



Унитарное предприятие
"Хозрасчетное опытное производство
Института биоорганической химии
Национальной академии наук Беларуси"
Республика Беларусь
220141, г. Минск, ул. академика Купревича, 5, корп. 3
Факс (10 375 17) 263-62-57

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

ИРМА-ПСА-СТ

Утверждена Министерством здравоохранения Республики Беларусь
03.03.2009 г.

1 НАЗНАЧЕНИЕ НАБОРА

1.1 Набор ИРМА-ПСА-СТ предназначен для определения концентрации специфического антигена предстательной железы (ПСА) в сыворотке крови человека методом иммунорадиометрического анализа. Набор предназначен для применения только "in vitro".

1.2 ПСА – гликопротеин с молекулярной массой 33-34 кДа, обладающий протеазной активностью. Ферментативно активная форма ПСА образует комплекс с сывороточным ингибитором протеаз α_1 -антихимотрипсином. В сыворотке крови ПСА находится в основном в связанной с α_1 -антихимотрипсином форме. ПСА образует комплексы и с другими сывороточными ингибиторами протеаз, например, с α_2 -макроглобулином, но в этом комплексе ПСА недоступен для антител и, вследствие этого, не определяется в иммунохимическом анализе. В сыворотке ПСА присутствует также в свободной, не связанной с ингибиторами форме. Эта форма ПСА не обладает ферментативной активностью и поэтому не взаимодействует с сывороточными ингибиторами протеаз. Таким образом, общий иммунологически активный ПСА в сыворотке включает свободный ПСА и ПСА в комплексе с α_1 -антихимотрипсином.

Имунохимический анализ свободного и связанного с α_1 -антихимотрипсином ПСА должен быть эквивалентным – то есть, определение общего ПСА в сыворотке не должно зависеть от относительной концентрации свободного и связанного с α_1 -антихимотрипсином ПСА.

Высокая концентрация ПСА (>10 нг/мл) характерна для малигнизированных простатических тканей. Концентрация ПСА значительно повышается у пациентов с метастазами в кости. Определение уровня ПСА необходимо при наблюдении за пациентами во время лечения и ремиссии. По изменению концентрации ПСА можно определять чувствительность пораженной простатической ткани к лучевой терапии, химиотерапии и гормональному лечению. Однако интерпретацию данных о концентрации ПСА необходимо всегда проводить с учетом других клинических данных.

2 ХАРАКТЕРИСТИКА И ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

2.1 Состав набора:

- [125 I]-моноклональные антитела к ПСА, жидкий препарат, готов к использованию, 1 флакон, 17 мл;
- пробирки полистирольные с иммобилизованными моноклональными антителами к ПСА, готовы к использованию, 100 шт.;
- калибровочные пробы ПСА на основе буферной системы, соответствующие следующим концентрациям ПСА: 0 (C_0), 1 (C_1), 3 (C_2), 10 (C_3), 30 (C_4), 100 (C_5) нг/мл (точные значения концентраций ПСА указываются на этикетках флаконов), жидкие препараты, готовы к использованию, калибровочная проба C_0 – 2 мл, 1 флакон; калибровочные пробы (C_1 - C_5) – 5 флаконов по 0,5 мл; калибровочные пробы ПСА откалиброваны относительно международного стандарта ВОЗ общего ПСА (код 96/670), включающего 90% связанного с α_1 -антихимотрипсином ПСА и 10% свободного ПСА;
- концентрат промывочного раствора, 1 флакон, 21,0 мл;
- контрольная сыворотка (КС) - лиофилизированный препарат, содержащий известное количество ПСА, 1 флакон.

2.2 Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 43 неизвестных проб, 6 калибровочных проб и 1 пробы контрольной сыворотки, всего 100 определений.

2.3 Продолжительность анализа 2 часа. Диапазон определяемых концентраций ПСА – (1-100) нг/мл.

2.4 Набор ИРМА-ПСА-СТ обеспечивает эквивалентное определение свободной и связанной форм ПСА.

2.5 В основе определения ПСА лежит иммунорадиометрический метод в котором используются 2 моноклональных антитела к двум разным эпитопам молекулы ПСА. Образцы или калибровочные пробы инкубируют в пробирках, покрытых моноклональными антителами, совместно с мечеными [125 I]-моноклональными антителами. После инкубации жидкое содержимое пробирок удаляют и промывают пробирки для устранения несвязанных меченых антител. Связанную радиоактивность измеряют гамма-счетчиком. Строят калибровочную кривую зависимости связанной радиоактивности от концентрации ПСА в калибровочных пробах, и с ее помощью определяют концентрацию ПСА в исследуемых образцах.

3 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

3.1 [125 I]-моноклональные антитела к ПСА являются источником мягкого гамма-излучения. Период полураспада изотопа [125 I] – 60,1 суток.

3.2 При работе с набором следует соблюдать правила работы с радиоактивными веществами (РВ) (Нормы радиационной безопасности ГН 2.6.1.8-127 и Основные санитарные правила обеспечения радиационной безопасности СанПиН 2.6.1.8-8).

ВНИМАНИЕ! Химическая посуда и оборудование, которые используются при работе с РВ, должны быть соответствующим образом маркированы и храниться отдельно.

Запрещается при работе с РВ иметь на рабочем месте постороннее оборудование и личные вещи.

Категорически запрещается прием пищи, использование косметических принадлежностей и курение в помещениях, предназначенных для работы с РВ.

3.3 При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые перчатки, т.к. образцы человеческой крови следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита В или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

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

**4 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ,
НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА**

- 4.1 Гамма-счетчик колодезного типа;
- прибор для встряхивания пробирок вибрационного типа;
- водоструйный насос типа КМ-1230;
- магнитная мешалка;
- пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкостей 0,05, 0,15 и 2,0 мл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 3%);
- пробирки пластмассовые вместимостью 3-5 мл с пробками – 2 шт.;
- штатив для пробирок;
- стакан химический мерный вместимостью 1000 мл или колба плоскодонная вместимостью 500 мл;
- вода дистиллированная;
- перчатки резиновые хирургические.

5 ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

5.1 Компоненты набора перед использованием необходимо выдержать при температуре (18-25) °С в течение 30 мин.

5.2 Внести в колбу вместимостью 500 мл с помощью стакана химического мерного 400 мл дистиллированной воды, добавить содержимое флакона с концентратом промывочного раствора и тщательно перемешать на магнитной мешалке.

Разбавленный промывочный раствор может храниться при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности набора.

5.3 Во флакон, содержащий контрольную сыворотку, внести дистиллированную воду в объеме, указанном на этикетке флакона. Через 10 мин осторожно перемешать содержимое флакона, избегая образования пены.

Контрольную сыворотку можно хранить при температуре (2-8) °С в течение 24 ч. Избегать повторного замораживания и оттаивания образцов.

6 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

6.1 Пробирки с иммобилизованными моноклональными антителами к ПСА маркировать следующим образом (в дубликатах): V_0 - V_6 – калибровочные пробы ПСА; $V_{КС}$ – контрольная сыворотка; V_X – исследуемые пробы сыворотки или плазмы крови;

6.2 В пробирки V_0 - V_6 внести по 0,05 мл (50 мкл) соответствующих калибровочных проб. В пробирки $V_{КС}$ внести по 0,05 мл (50 мкл) контрольной сыворотки. В пробирки V_X внести по 0,05 мл (50 мкл) исследуемых сывороток крови.

6.3 Во все пробирки внести по 0,15 мл (150 мкл) [125 I]-моноклональных антител к ПСА.

6.4 Инкубировать все пробирки в течение 2 ч при температуре (18-25) °С в постоянном встряхивании на приборе для встряхивания пробирок (не менее 350 встряхиваний в минуту).

6.5 После окончания инкубации тщательно удалить из всех пробирок жидкость с помощью водоструйного насоса. Во все пробирки внести по 2 мл промывочного раствора, приготовленного по п.5.2. Сразу после внесения удалить промывочный раствор из всех пробирок с помощью водоструйного насоса. Повторить стадию промывки.

После промывки в пробирках не должно оставаться следов окрашенной жидкости.

6.6 Все пробирки поместить в гамма-счетчик и измерить скорость счета [125 I] в каждой пробирке в течение 1 мин.

6.7 Последовательность внесения реагентов в пробирки и проведение других операций анализа приведены в таблице 1. Данную последовательность не нарушать!

Таблица 1

Пробирки (в дубликатах)	Последовательность операций			После инкубации аккуратно удалить из всех пробирок жидкость с помощью водоструйного насоса
	Калибровочные пробы, контрольные и исследуемые сыворотки, мл	[125 I]-моноклональные антитела к ПСА, мл	Инкубировать в течение 2 ч при температуре (18-25) °С и постоянном встряхивании	
V_0 - V_6	0,05	0,15		
$V_{КС}$	0,05	0,15		
V_X	0,05	0,15		

Продолжение таблицы 1

Пробирки (в дубликатах)	Последовательность операций				
	Промывочный раствор, мл	Сразу удалить раствор с помощью водоструйного насоса	Промывочный раствор, мл	Сразу удалить раствор с помощью водоструйного насоса	Измерить скорость счета [125 I] в каждой пробирке в течение 1 мин.
V_0 - V_6	2,0		2,0		
$V_{КС}$	2,0		2,0		
V_X	2,0		2,0		

7 РАСЧЕТЫ И ГРАФИЧЕСКИЕ ПОСТРОЕНИЯ

7.1 Найти средние арифметические значения скоростей счета [125 I] для каждой пары пробирок и рассчитать величину отношения V_i/V_0 для каждой калибровочной пробы, контрольной или исследуемой сыворотки,

где V_i – среднее арифметическое значение скорости счета [125 I] в пробирках V_1 - V_6 , $V_{КС}$ или V_X .

7.2 Построить калибровочную кривую в полулогарифмических координатах, откладывая на оси ординат (линейная) значения V_i (имп/мин) или отношение V_i/V_0 , а по оси абсцисс (логарифмическая) – значения концентраций 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

В наборе ИРМА-ПСА-СТ используются высокоспецифичные моноклональные антитела к ПСА для иммобилизации на твердофазном носителе и для мечения йодом-125.

8.2 Чувствительность анализа

Минимальная концентрация ПСА, определяемая с помощью набора, составляет 0,2 нг/мл.

8.3 Воспроизводимость результатов

Коэффициент вариации результатов определений ($n=10$) концентрации ПСА в образцах сыворотки крови с низким, средним и высоким содержанием ПСА не превышает 8%.

8.4 Тест на "открытие".

Процент "открытия" ПСА, добавленного в образцы сыворотки крови с известной концентрацией ПСА, составляет 85-115%.

8.5 Тест на параллелизм.

Кривая, отражающая разведение контрольной сыворотки с высоким содержанием ПСА, параллельна стандартной калибровочной кривой.

8.6 Клиническая проверка набора.

При использовании набора ИРМА-ПСА-СТ концентрация ПСА в сыворотке крови здоровых лиц находится в диапазоне (0-4) нг/мл. Концентрации ПСА от 4 до 10 нг/мл характерны для больных с доброкачественной гиперплазией и доброкачественной опухолью простаты, концентрации ПСА выше 10 нг/мл – для больных со злокачественными опухолями простаты.

9. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

9.1. Компоненты набора должны храниться в чистом, сухом помещении при температуре (2 – 8) °С в течение всего срока годности набора.

9.2. Определение концентрации ПСА с помощью набора ИРМА-ПСА-СТ проводят в сыворотке крови человека.

Образцы сыворотки крови хранят при температуре (2-8) °С, если анализ проводят в течение 24 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 проводят при комнатной температуре.

Образцы сыворотки крови с предполагаемым высоким уровнем ПСА рекомендуется разводить "нулевой" калибровочной пробой (C_0), входящей в состав набора.

9.3. Исследуемые образцы сыворотки крови следует проверять на остаточную активность радионуклидов, если обследуемому лицу до отбора крови вводили радиоактивные препараты.

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

9.5. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора и квалифицированное проведение анализа.