



Унитарное предприятие
"Хозрасчетное опытное производство
Института биоорганической химии
Национальной академии наук Беларуси"
Республика Беларусь

220141, г. Минск, ул. Академика Купревича, 5, корп. 3, Факс (017) 263-62-57

**ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ
НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ
СВОБОДНОГО СПЕЦИФИЧЕСКОГО АНТИГЕНА
ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА
МЕТОДОМ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА**

ИФА-ПС А-свободный

Утверждена Министерством здравоохранения Республики Беларусь
17.05.2010 г.

1 НАЗНАЧЕНИЕ НАБОРА

1.1 Набор ИФА-ПСА предназначен для определения концентрации свободного специфического антигена предстательной железы (ПСА) в сыворотке крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием моноклональных антител. Набор предназначен для применения только "in vitro".

1.2 Специфический антиген простаты (ПСА) является гликопротеином с молекулярной массой 33-34 кДа, который продуцируется исключительно эпителием предстательной железы. ПСА обнаруживается в нормальной, гиперплазированной или злокачественно трансформированной тканях простаты, в местах протатического происхождения, а также в простатической и семенной жидкостях. В сыворотке крови ПСА находится преимущественно в трех различных молекулярных формах: свободный ПСА, связанный с α_1 -антихимотрипсином, связанный α_2 -макроглобулином. α_1 -антихимотрипсин и α_2 -макроглобулин являются внеклеточными ингибиторами протеаз, которые синтезируются в печени и присутствуют в сыворотке крови (10^4 - 10^5) молярном избытке по отношению к ПСА. Образование комплекса с α_1 -антихимотрипсином сопровождается уменьшением количества доступных антигенных детерминант молекулы ПСА, образование комплекса с α_2 -макроглобулином приводит к недоступности антигенных детерминант ПСА. Вследствие этого комплекс ПСА с α_1 -антихимотрипсином в отличие от комплекса с α_2 -макроглобулином может быть определен при иммунохимическом анализе. Комплекс ПСА- α_1 -антихимотрипсин является основной молекулярной формой общего иммунореактивного ПСА в сыворотке крови, в то время как свободный ПСА составляет (5-30)% иммунореактивного ПСА.

При использовании иммунохимических тест-систем определения свободного и общего ПСА в целом ряде исследований было показано, что свободный ПСА составляет значительно меньшую фракцию у больных с не леченным раком простаты, по сравнению с больными с доброкачественной гиперплазией простаты. В связи с этим соотношение свободного ПСА к общему ПСА рекомендовано использовать как дифференциально-диагностический критерий между раком простаты и доброкачественной гиперплазией простаты.

2 ХАРАКТЕРИСТИКА И ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

2.1 Состав набора:

- конъюгат – моноклональные антитела к свободному ПСА, меченые пероксидазой хрена, жидкий препарат, 1 флакон, 22 мл;
- иммуносорбент - 96-луночный планшет (12 стрипов по 8 лунок) с иммобилизованными моноклональными антителами к свободному ПСА, готов к использованию, 1 шт.;
- шесть калибровочных проб свободного ПСА на основе буферной системы, соответствующих следующим концентрациям ПСА: 0 нг/мл (C_0), 0,5 нг/мл (C_1), 1,5 нг/мл (C_2), 3 нг/мл (C_3), 10 нг/мл (C_4), 30 нг/мл (C_5) (точные значения концентраций свободного ПСА указываются на этикетках флаконов), жидкие препараты, готовы к использованию; калибровочные пробы C_0 - C_5 – 6 флаконов по 1 мл. Калибровочные пробы свободного ПСА откалиброваны относительно международного стандарта ВОЗ свободного ПСА (код 96/668) и общего ПСА (код 96/670), включающего 90% связанного с α_1 -антихимотрипсином ПСА и 10% свободного ПСА;
- КС - контрольная сыворотка, содержащая известное количество свободного ПСА, лиофилизированный препарат, 1 флакон;
- буферный раствор, 1 флакон, 12 мл;
- субстратный буферный раствор (СБР), 1 флакон, 20 мл;
- раствор ТМБ, 1,2 мл, 1 флакон;
- концентрат раствора для промывания планшета (КРП), 1 флакон, 20 мл;
- стоп-реагент – раствор для остановки ферментативной реакции, готов к использованию, 1 флакон, 11 мл.

2.2 Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах: 41 неизвестной пробы, 6 калибровочных проб и 1 пробы контрольной сыворотки, всего 96 определений.

2.3 Продолжительность анализа 3,5 ч. Диапазон определяемых концентраций свободного ПСА (0-100) нг/мл.

2.4 Набор ИФА-ПСА-свободный обеспечивает эквимольное определение свободного и связанной форм ПСА.

2.5 Принцип работы набора состоит в следующем: на внутренней поверхности лунок при добавлении исследуемого образца сыворотки крови и буферного раствора во время первой инкубации происходит связывание эндогенного, свободного ПСА сыворотки крови с иммобилизованными моноклональными антителами к свободному ПСА. При удалении содержимого из лунок происходит разделение свободного и связанного антителами антигена (свободного ПСА). Во время второй инкубации конъюгат, пероксидаза хрена – моноклональные антитела к ПСА, связывается с свободным ПСА, иммобилизованным в ходе первой инкубации. При удалении содержимого из лунок происходит удаление несвязавшегося конъюгата. Во время инкубации с хромоген-субстратным раствором происходит окрашивание раствора в лунках. Пероксидазную реакцию останавливают путем добавления стоп-реагента, содержащего 0,5 М серную кислоту. Интенсивность окрашивания раствора в лунках измеряют на спектрофотометре как величину оптической плотности (ОП) при длине волны 450 нм. Величина ОП прямо пропорциональна количеству свободного ПСА в образце сыворотки крови. На основании калибровочной кривой рассчитывается концентрация свободного ПСА в определяемых образцах.

3 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

3.1 При работе с набором следует соблюдать правила работы с химическими веществами.

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

3.3 При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые перчатки, так как данный набор содержит производные крови человека, которые следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные сохранять ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

3.4 Работы проводить с соблюдением мер предосторожности, предусмотренных приказами МЗ РБ № 66 и № 351. В случае пролива сыворотки крови на рабочие поверхности необходимо проводить дезинфекцию в соответствии с требованиями ОСТ 42-21-2-85 «Стерилизация и дезинфекция изделий медицинского назначения».

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

3.6 Все лица, занятые работой с набором, должны проходить обязательный медицинский осмотр, согласно Постановления МЗ РБ № 33 «О порядке проведения обязательных медицинских осмотров работников».

4 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

4.1 Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках при длине волны 450 нм;

- встряхиватель для планшетов;
- вихревой смеситель;
- магнитная мешалка;
- пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками, позволяющими отбирать объемы жидкостей (100-500) и 1000 мкл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 3%);
- пипетки полуавтоматические многоканальные со сменными наконечниками. Позволяющие отбирать объемы жидкостей (50-200) мкл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 3%);
- пробирки пластмассовые с пробками в местимостью (3-5) мл;
- стакан стеклянный в местимостью 500 мл, 1 шт.;
- химически чистый флакон из темного стекла в местимостью 20 мл с завинчивающейся крышкой;
- флакон в местимостью 10 мл;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- вода дистиллированная;
- бумага фильтровальная.

5 ПОДГОТОВКА К ПРОВЕДЕНИЮ АНАЛИЗА

5.1 Перед проведением анализа компоненты набора и исследуемые образцы сыворотки крови необходимо выдержать при температуре в течение 1 ч.

5.2 Во флакон с КС внести 1,0 мл дистиллированной воды и тщательно перемешать, избегая образования пены.

5.3 Подготовка промывочного раствора

В стакан в местимостью 500 мл внести 400 мл дистиллированной воды, добавить содержимое флакона (20 мл) с КРП и тщательно перемешать на магнитной мешалке. В случае использования неполного набора стрипов, смешать 1 объем концентрата раствора для промывания планшета с 19 объемами дистиллированной воды.

ВНИМАНИЕ! При выпадении осадка солей в концентрате раствора для промывания планшета необходимо прогреть его при температуре (30-40) °С до полного растворения осадка

Промывочный раствор, подготовленный к использованию, может храниться в течение 4 недель при температуре (2-8) °С.

5.4 Подготовить хромоген-субстратного раствора

хромоген-субстратный раствор готовить непосредственно перед использованием.

В химически чистый флакон из темного стекла вместимостью 20 мл внести содержимое флакона с субстратным буферным раствором 16 мл и содержимое флакона с раствором ТМБ 0,8 мл тщательно перемешать. В случае использования неполного набора стрипов, расчет объема осуществлять из следующего соотношения: на 2 мл субстратного буферного раствора добавить 0,1 мл раствора ТМБ. хромоген-субстратный раствор хранению не подлежит.

ВНИМАНИЕ! Посуду и наконечники пипеток, контактирующие с раствором ТМБ, нельзя мыть синтетическими моющими средствами, так как даже их следы ведут к неконтролируемому разложению ТМБ в ходе реакции.

5.5 Определить количество лунок, необходимых для проведения контроля. Поместить стрипы в рамку. Неиспользованные стрипы хранить в тщательно закрытом пластиковом пакете.

5.6 Составить протокол маркировки лунок

Лунки в дубликатах промаркировать следующим образом:

C₀-C₅ - калибровочные пробы; C_к – контрольная сыворотка; C_х - исследуемые пробы сыворотки крови.

6 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

6.1 Схема анализа приведена в таблице 1. Последовательность проведения операций анализа не нарушать!

Таблица 1

Этапы проведения анализа	Проведение анализа
1 Внесение реагентов	Во все лунки внести по 0,1 мл (100 мкл) калибровочных проб, контрольной сыворотки и исследуемых проб. Внести во все лунки по 0,1 мл (100 мкл) буферного раствора.
2 Инкубация 1, промывка	Закрывать планшет крышкой или липкой лентой, встряхнуть в течение 30 с и инкубировать при температуре (18-25) °С в течение 1 ч. Промыть все лунки 4 раза по 0,3 мл (300 мкл) промывочным раствором.
3 Внесение конъюгата	Во все лунки внести по 0,2 мл (200 мкл) раствора конъюгата.
4 Инкубация 2, промывка	Закрывать планшет крышкой или липкой лентой, встряхнуть в течение 30 с и инкубировать при температуре (18-25) °С в течение 1 ч. Промыть все лунки 4 раза по 0,3 мл (300 мкл) промывочным раствором.
5 Завершение реакции, измерение	Внести во все лунки по 0,15 мл (150 мкл) свежеприготовленного хромоген-субстратного раствора. Инкубировать планшет в течение 20-30 мин в темноте при температуре (18-25) °С, в зависимости от степени развития окраски. Остановить реакцию внесением во все лунки по 0,1 мл (100 мкл) стоп-реагента. Встряхнуть планшет и измерить на спектрофотометре ОП раствора во всех лунках при длине волны 450 нм.

6.2 Отобрать из каждого флакона по 0,1 мл (100 мкл) и внести в соответствующие лунки C₀-C₅ – соответствующие калибровочные пробы; КС – соответствующую контрольную сыворотку; C_х - исследуемые пробы сыворотки крови.

6.3 Внести во все лунки по 0,1 мл (100 мкл) буферного раствора.

6.4 Закрывать планшет крышкой или липкой лентой, встряхнуть в течение 30 с и инкубировать при температуре (18-25)°С в течение 1 ч.

6.5 После окончания инкубации удалить жидкость из всех лунок.

Во все лунки внести по 0,3 мл промывочного раствора (п.5.3). Сразу после внесения удалить промывочный раствор. Повторить стадию промывки еще три раза. Промокнуть планшет, опрокинув его на фильтровальную бумагу и слегка постучав им. После промывки в нем не должно оставаться жидкости.

Для промывки лунок можно использовать автоматические промывающие устройства.

6.6 Внести во все лунки по 0,2 мл раствора конъюгата.

6.7 Закрывать планшет крышкой или липкой лентой, встряхнуть в течение 30 с и инкубировать при температуре (18-25)°С в течение 1 ч.

6.8 После окончания инкубации удалить жидкость из всех лунок.

Во все лунки внести по 0,3 мл промывочного раствора (п.5.3). Сразу после внесения удалить промывочный раствор. Повторить стадию промывки еще три раза. Промокнуть планшет, опрокинув его на фильтровальную бумагу и слегка постучав им. После промывки в нем не должно оставаться жидкости.

6.9 За (10-15) мин до окончания инкубации приготовить хромоген-субстратный раствор (п.5.4).

6.10 Сразу после промывки внести во все лунки по 0,15 мл (150 мкл) свежеприготовленного хромоген-субстратного раствора (п.5.4).

Время добавления хромоген-субстратного раствора не должно превышать 2 мин.

6.11 Инкубировать планшет в течение (20-30) мин при температуре (18-25) °С в темноте, в зависимости от степени развития окраски.

6.12 Остановить реакцию добавлением во все лунки по 0,1 мл (100 мкл) стоп-реагента.

Добавлять стоп-реагент во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и хромоген-субстратный раствор.

6.13 Встряхнуть планшет и измерить на спектрофотометре оптическую плотность (ОП) раствора во всех лунках при длине волны 450 нм.

Измерения провести не позднее 20 мин после остановки реакции.

7 УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА

7.1 Рассчитать средние арифметические значения ОП для каждой пары лунок

7.2 Построить калибровочную кривую в линейных координатах, откладывая на оси ординат значения оптической плотности (ОП), а по оси абсцисс – значения концентрации ПСА в нг/мл в соответствующих калибровочных пробах

7.3 Определить по калибровочной кривой концентрацию ПСА в нг/мл в контрольных и исследуемых сыворотках крови.

8 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

8.1 Специфичность

8.1.1 В наборе используются высокоспецифичные моноклональные антитела к свободному ПСА для иммобилизации на поверхности лунок и для получения конъюгата с пероксидазой хрена.

8.2 Чувствительность

8.2.1 Минимальная концентрация свободного ПСА, определяемая с помощью набора, составляет не более 0,1 нг/мл.

8.3 Воспроизводимость результатов

8.3.1 Коэффициент вариации результатов определения (n=10) концентрации свободного ПСА в образцах сыворотки крови с низким, средним и высоким содержанием свободного ПСА с использованием набора не превышает 10%.

8.4 Тест на "открытие"

8.4.1 Процент "открытия" свободного ПСА, добавленного в образцы сыворотки крови с известной концентрацией ПСА, составляет (80-120)%.

8.5 Клиническая проверка набора

8.5.1 Для определения концентрации свободного ПСА в сыворотке крови с помощью набора ИФА-ПСА-свободный рекомендуется выбирать те пробы, в которых концентрация общего ПСА находится в диапазоне (4-20) нг/мл, с последующим расчетом процентного соотношения (ПСА св./ПСА об. x 100%). У пациентов с ДПГЖ подобный коэффициент обычно составляет (≥20%), снижаясь при РТЖ (<15%). Обнаружение пограничного (15-20%) значения указанного соотношения сопряжено с необходимостью повторить исследования через шесть месяцев. При концентрации общего ПСА в диапазоне 4-10 нг/мл и соотношения ПСА св./ПСА об. <15% возникает основание предположить РТЖ. Для подтверждения диагноза необходимы дополнительные клинические исследования (например, биопсия).

Каждой лаборатории рекомендуется установить свои собственные значения референтных величин для диагностической оценки полученных результатов. Различия референтных величин могут быть связаны с особенностями населения, выбором референтных групп и используемой лабораторной техникой.

9 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

9.1 Компоненты набора ИФА-ПСА-свободный должны храниться при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности набора. Срок годности набора – 6 месяцев от даты изготовления набора.

9.2 Не следует держать реактивы на ярком свете во время хранения и инкубации.

9.3 Не смешивать реактивы из разных серий. Не использовать компоненты набора по истечении сроков годности.

9.4 Компоненты набора перед использованием необходимо выдержать при температуре (18-25) °С в течение 1 ч.

9.5 Определение концентрации свободного ПСА с помощью набора ИФА-ПСА-свободный проводят в сыворотке крови. Образцы сыворотки крови хранят при температуре (2-8) °С, если анализ проводился в течение 48 ч после взятия крови. Образцы сыворотки крови можно хранить при температуре минус 20 °С в течение более длительного времени. Допускается только однократное замораживание и размораживание образцов. Размораживание образцов проводится при комнатной температуре (18-25) °С. Образцы сыворотки крови с предполагаемым в высоким уровнем свободного ПСА «нулевой» калибровочной пробой, входящей в состав набора.

9.6 Для проведения анализа не следует использовать плазму крови, гемолизированную, мутную сыворотку, а также сыворотку с повышенным содержанием липидов.

9.7 Для отбора и добавления компонентов использовать полуавтоматические пипетки со сменными наконечниками, аттестованные на точность по значению средней дозы и воспроизводимость результатов пипетирования.

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