

«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
СВОБОДНОГО ПРОСТАТ-СПЕЦИФИЧЕСКОГО АНТИГЕНА
В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА
(ОнкоИФА-свободный 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-свободный ПСА» предназначен для количественного определения свободной фракции простат-специфического антигена (свободного ПСА) в сыворотке крови человека 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 α_1 -антихимотрипсином (ПСА-АХТ). Однако существует большая разница в соотношении свободного ПСА и комплекса ПСА-АХТ среди различных групп пациентов. Доля свободного ПСА в случае доброкачественной гиперплазии выше, чем при раке простаты.

1.3. Набор «ОнкоИФА-свободный 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. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА.

В лунках, при добавлении исследуемого образца и аналитического буфера, 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 раствором 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 определяемых образцах.

3. СОСТАВ НАБОРА

- комплект из двенадцати восьмилуночных стрипов в рамке с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок антителами к свободному ПСА, маркирован «Стрипы с иммобилизованными антителами к свободному ПСА» — 1 пакет;
- калибровочные пробы на основе сыворотки крови, содержащие известные количества свободного ПСА; значения концентраций свободного ПСА в калибровочных пробах указаны на этикетках флаконов — 6 флаконов (по 0,5);
- аналитический буфер, маркирован «БуферА» — 1 флакон (14 мл);
- конъюгат анти-ПСА-пероксидаза, маркирован «Конъюгат Е» — 1 флакон (14 мл);
- концентрированный буферный раствор для промывки лунок, маркирован «БуферР» — 2 флакона (по 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 свободного ПСА, маркирована «Контрольная сыворотка» — 1 флакон (0,5 мл).

4. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

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

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

4.3. 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 №3. Процент открытия составляет 90–110.

4.4. Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая набором концентрация свободного ПСА в сыворотке крови человека не превышает 0,1 нг/мл.

4.5. 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 уровнем общего ПСА. Отношение концентрации свободного ПСА к концентрации общего ПСА выражается в процентах и имеет вид:

Концентрация свободного ПСА X 100%

Концентрация общего ПСА

Значение соотношения концентраций свободного и общего ПСА ниже определенного уровня (по данным литературы — 14–16%) с большой вероятностью свидетельствует о наличии рака предстательной железы.

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

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 вирусных 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 40–200мкл; 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;

- мерный цилиндр, позволяющий отмерять 400 мл;
- стакан стеклянный вместимостью 500 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. Промывочный буфер. 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 (+18...25°C) не более 5 суток. Оставшийся неиспользованным БуферР хранить закрытым при температуре +2...8°C в течение всего срока годности.

7.4. БуферА готов к использованию.

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

7.6. Раствор ТМБ готов к использованию.

7.7. Стоп-реагент готов к использованию.

8. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

8.1. Все реагенты перед проведением анализа должны быть тщательно перемешаны и доведены до комнатной температуры. 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 А1 и А2, внести по 100 мкл Буфера А.
- 8.4.** Внести в соответствующие лунки по 50 мкл калибровочных проб и контрольной сыворотки, в оставшиеся лунки по 50 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. 7.3, 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.** Во все лунки, кроме лунок А1 и А2, немедленно внести по 120 мкл раствора конъюгата анти-ПСА-пероксидаза.
- 8.8.** Инкубировать стрипы согласно п.8.5.
- 8.9.** По окончании второй инкубации удалить содержимое лунок декантированием и промыть лунки согласно п.8.6.
- 8.10.** 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.
- 8.11.** Добавить во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор тетраметилбензидина, по 100 мкл стоп-реактанта для остановки ферментной реакции, встряхивать на шейкере 1–2 мин.
- 8.12.** Измерить на фотометре вертикального сканирования оптическую плотность в лунках при 450нм. 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 B — среднее значение оптической плотности в лунках, содержащих калибровочные или исследуемые пробы. В линейных координатах построить для калибровочных проб график зависимости B (ед. опт.плотн.) от концентрации свободного 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 свободного ПСА в пробах по калибровочному графику.

- 8.13.** Если по техническим причинам невозможно измерить оптическую плотность в лунках планшета непосредственно после выполнения п.8.11, 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-свободныйПСА» 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.

С _х , мкл	–	–	–	–	–	–	–	–	50
Инкубация № 1	1 час, термостатируемый шейкер, +37°C								
5-кратная промывка: промывочный буфер, мкл	5х 300	5х 300	5х 300	5х 300	5х 300	5х 300	5х 300	5х 300	5х 300
Конъюгат анти-ПСА- пероксидаза, мкл	–	120	120	120	120	120	120	120	120
Инкубация № 2	1 час, термостатируемый шейкер, +37°C								
5-кратная промывка: промывочный буфер, мкл	5х 300	5х 300	5х 300	5х 300	5х 300	5х 300	5х 300	5х 300	5х 300
Раствор ТМБ, мкл	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Инкубация № 3	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. Полынцевым, ген. директором ЗАО «Алкор Био»;

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