



Унитарное предприятие
"Хозрасчетное опытное производство
Института биорганической 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
СПЕЦИФИЧЕСКОГО АНТИГЕНА ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ
ЖЕЛЕЗЫ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА
МЕТОДОМ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА**

ИФА-ПСА

Утверждена Министерством здравоохранения Республики Беларусь
17.05.2010 г.

1 НАЗНАЧЕНИЕ НАБОРА

1.1 Набор ИФА-ПСА предназначен для определения концентрации 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 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 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:

- конъюгат – моноклональные антитела к ПСА, меченые пероксидазой хрена, жидкий препарат, 1 флакон, 22 мл;
- иммуносорбент - 96-луночный планшет (12 стрипов по 8 лунок) с иммобилизованными моноклональными антителами к ПСА, готов к использованию, 1 шт.;
- шесть калибровочных проб ПСА на основе буферной системы, соответствующих следующим концентрациям ПСА: 0 нг/мл (C_0), 1 нг/мл (C_1), 3 нг/мл (C_2), 10 нг/мл (C_3), 30 нг/мл (C_4), 100 нг/мл (C_5) (точные значения концентраций ПСА указываются на этикетках флаконов), жидкие препараты, готовы к использованию, калибровочные пробы C_0 - C_5 – 6 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;
- КС - контрольная сыворотка, содержащая известное количество ПСА, лиофилизированный препарат, 1 флакон;
- буферный раствор, 1 флакон, 22 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 ПСА (0-100) нг/мл.

2.4 Набор ИФА-ПСА обеспечивает эквивалентное определение свободной 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 эндгенного ПСА сыворотки крови с иммобилизованными моноклональными антителами к ПСА. При удалении содержимого из лунок происходит разделение свободного и связанного антителами ПСА. Во время второй инкубации конъюгат связывается с ПСА, иммобилизованным в ходе первой инкубации. При удалении содержимого из лунок происходит удаление избытка 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 ПСА в образце сыворотки крови. На основании калибровочной кривой рассчитывается концентрация 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;

- термостат, поддерживающий температуру (37 ± 1) °C;

- 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;

- флаконы 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 $(18-25)$ °C в течение 1 ч.

5.2 Во флакон с КС внести 0,5 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 КРП 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 Подготовка хромоген-субстратного раствора.

Готовят непосредственно перед использованием.

В химически чистый флакон из темного стекла в местимостью 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 0,05 мл (50 мкл) калибровочных проб, контрольной сыворотки и исследуемых проб. Внести во все лунки по 0,15 мл (150 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 раз 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 раз 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 0,05 мл (50 мкл) и внести в соответствующие лунки

C₀-C₅ – соответствующие калибровочные пробы; C_к – соответствующую контрольную сыворотку; C_х- исследуемые пробы сыворотки крови.

6.3 Внести во все лунки по 0,15 мл (150 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 промывочные 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 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

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

8.2 Чувствительность

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

8.3 Воспроизводимость результатов

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

8.4 Тест на "открытие"

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

8.5 Клиническая проверка набора

8.5.1 При использовании набора ИФА-ПСА 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. Рекомендуется в каждой лаборатории уточнить значения концентраций ПСА, соответствующие нормальным.

9 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

9.1 Компоненты набора ИФА-ПСА 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 ПСА с помощью набора ИФА-ПСА проводят в сыворотке крови. Образцы сыворотки крови хранят при температуре (2-8) °С, если анализ проводится 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 высоким уровнем ПСА рекомендуется разводить буферным раствором, входящим 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.