

**8.4 Точность.** Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» свободного ПСА – отношение измеренной к расчетной концентрации свободного ПСА в пробе, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы  $C_2$ . Процент открытия составляет 90–110.

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

**8.6 Клиническая проверка.** 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 со-

отношения свободного и общего ПСА необходимо измерять их в один день, не допуская повторного замораживания-размораживания образца.

**8.7** Конкретный уровень порогового соотношения в различных лабораториях и клиниках подвержен некоторым колебаниям. Рекомендуется в каждой лаборатории при использовании набора уточнить пороговое соотношение концентраций ПСА.

## **9 Форма выпуска набора**

**9.1** Набор выпускается в двух вариантах комплектации:

**1 комплект 1** – проведение анализа ручным способом. Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 40 неизвестных, 6 калибровочных проб, одной пробы контрольной сыворотки и одной пробы для измерения значения ОП раствора ТМБ. Набор рассчитан на 4 постановки ИФА: 1 постановка – 3 стрипа (24 лунки). Всего – 96 определений;

**2 комплект 2** – для проведения анализа на автоматическом анализаторе открытого типа. Набор рассчитан на проведение анализа в монопликатах 88 неизвестных, 6 калибровочных проб, одной пробы контрольной сыворотки и одной пробы для измерения значения ОП раствора ТМБ. Набор рассчитан на **6 постановок** иммуноферментного анализа: 1 постановка – 2 стрипа (16 лунок). Всего – **96 определений**.

## **10 Условия хранения и применения набора**

**10.1** Хранение набора должно производиться в чистом, защищенном от влаги и света помещении при температуре (2-8)° С в течение всего срока годности. Допускается хранение набора при температуре до 25° С не более 5 суток.

Запрещается замораживать компоненты набора.

**10.2** Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

**10.3** Срок годности набора – 12 месяцев.

## **Библиография**

- [1] Приказ № 66 от 20.04.93 г.  
О мерах по снижению заболеваемости вирусными гепатитами в Республике Беларусь
- [2] Приказ №351 от 16.12.98г.  
Сборник нормативных документов по проблеме ВИЧ/СПИД
- [3] ОСТ 42-21-2-85  
Стерилизация и дезинфекция изделий медицинского назначения. Методы, средства и режимы
- [4] Постановление № 33 Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 08.08.2000 г.  
О порядке проведения обязательных медицинских осмотров работников
- [5] Санитарные нормы и правила  
СанПиН № 2.1.7.14-20-2005 Правила обращения с медицинскими отходами

Инструкция составлена  
сотрудниками СП ООО «Фармлэнд»:

Главным специалистом  
СП ООО «Фармлэнд»



Ю.В.Сенчук

Ведущим-технологом



Е.И.Лаврецкой

Ведущим специалистом по  
диагностическим тест-системам



И.М.Богдановской