

ЗМІСТ

1. ПРИЗНАЧЕННЯ	2
2. ПРИНЦИП РОБОТИ НАБОРУ	3
3. АНАЛІТИЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ	3
4. СКЛАД НАБОРУ	4
5. ЗАПОБІЖНІ ЗАХОДИ	5
6. ОБЛАДНАННЯ ТА МАТЕРІАЛИ, ЯКІ НЕОБХІДНІ ПІД ЧАС РОБОТИ З НАБОРОМ	5
7. ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ ДЛЯ АНАЛІЗУ	5
8. УМОВИ ЗБЕРІГАННЯ ТА ЕКСПЛУАТАЦІЇ НАБОРУ	6
9. ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗУ	7
10. ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ ТА НОРМИ	8
11. ЛІТЕРАТУРА	8

ІНСТРУКЦІЯ З ВИКОРИСТАННЯ НАБОРУ РЕАГЕНТІВ ДЛЯ ІМУНОФЕРМЕНТНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ЗАГАЛЬНОГО ПРОСТАТИЧНОГО СПЕЦИФІЧНОГО АНТИГЕНУ В СИРОВАТЦІ (ПЛАЗМІ) КРОВІ «ЗАГАЛЬНИЙ ПСА-ІФА»

1. ПРИЗНАЧЕННЯ

1.1. Набір реагентів «ЗАГАЛЬНИЙ ПСА-ІФА» призначений для кількісного визначення концентрації загального ПСА в сироватці (плазмі) крові методом твердофазного імуноферментного аналізу.

1.2. Простатичний специфічний антиген (ПСА) – глікопротеїн з молекулярною масою 34 кДа, що складається з одного поліпептидного ланцюга, був виявлений в епітеліальних клітинах нормальної простати. Його концентрація в крові підвищується при доброякісній гіперплазії і злоякісному переродженні тканини простати, а також при метастатичному раку простати. ПСА є сериновою протеазою із сімейства калікреїнів, його точна назва за ензимологічною класифікацією – прекалікреїн 3. Високі концентрації ПСА спостерігаються в молочній залозі під час лактації та грудному молоці, тому даний білок не можна вважати специфічним для простати. В сироватці крові ПСА перебуває переважно в комплексі з антипротеазами – антихімотрипсином, альфа-2-макроглобуліном та антитрипсином. Частина ПСА (вільний ПСА) знаходиться поза цими комплексами. Пара антитіл, що використовується в даній тест-системі (PS2-PS6), рівномірно (еквімолярно) розпізнає обидві форми ПСА – вільну та зв'язану, що підтверджено результатами незалежних досліджень в Університеті Турку, Фінляндія. У хворих аденокарциномою простати спостерігається підвищення концентрації ПСА навіть на ранніх стадіях хвороби. У хворих з вираженим захворюванням відмічена концентрація ПСА 1000 нг/мл та вище. Клінічна значимість даного визначення полягає в можливості контролю та прогнозу прогресу захворювання. Наростаюче або стійке підвищення концентрації ПСА свідчить про пухлинну прогресію та неефективність терапії. Інтерпретацію даних необхідно проводити з урахуванням інших клінічних даних. Важливу додаткову інформацію для диференціальної діагностики доброякісних і злоякісних захворювань простати дозволяє отримати визначення співвідношення вільного ПСА до загального ПСА. При цьому необхідно враховувати вік пацієнта та анамнез: так, у чоловіків віком до 60 років співвідношення рекомендується визначати при рівні загального ПСА вище 4 нг/мл; при цьому слід мати на увазі, що істотне – вище 15 нг/мл, підвищення рівня загального ПСА може спостерігатися не тільки при злоякісному переродженні тканин простати, але і при простатиті та масажі передміхурової залози (за даними ТОВ «ХЕМА» - до 20 нг/мл і до 80 нг/мл, відповідно), а також при еякуляції напередодні дослідження. У чоловіків віком за 60 років, коли доброякісна гіперплазія спостерігається практично у всіх, рівень ПСА до 7 нг/мл доцільно розглядати як нормальний, а співвідношення вільний ПСА/ ПСА визначати, починаючи з 7 нг/мл.

Увага: Для визначення співвідношення необхідно використовувати набори однієї фірми! Даний набір призначений для використання з набором «вільний ПСА-ІФА» ТОВ «ХЕМА», кат. № K231.

2. ПРИНЦИП РОБОТИ НАБОРУ

Визначення загального ПСА ґрунтується на використанні «сендвіч»-варіанта твердофазного імуноферментного аналізу. На внутрішній поверхні лунок планшета іммобілізовані мишачі моноклональні антитіла проти загального ПСА людини. В лунках планшета, при додаванні досліджуваного зразка відбувається зв'язування загального ПСА, який міститься в досліджуваному зразку з антитілами на твердій фазі.

Комплекс, що утворився, виявляють за допомогою кон'югату мишачих моноклональних антитіл проти загального ПСА людини з пероксидазою хрину. У результаті утворюється зв'язаний із твердою фазою «сендвіч», що містить пероксидазу. Під час інкубації з розчином субстрату тетраметилбензидину (ТМБ) рідина в лунках забарвлюється. Інтенсивність забарвлення прямо пропорційна концентрації загального ПСА в досліджуваному зразку. Концентрацію загального ПСА в досліджуваних зразках визначають за калібрувальним графіком залежності оптичної густини від вмісту загального ПСА в калібрувальних пробах.

3. АНАЛІТИЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфічність.

Обидва мишачі моноклональні антитіла, що використані в даному Наборі, демонструють еквімолярну взаємодію, як із вільними ПСА, так і з ПСА-АХТ комплексом.

3.2. Відтворюваність.

Коефіцієнт варіації результатів визначення вмісту загального ПСА у тому самому зразку сироватки (плазми) крові з використанням Набору «ЗАГАЛЬНИЙ ПСА-ІФА» не перевищує 8.0%.

3.3. Лінійність.

Залежність концентрації загального ПСА в зразках сироватки (плазми) крові при розведенні їх сироваткою (плазмою) крові, що не містить загального ПСА, має лінійний характер в діапазоні концентрацій 1.5–30 нг/мл і складає $\pm 10.0\%$.

3.4. Точність.

Даний аналітичний параметр перевіряється тестом на «відкриття» – відповідність вимірної концентрації загального ПСА підготовленої проби, отриманої шляхом змішування рівних об'ємів контрольної сироватки та калібрувальної проби 5.0 нг/мл. Відсоток «відкриття» складає 90–110%.

3.5. Чутливість.

Мінімальна достовірно визначувана Набором «ЗАГАЛЬНИЙ ПСА-ІФА» концентрація загального ПСА в сироватці (плазмі) крові не перевищує 0.005 нг/мл.

4. СКЛАД НАБОРУ

Код компонента	Символ	Найменування	Кількість	Од.	Опис
1	P221Z	SORB MTP Планшет 96-лунковий полістироловий, стрипований, готовий до використання	1	шт	-
2	C221Z	CAL 1-5 Калібрувальні проби на основі трис-буфера (рН 7.2-7.4), що містять відомі кількості загального простатичного специфічного антигену – 0; 1.5; 5; 10; 30 нг/мл, готові до використання (калібрувальна проба С1 – 6 мл, інші – по 0.8 мл кожна)	5	шт	прозорі рідини червоного кольору (калібрувальна проба С1 – прозора безбарвна рідина)
3	Q221Z	CONTROL Контрольна сироватка на основі сироватки крові людини з відомим вмістом загального простатичного специфічного антигену, готова до використання (0.8 мл)	1	шт	прозора безбарвна рідина
4	T221Z	CONJ HRP Кон'югат , готовий до використання (14 мл)	1	шт	прозора рідина червоного кольору
5	R055Z	SUBS TMB Розчин субстрату тетраметилбензидину (ТМБ) , готовий до використання (14 мл)	1	шт	прозора безбарвна рідина
6	S008Z	BUF WASH 26X Концентрат розчину для відмивання , 26x- кратний (22 мл)	1	шт	прозора безбарвна рідина
7	R050Z	STOP Стоп-реагент , готовий до використання (14 мл)	1	шт	прозора безбарвна рідина
8	N003	- Плівка для заклеювання планшета	2	шт	-
9	K221I	- Інструкція з використання Набору реагентів «ЗАГАЛЬНИЙ ПСА-ІФА»	1	шт	-
10	K221Q	- Паспорт контролю якості Набору реагентів «ЗАГАЛЬНИЙ ПСА-ІФА»	1	шт	-

Комплектація 1: Набір розрахований на проведення аналізу в двох повторях 41 досліджуваних зразків, 5 калібрувальних проб і 1 проби контрольної сироватки (всього 96 визначень).

Комплектація 5: Набір розрахований на проведення аналізу в двох повторях 205 досліджуваних зразків, 25 калібрувальних проб і 5 проб контрольної сироватки (всього 480 визначень).

	Символ	Комплектація 5
		Кількість
1	SORB MTP	5 шт
2	CAL 1 - 5	5 комплектів (C1 – 6 мл, C2-C5 по 0.8 мл); або 30 мл C1 та по 4 мл C2-C5
3	CONTROL	5x0.8 мл або 1x4 мл
4	CONJ HRP	5x14 мл або 2x30 мл
5	SUBS TMB	2x30 мл
6	BUF WASH 26X	2x50 мл
7	STOP	2x30 мл
8	N003	10 шт

5. ЗАПОБІЖНІ ЗАХОДИ

5.1. Набір реагентів попадає до переліку Б, Додатку 2 Технічного регламенту №754 від 2 жовтня 2013 року.

5.2. Всі компоненти Набору, за винятком стоп-реагенту (5.0% розчин сірчаної кислоти), у концентраціях, що використовуються, є нетоксичними.

Розчин сірчаної кислоти має подразнюючу дію; при роботі з ним потрібно уникати його розбризкування та потрапляння на шкіру і слизові оболонки. При потраплянні на шкіру і слизові оболонки уражену ділянку слід промити великою кількістю проточної води.

5.3. При роботі з Набором слід дотримуватись НПАОП 85.14-1.09-81. Правила влаштування, техніки безпеки, виробничої санітарії, протиепідемічного режиму і особистої гігієни при роботі в лабораторіях (відділеннях, відділах) санітарно-епідеміологічних установ системи Міністерства охорони здоров'я СРСР (НАОП 9.1.50-1.09-81).

5.4. При роботі з Набором необхідно користуватися одноразовими гумовими або пластиковими рукавички, оскільки зразки крові людини слід розглядати як потенційно інфікований матеріал, здатний тривалий час зберігати і передавати віруси ВІЛ, гепатиту або будь-який інший збудник вірусної інфекції.

5.5. Не використовуйте Набір з ознаками пошкодження.

6. ОБЛАДНАННЯ ТА МАТЕРІАЛИ, ЯКІ НЕОБХІДНІ ПІД ЧАС РОБОТИ З НАБОРОМ

- фотометр вертикального сканування, що дозволяє вимірювати оптичну густину вмісту лунок планшета при довжині хвилі 450 нм;
- термостат, що підтримує температуру $+37^{\circ}\text{C} \pm 0.1^{\circ}\text{C}$;
- дозатори зі змінними наконечниками, що дозволяють відбирати об'єми в діапазоні 25–250 мкл;
- циліндр мірний об'ємом 1000 мл;
- вода дистильована;
- рукавички гумові або пластикові;
- папір фільтрувальний.

7. ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ ДЛЯ АНАЛІЗУ

7.1. Перед проведенням аналізу компоненти Набору та досліджувані зразки сироватки (плазми) крові слід витримати при кімнатній температурі ($+18...+25^{\circ}\text{C}$) не менше 30 хв.

7.2. Приготування планшета.

Відкрити пакет із планшетом і встановити в рамку необхідну кількість стрипів.

Стрипи, що залишилися невикористаними, ретельно заклеїти плівкою для заклеювання планшета з метою запобігання впливу вологи на лунки планшета. Планшет зберігати при температурі +2...+8°C протягом терміну придатності Набору.

7.3. Приготування розчину для відмивання.

Вміст флакона з концентратом розчину для відмивання (22 мл), перенести в мірний циліндр об'ємом 1000 мл, додати 550 мл дистильованої води та ретельно перемішати. У разі часткового використання Набору слід відібрати необхідну кількість концентрату розчину для відмивання і розвести дистильованою водою в 26 разів (до 1 мл концентрату розчину для відмивання додати 25 мл дистильованої води).

8. УМОВИ ЗБЕРІГАННЯ ТА ЕКСПЛУАТАЦІЇ НАБОРУ

8.1. Набір реагентів «ЗАГАЛЬНИЙ ПСА-ІФА» потрібно зберігати в упаковці підприємства-виробника при температурі +2...+8°C протягом усього терміну придатності, який вказаний на пакуванні Набору.

Допускається зберігання (транспортування) Набору при температурі до +25°C не довше 15 діб. Не допускається заморожування цілого Набору.

Допускається одноразове заморожування (-20°C) калібрувальних проб і контрольної сироватки в аликвотах.

8.2. Набір розрахований на проведення аналізу в двох повторах 42 досліджуваних зразків, 5 калібрувальних проб і 1 контрольної сироватки (всього 96 визначень).

8.3. У випадку часткового використання Набору, компоненти необхідно зберігати в такий спосіб:

- стрипи, що залишилися невикористаними, необхідно ретельно заклеїти плівкою для заклеювання планшета та зберігати при температурі +2...+8°C протягом всього терміну придатності Набору;

- кон'югат, субстрат, стоп-реагент, після відкриття флаконів, необхідно зберігати при температурі +2...+8°C протягом всього терміну придатності;

- калібрувальні проби та контрольну сироватку, після відкриття флаконів, необхідно зберігати при температурі +2...+8°C не довше 2 місяців;

- концентрат розчину для відмивання, що залишився невикористаним, необхідно зберігати при температурі +2...+8°C протягом всього терміну придатності;

- готовий розчин для відмивання необхідно зберігати при кімнатній температурі (+18...+25°C) не довше 15 діб або при температурі +2...+8 °C не довше 45 діб;

Важливе зауваження. Після використання реагенту закривайте флакон кришкою. Закривайте кожний флакон відповідною кришкою.

8.4. Для проведення аналізу не слід використовувати гемолізовану, непрозору сироватку (плазму) крові, а також сироватку (плазму) крові, що містить азид натрію. У разі проведення аналізу не в день взяття крові, сироватку (плазму) крові необхідно зберігати при -20°C. Не допускається повторне заморожування/розморожування зразків.

8.5. Дослідження зразків сироватки (плазми) крові людей, що отримували з метою діагностики або терапії препарати, до складу яких входять мишачі антитіла, може давати помилкові (підвищенні) значення.

8.6. Під час використання Набору для проведення декількох незалежних серій аналізів слід мати на увазі, що для кожного визначення необхідна побудова нового калібрувального графіка та використання контрольної сироватки.

8.7. Не використовуйте компоненти з інших наборів або з аналогічних наборів інших партій.

9. ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗУ

1	Помістіть в рамку необхідну кількість стрипів – із розрахунку на кількість досліджуваних зразків у двох повторях і 12 лунок для калібрувальних проб та контрольної сироватки.
2	Якщо очікувана концентрація загального ПСА в досліджуваному зразку перевищує 30 нг/мл, його необхідно додатково розвести, використовуючи калібрувальну пробу С1. Використання інших буферів та реагентів для розбавлення зразків може призвести до помилкових результатів. Примітка: в такому випадку для отримання надійних результатів рекомендуємо використовувати декілька послідовних розведень досліджуваного зразка сироватки (плазми) крові.
3	Внесіть у всі лунки по 100 мкл кон'югату.
4	Внесіть у відповідні лунки у двох повторях по 50 мкл калібрувальної проби та контрольної сироватки. В лунки, що залишилися, внесіть у двох повторях 50 мкл досліджуваних зразків сироватки (плазми) крові. Внесення калібрувальних проб, контрольної сироватки та досліджуваних зразків, необхідно провести протягом 15 хв.
5	Обережно перемишайте вміст планшета круговими рухами на горизонтальній поверхні, закройте планшет плівкою для заклеювання планшета. Інкубуйте планшет протягом 60 хвилин при температурі +37°C.
6	Після закінчення інкубації видаліть вміст лунок і відмийте лунки 5 разів. При кожному відмиванні додавайте в усі лунки по 250 мкл розчину для відмивання (див. п. 7.3), струшуйте планшет круговими рухами по горизонтальній поверхні, а потім видаляйте рідину з лунок за допомогою вакууму або витрушуванням. По закінченні відмивання необхідно ретельно видалити залишки рідини з лунок на фільтрувальний папір.
7	Внесіть в усі лунки по 100 мкл розчину субстрату тетраметилбензидину. Внесення розчину субстрату тетраметилбензидину в лунки необхідно провести протягом 2–3 хв. Інкубуйте планшет у темряві при кімнатній температурі (+18...+25°C) протягом 10–20 хвилин, в залежності від швидкості розвитку синього забарвлення.
8	Внесіть в усі лунки з тією же швидкістю і у тій же послідовності, як і розчин субстрату тетраметилбензидину, по 100 мкл стоп-реагенту; при цьому вміст лунок забарвлюється в яскраво-жовтий колір.
9	Визначте величину оптичної густини (ОГ) в лунках планшета за допомогою планшетного фотометра при довжині хвилі 450 нм. Вимірювання ОГ вмісту лунок планшета необхідно провести протягом 15 хв після внесення стоп-реагенту. Біланк фотометра виставляйте за калібрувальною пробую С1 або за повітрям
10	Побудуйте у лінійних координатах калібрувальний графік: вісь абсцис (x) – концентрація загального ПСА у калібрувальних пробах (нг/мл), вісь ординат (y) – оптична густина калібрувальних проб (ОГ 450 нм). Для алгоритму обчислення (апроксимації) калібрувального графіку використовуйте інтервальний (відрізково-лінійний, «від точки до точки») метод.
11	Визначте за калібрувальним графіком вміст загального ПСА в досліджуваних зразках. У разі попереднього розведення досліджуваного зразка (див. п. 2), отриманий результат необхідно домножити на фактор розведення.

10. ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ ТА НОРМИ

10.1. Ґрунтуючись на результатах досліджень, що проведені фахівцями ТОВ «ХЕМА», рекомендуємо скористатися нормами, наведеними нижче. Разом із тим, у відповідності до принципів GLP (Належної лабораторної практики), кожна лабораторія повинна самостійно визначити параметри норми, які є характерними для обстежуваної популяції.

Зауваження. Значення концентрації загального ПСА в досліджуваних зразках, які знаходяться нижче межі чутливості Набору (0.005 нг/мл), а також перевищують значення верхньої калібрувальної проби (30 нг/мл) належить приводити в наступній формі: «в досліджуваному зразку X концентрація загального ПСА нижча за 0.005 нг/мл» або «вища за 30 нг/мл».

Досліджувана група	Одиниці: нг/мл	
	Нижня межа	Верхня межа
Чоловіки		
<40 років	-	4.0
41-60 років	-	5.5
>61 року	-	7.0
Жінки	-	0.45

11. ЛІТЕРАТУРА

1. Oesterling JE Prostate-specific antigen: a critical assessment of the most useful tumor marker fro adenocarcinoma of the prostate. J Urol 1991; 145: 907-23.
2. Oesterling JE et al.. Serum prostate-specific antigen in a community-based population of healthy men: establishment of age-specific reference ranges. JAMA 1993; 270:860.
3. Catalona WJ et al. Measurement of prostate-specific antigen in serum as a screening test for prostate cancer. N Eng J Med 1991, 324: 1156-61.
4. Christensson A et al. Serum prostate-specific antigen complexed to a1-antichymotrypsin as an indicator of prostate cancer. J Urology 1993; 150: 100-5.
5. Milfor Ward A et al. Free/total PSA ratio as an aid to the diagnosis of prostatic carcinoma. Clin Chem 1995; 41:S230.
6. Wu JT. Assay for prostate specific antigen (PSA): problems and possible solutions. J Clin Lab Analysis 1994; 8:51-62.

З питань якості Набору «**ЗАГАЛЬНИЙ ПСА-ІФА**»

звертатися в ТОВ «ХЕМА» за адресою:

м. Київ, вул. Академіка Єфремова, 23

тел./факс: + 38 (044) 422-62-16

email: info@xema.com.ua

www.xema-medica.com

Начальник відділу з контролю якості ТОВ «ХЕМА»

Коваленко Еліна Володимирівна