

«УТВЕРЖДАЮ»

Руководитель Департамента
государственного контроля
лекарственных средств и
медицинской техники МЗ РФ
_____ В.Е. Акимочкин
«04» августа 2003 г.

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

Рекомендована Комиссией по наборам реагентов
для иммуноферментного (неинфекционные),
радиоиммунологического и других видов
иммунохимического анализа Комитета по
новой медицинской технике МЗ РФ
(протокол № 3 от 24 марта 2003 г.)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «ОнкоИФА-общий ПСА» предназначен для количественного определения общего простат-специфического антигена (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.

Было 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.

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

2. РАБОТЫ НАБОРА

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 конъюги-

ровано 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 его с конъюгатом. При удалении содержимого из лунок и промывке происходит удаление избытка конъюгата анти-ПСА-пероксидаза, не связавшегося с иммобилизованным в ходе инкубации ПСА. Количество связавшегося конъюгата прямо пропорционально количеству ПСА в исследуемом образце.

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

3. СОСТАВ НАБОРА

- комплект из двенадцати восьмилуночных стрипов в рамке с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок антителами к ПСА, маркирован «Стрипы с иммобилизованными антителами к ПСА» — 1 пакет;
- калибровочные пробы на основе сыворотки крови, содержащие известные количества ПСА. Концентрации ПСА в калибровочных пробах указаны на этикетках флаконов — 6 флаконов (по 0,5 мл);
- конъюгат анти-ПСА-пероксидаза, маркирован «Конъюгат Е» — 1 флакон (14 мл);
- концентрированный буферный раствор для промывки лунок, маркирован «Буфер Р» — 1 флакон (20 мл);
- раствор тетраметилбензидина, маркирован «Раствор ТМБ» — 1 флакон (14 мл);
- стоп-реагент, маркирован «Стоп-реагент» — 1 флакон (14 мл);
- контрольная сыворотка с известным содержанием ПСА, маркирована «Контрольная сыворотка» — 1 флакон (0,5 мл).

4. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

- 4.1. Специфичность.** Оба моноклональных антитела, использованные в наборе демонстрируют эквимоллярное взаимодействие, как со свободным ПСА так и с ПСА-АХТ комплексом.
- 4.2. Коэффициент вариации результатов определения ПСА** в одном и том же образце с использованием набора «ОнкоИФА-общий ПСА» не превышает 8%.
- 4.3. Точность.** Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» ПСА — соответствие измеренной концентрации ПСА предписанной в пробе, полученной путем смешивания равных объемов Контрольной сыворотки и калибровочной пробы №3. Процент открытия составляет ± 10 .
- 4.4. Чувствительность.** Минимальная достоверно определяемая набором концентрация ПСА в сыворотке крови человека не превышает 0,3 нг/мл.
- 4.5. Клиническая проверка.** Диапазон значений концентраций ПСА до 4 нг/мл был определен как нормальный. Концентрация ПСА от 4 нг/мл до 10 нг/мл характерны для

незлокачественных урологических заболеваний; выше — для злокачественных опухолей простаты.

4.6. Рекомендуется в каждой лаборатории при использовании набора уточнить значения концентраций ПСА, соответствующие нормальным.

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

5.1. Потенциальный риск применения набора — класс 2а.

5.2. Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

5.3. 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.

5.4. Стоп-реагент представляет собой 1N раствор соляной 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 водопроводной воды.

5.5. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, т.к. производные крови человека являются потенциально инфицированным материалом, способным длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель инфекций.

5.6. Химическая посуда и оборудование, которые используются в работе с набором, должны быть соответствующим образом маркированы и храниться отдельно.

5.7. Запрещается прием пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами.

6. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ:

- Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в стрипах при длине волны 450 нм;
- одноканальные пипетки с изменяемым объемом отбора жидкостей: на 20–50 мкл 40–200 мкл; 200–1000 мкл; 1000–5000 мкл с наконечниками;
- восьмиканальная пипетка, позволяющая отбирать объемы жидкости до 300 мкл с наконечниками;
- прибор для встряхивания рамки со стрипами (термостатируемый шейкер), позволяющий производить встряхивание со скоростью 500–800 об/мин при температуре +37°C;
- мерные цилиндры, позволяющие отмерять 200 мл;
- стаканы стеклянные вместимостью 300 мл;
- дистиллированная вода;

- фильтровальная бумага;
- перчатки резиновые или пластиковые.

7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

7.1. Калибровочные пробы и контрольная сыворотка готовы к использованию.

7.2. Стрипы. Перед вскрытием пакет со стрипами необходимо выдержать при комнатной температуре (+18...25°C) в течение 30 минут. Открыть пакет и переставить на свободную рамку необходимое количество стрипов. Оставшиеся стрипы хранить в пакете с герметично закрытым замком при температуре +2...8°C в течение всего срока годности.

7.3. Конъюгат анти-ПСА-пероксидаза готов к использованию.

7.4. Промывочныйбуфер. Необходимое количество Буфера Р развести дистиллированной водой в 10 раз.

Например: 5 мл БуфераР + 45 мл дистиллированной воды.

Тщательно перемешать, избегая пенообразования. Хранить закрытым при комнатной температуре не более 5суток. Оставшийся неиспользованным БуферР хранить закрытым при температуре +2...8°C в течение всего срока годности.

7.5. Раствор ТМБ готов к использованию.

7.6. Стоп-реагент готов к использованию.

8. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

8.1. Все реагенты перед проведением анализа должны быть тщательно перемешаны и доведены до комнатной температуры (+18...25°C). На последней странице приведена схема проведения анализа.

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

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

8.3. Во все лунки, кроме лунок A1 и A2, внести по 100 мкл раствора конъюгата анти-ПСА-пероксидаза.

8.4. Внести в соответствующие лунки по 20 мкл калибровочных проб и контрольной сыворотки, в оставшиеся лунки по 20 мкл исследуемой сыворотки крови в дубликатах.

8.5. Инкубировать стрипы 1 час при встряхивании в термостатируемом шейкере при температуре +37°C со скоростью 500–800 об/мин.

8.6. По окончании инкубации удалить содержимое лунок декантированием и промыть лунки пять раз. При каждой промывке во все лунки добавить по 300 мкл промывочного буфера, приготовленного по п.7.4, встряхнуть рамку на шейкере в течение 5–10 сек. с последующим декантированием. После последнего декантирования тщательно удалить остатки жидкости из лунок постукиванием рамки со стрипами в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

8.7. Немедленно внести во все лунки по 100 мкл раствора тетраметилбензидина. Инкубировать стрипы в темноте в течение 15–30 мин. в зависимости от степени развития окраски.

8.8. 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, встряхивать на шейкере 1–2 мин.

8.9. Измерить на фотометре вертикального сканирования оптическую плотность в лунках при 450 нм. Если программа фотометра позволяет вычитать величину оптической плотности в лунках А1 и А2 из значений оптических плотностей всех остальных лунок, то для дальнейших расчетов необходимо использовать величину В—среднее значение оптической плотности в лунках, содержащих калибровочные или исследуемые пробы. В линейных координатах построить для калибровочных проб график зависимости В (ед.опт.плотн.) от концентрации ПСА в калибровочных пробах (нг/мл).

Если фотометр не позволяет вычитать величину оптической плотности лунок А1 и А2, то необходимо пользоваться формулой $B - B_T$, где B_T — среднее значение оптической плотности лунок А1 и А2.

Определить содержание ПСА в пробах по калибровочному графику.

8.10. Если по техническим причинам невозможно измерить оптическую плотность в лунках планшета непосредственно после выполнения п. 8.8, то следует иметь в виду, что окраска в лунках планшета стабильна в течение **20 минут** при температуре +2...8°C.

9. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

9.1. Набор «ОнкоИФА-общийПСА» должен храниться при температуре +2...8°C в течение всего срока годности. Допускается хранение набора при температуре до +25°C не более 5 суток.

Срок годности набора — 12 месяцев.

В случае дробного использования компоненты набора необходимо хранить следующим образом:

- стрипы хранить в герметично закрытом пакете с замком при температуре +2...8°C в течение всего срока годности;
- калибровочные пробы и контрольную сыворотку после вскрытия флаконов хранить не более 1 месяца при температуре +2...8° С;
- конъюгат анти-ПСА-пероксидаза и раствор ТМБ после вскрытия флаконов хранить не более 1 месяца при температуре +2...8° С;
- промывочный буфер, подготовленный к использованию, хранить закрытым не более 5 суток при комнатной температуре (+18...25° С);

· БуферР и стоп-реагент после вскрытия флаконов хранить при температуре +2...8° С в течение всего срока годности.

9.2. Для проведения анализа не следует использовать плазму крови, гемолизированную, мутную сыворотку, а также сыворотку, содержащую азид натрия.

9.3. Пробы сыворотки крови хранить при температуре +2...8° С не более 2 дней; при необходимости более длительного хранения — при температуре –20°С и ниже. Избегать повторных циклов замораживания-размораживания.

9.4. При использовании набора для проведения нескольких независимых серий анализов необходимо иметь в виду, что для каждого независимого эксперимента необходимо построение нового калибровочного графика и рекомендуется определение концентрации ПСА в контрольной сыворотке.

9.5. Запрещается использовать стоп-реагенты из наборов реагентов других фирм-производителей.

9.6. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции.

По вопросам качества набора «ОнкоИФА-общийПСА» обращаться по адресу: 189650, г.Санкт-Петербург, пос. Песочный-2, ул. Ленинградская, д. 70/4, телефон/ факс: (812) 596-67-80, или в ИГКЛС НЦ ЭГКЛС МЗ РФ по адресу: 117246, г. Москва, Научный проезд, д.14А, телефон: (095) 120-60-95.

СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

Стадия анализа и реагенты	Номер пары лунок в соответствии с маркировкой по п. 8.2.								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9–48
Конъюгат анти-ПСА-пероксидаза, мкл	–	100	100	100	100	100	100	100	100
КП № 1, мкл	–	20	–	–	–	–	–	–	–
КП № 2, мкл	–	–	20	–	–	–	–	–	–
КП № 3, мкл	–	–	–	20	–	–	–	–	–
КП № 4, мкл	–	–	–	–	20	–	–	–	–
КП № 5, мкл	–	–	–	–	–	20	–	–	–
КП № 6, мкл	–	–	–	–	–	–	20	–	–
КС, мкл	–	–	–	–	–	–	–	20	–
С _х , мкл	–	–	–	–	–	–	–	–	20
Инкубация №1	1 час, термостатируемый шейкер, +37°С								
5-кратная промывка: промывочный буфер, мкл	5x 300	5x 300	5x 300	5x 300	5x 300	5x 300	5x 300	5x 300	5x 300
Раствор ТМБ, мкл	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Инкубация №2	КТ, темное место, 15-30 минут								
Стоп-реагент, мкл	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Перемешивание	Шейкер, 1–2 минуты								
Измерение ОП р-ров в лунках стрипов	Фотометр, 450 нм								
Расчет результатов	Калькулятор и масштабная бумага либо соответствующая компьютерная программа								

Примечания:

КП — калибровочная проба;

КС — контрольная сыворотка;

С_х — анализируемые пробы;

ОП — оптическая плотность;

КТ — комнатная температура (+18...25°C).

Инструкция составлена:

В.А. Головаченко, зав. лабораторией биотехнологий ЗАО «Алкор Био»;

Д.Г. Польшевым, ген. директором ЗАО «Алкор Био»;

Н.Н. Ткаченко, сотрудником НИИАГ им. Д.О. Отта РАМН.