



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

220141, г. Минск, ул. академика Купревича, 5, корп. 3
Тел. (017) 268-11-51, факс (017) 263-62-57

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

ИРМА-ПСА свободный-СТ

Утверждена Министерством здравоохранения Республики Беларусь
30.06.2010 г.

1 НАЗНАЧЕНИЕ НАБОРА

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

1.2 Специфический антиген предстательной железы (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, 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 с α_2 -макроглобулином. α_1 -Антихимотрипсин и α_2 -макроглобулин являются внеклеточными ингибиторами протеаз, которые синтезируются в печени и присутствуют в сыворотке крови в (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 нелеченным 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:

- [125 I]-моноклональные антитела к ПСА, жидкий препарат, готов к использованию, 1 флакон, 17 мл;
- пробирки полистирольные с иммобилизованными моноклональными антителами к свободному ПСА, готовы к использованию, 100 шт.;
- калибровочные пробы в диапазоне концентраций свободного ПСА (0; 0,3-30) нг/мл (точные значения концентрации свободного ПСА указываются на этикетках флаконов), жидкие препараты, готовы к использованию, калибровочная проба C_0 – 1 флакон, 2 мл, калибровочные пробы (C_1 - C_5) – 5 флаконов по 0,5 мл. Калибровочные пробы ПСА откалиброваны относительно международных стандартов ВОЗ: свободного ПСА (код 96/668) и общего ПСА (код 96/670);
- концентрат промывочного раствора, 1 флакон, 21 мл;
- контрольная сыворотка (КС) - лиофилизированный препарат, содержащий известное количество свободного 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 2,5 ч.

2.4 Диапазон определяемых концентраций свободного ПСА – (0,3-30) нг/мл.

2.5 Набор ИРМА-ПСА свободный-СТ обеспечивает эквимлярное определение свободной и связанной форм ПСА.

2.6 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 (далее-РВ) согласно требованиям ГН 2.6.1.8-127 и 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 спецодежду (халаты) и одноразовые резиновые перчатки, т.к. образцы человеческой крови следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

3.4 Работы проводить с соблюдением мер предосторожности в соответствии с требованиями, предусмотренными 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.

3.5 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;
- магнитная мешалка;
- пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкостей от 0,10 до 2,00 мл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 3%);
- штатив для пробирок;
- стакан химический вместимостью 1000 мл;
- 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 В колбу вместимостью 500 мл внести 400 мл дистиллированной воды, добавить содержимое флакона с концентратом промывочного раствора и тщательно перемешать на магнитной мешалке.

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

5.3 Во флакон, содержащий КС, внести 1,0 мл дистиллированной воды. Через 30 мин осторожно перемешать содержимое флакона, избегая образования пены.

Контрольную сыворотку можно хранить при (2-8) °С в течение 24 ч. При необходимости более длительного хранения, контрольную сыворотку следует разделить на несколько аликвот и заморозить при температуре не менее минус 20 °С. Избегать повторного замораживания и оттаивания образцов.

6 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

6.1 Пробирки с иммобилизованными моноклональными антителами к свободному ПСА маркировать следующим образом (в дубликатах): V_0 - V_5 – калибровочные пробы свободного ПСА; $V_{КС}$ – контрольная сыворотка; V_x – исследуемые пробы сыворотки крови;

6.2 В пробирки V_0 - V_5 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 0,150 мл (150 мкл) ^{125}I -моноклональных антител к ПСА.

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

6.5 После окончания инкубации тщательно удалить из всех пробирок жидкость с помощью водоструйного насоса. Во все пробирки внести по 2 мл промывочного раствора (см. 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		Содержимое пробирок тщательно перемешать. Инкубировать при постоянном встряхивании в течение 2 ч при температуре (18-25)°С
	Калибровочные пробы, контрольные и исследуемые сыворотки, мл	^{125}I -моноклональные антитела к ПСА, мл	
V_0 - V_5	0,05	0,150	
$V_{\text{КС}}$	0,05	0,150	
$V_{\text{Х}}$	0,05	0,150	

Продолжение таблицы 1

Пробирки (в дубликатах)	Последовательность операций			
	После инкубации тщательно удалить из всех пробирок жидкость с помощью водоструйного насоса	Промывочный раствор, мл	Сразу удалить раствор с помощью водоструйного насоса. Повторить стадию промывки	Измерить скорость счета ^{125}I в каждой пробирке в течение 1 мин
V_0 - V_5		2,0		
$V_{\text{КС}}$		2,0		
$V_{\text{Х}}$		2,0		

7 РАСЧЕТЫ И ГРАФИЧЕСКИЕ ПОСТРОЕНИЯ

7.1 Найти средние арифметические значения скоростей счета ^{125}I для каждой пары пробирок и рассчитать величину 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_5 , $V_{\text{КС}}$ или $V_{\text{Х}}$.

7.2 Построить калибровочную кривую в полулогарифмических координатах, откладывая на оси ординат (линейная) отношения V_i/V_0 (или V_i в имп/мин), а по оси абсцисс (логарифмическая) – значения концентраций ПСА в нг/мл в соответствующих калибровочных пробах.

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 свободный-СТ используются высокоспецифичные моноклональные антитела к свободной форме ПСА для иммобилизации на твердофазном носителе и для меченая йодом-125.

8.2 Чувствительность анализа

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

8.3 Воспроизводимость результатов

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

8.4 Тест на "открытие"

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

8.5 Клиническая проверка набора

Для определения концентрации свободного ПСА в сыворотке крови с помощью набора ИРМА-ПСА свободный-СТ рекомендуется выбрать те пробы, концентрация общего ПСА в которых находится в диапазоне (4-15) нг/мл. В случае получения коэффициента (свободный ПСА/общий ПСА) меньше 0,20, повышается вероятность злокачественного заболевания. Для подтверждения диагноза необходимы дополнительные клинические исследования (например, биопсия и т.п.).

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 должны храниться при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности набора.

9.2 Определение концентрации свободного ПСА с помощью набора ИРМА-ПСА свободный-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 не менее 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 свободного 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 достоверных результатов необходимо строго соблюдать инструкции по применению набора и квалифицированное проведение анализа.