

ЗМІСТ

1. ПРИЗНАЧЕННЯ	2
2. ПРИНЦИП РОБОТИ НАБОРУ	2
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 ВІЛЬНОГО ПРОСТАТИЧНОГО СПЕЦИФІЧНОГО АНТИГЕНУ У СИРОВАТЦІ (ПЛАЗМІ) КРОВІ «ВІЛЬНПСА-ІФА»

1. ПРИЗНАЧЕННЯ

Набір реагентів «вільнПСА-ІФА» призначений для кількісного визначення концентрації вільного ПСА у сироватці (плазмі) крові методом твердофазного імуноферментного аналізу.

Простатичний специфічний антиген (ПСА) - глікопротеїн з молекулярною масою 34000 Да, який складається з одного поліпептидного ланцюга, був виявлений в епітеліальних клітинах нормальної простати, при доброякісній гіперплазії і злякисному переродженні тканини простати, а також при метастатичному раку простати. ПСА є сериновою протеазою сімейства калікреїнів, його точна назва за ензимологічною класифікацією - прекалікреїн 3. Високі концентрації ПСА спостерігаються в молочній залозі при лактації і грудному молоці, тому даний білок не можна вважати строго специфічним для простати. У сироватці крові ПСА перебуває переважно в комплексі із антипротеазами - анти-хімотрипсином, альфа-2-макроглобуліном і антитрипсином. Частина ПСА (вільний ПСА, вПСА) знаходиться поза цими комплексами, суму вільного ПСА та зв'язаної форми ПСА можна назвати «Загальний ПСА» (загПСА). У даній тест-системі для «зв'язування» використовуються моноклональні антитіла PS2, які рівномірно (еквімолярно) розпізнають обидві форми ПСА - вільну і зв'язану. Для виявлення вільного ПСА використовуються специфічні для цієї форми моноклональні антитіла PS1. Властивості обох антитіл підтверджені результатами незалежних досліджень в Університеті Турку, Фінляндія. Дослідження останніх років показали, що величина співвідношення вільний ПСА/ загальний ПСА дає додаткову діагностичну інформацію у порівнянні із визначенням рівня загального ПСА. Це співвідношення вище у випадках доброякісної гіперплазії і нижче - при злякисних захворюваннях простати. У чоловіків із рівнем загального ПСА в діапазоні 4-10 нг/мл визначення співвідношення дозволяє отримати важливу додаткову інформацію для диференціальної діагностики доброякісних і злякисних захворювань простати.

2. ПРИНЦИП РОБОТИ НАБОРУ

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

Комплекс, що утворився, виявляють за допомогою кон'югату мишачих моноклональних антитіл проти вільного 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 у лунках забарвлюється. Інтенсивність забарвлення прямо пропорційна концентрації вільного ПСА в досліджуваному зразку. Концентрацію вільного ПСА в зразках визначають за калібрувальним графіком залежності оптичної густини від вмісту вільного ПСА в калібрувальних пробах.

3. АНАЛІТИЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфічність.

Не виявлено перехресної реакції мишачих моноклональних антитіл проти ПСА (PS1) із ПСА-АХТ комплексом.

3.2. Відтворюваність.

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

3.3. Лінійність.

Залежність концентрації вільного ПСА у зразках сироватки (плазми) крові при розведенні їх сироваткою (плазмою) крові, що не містить вільного ПСА, має лінійний характер в діапазоні концентрацій 0.25-5 нг/мл та складає $\pm 10.0\%$.

3.4. Точність.

Даний аналітичний параметр перевіряється тестом на «відкриття» – відповідність вимірної концентрації вільного ПСА підготовленої проби, отриманої шляхом змішування рівних об'ємів контрольної сироватки та калібрувальної проби 0.75 нг/мл. Відсоток «відкриття» складає 90–110%.

3.5. Чутливість.

Мінімальна достовірно визначувана Набором «вільнПСА-ІФА» концентрація вільного ПСА у сироватці (плазмі) крові не перевищує 0.0035 нг/мл.

4. СКЛАД НАБОРУ

Код компонента	Символ	Найменування	К-ть	Од.	Опис
1	P231Z	SORB MTP Планшет 96-луночковий полістироловий, стрипований, готовий до використання	1	шт	-
2	C231Z	CAL 1-5 Калібрувальні проби на основі трис-буфера (рН 7.2-7.4), що містять відомі кількості вільного ПСА – 0; 0.25; 0.75; 2.5; 5 нг/мл , готові до використання (по 0.8 мл кожна)	5	шт	прозорі рідини синього кольору (калібрувальна проба С1 – прозора безбарвна рідина)
3	Q231Z	CONTROL Контрольна сироватка на основі сироватки крові людини з відомим вмістом вільного ПСА, готова до використання (0.8 мл)	1	шт	прозора безбарвна рідина
4	T231Z	CONJ HRP Кон'югат , готовий до використання (14 мл)	1	шт	прозора рідина пурпурового кольору
5	S011Z	DIL ІФА-Буфер , готовий до використання (14 мл)	1	шт	прозора рідина синього кольору
6	R055Z	SUBS TMB Розчин субстрату тетраметилбензидину (ТМБ), готовий до використання (14 мл)	1	шт	прозора безбарвна рідина
7	S008Z	BUF WASH 26X Концентрат розчину для відмивання , 26х-кратний (22 мл)	1	шт	прозора безбарвна рідина
8	R050Z	STOP Стоп-реагент , готовий до використання (14 мл)	1	шт	прозора безбарвна рідина
9	N003	- Плівка для заклеювання планшета	2	шт	-
10	K231I	- Інструкція з використання Набору реагентів «ВільнПСА-ІФА»	1	шт	-
11	K231Q	- Паспорт контролю якості Набору реагентів «ВільнПСА-ІФА»	1	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 слід користуватися одноразовими гумовими або пластиковими рукавичками, 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.

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

- фотометр вертикального сканування, що дозволяє вимірювати оптичну густину вмісту лунок планшета за довжини 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 і 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, необхідно заклеїти плівкою для заклеювання планшета з метою запобігання впливу вологи на лунки планшета. Планшет зберігати при температурі $+2...+8^{\circ}\text{C}$ 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 «вільнПСА-ІФА» потрібно зберігати в упаковці підприємства-виробника при температурі +2...+8°C протягом терміну придатності, який вказано 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 та контрольної сироватки в аликвотах.

8.2. Набір розрахований на проведення дослідження в двох повторях 42 досліджуваних зразків, 5 калібрувальних проб та 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;

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

- 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 Набору;

- готовий розчин для відмивання слід 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 дослідження не в день взяття крові, сироватку (плазму) слід зберігати при температурі -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 (підвищені) 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 в двох повторах та 12 лунок для калібрувальних проб та контрольної сироватки.
2	Внесіть в усі лунки планшета по 50 мкл ІФА-Буфера .
3	Внесіть у відповідні лунки у двох повторах по 50 мкл калібрувальної проби і контрольної сироватки . В лунки, що залишилися, внесіть в двох повторах по 50 мкл досліджуваних зразків сироватки (плазми) крові. Внесення калібрувальних проб, контрольної сироватки та досліджуваних зразків, необхідно провести протягом 15 хв.
4	Обережно перемішайте вміст планшета круговими рухами на горизонтальній поверхні, заклейте планшет плівкою для заклеювання планшета. Інкубуйте планшет протягом 30 хвилин при температурі +37°C .
5	Після закінчення інкубації видаліть вміст лунок і відмийте лунки 3 рази. При кожному відмиванні додавайте в усі лунки по 250 мкл розчину для відмивання (див. п . 7.3), струшуйте планшет круговими рухами на 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.
6	Внесіть у всі лунки по 100 мкл кон'югату .
7	Заклейте планшет плівкою для заклеювання планшета. Інкубуйте планшет протягом 30 хвилин при температурі +37°C .
8	По закінченні інкубації видаліть вміст лунок і відмийте лунки 5 разів .
9	Внесіть у всі лунки по 100 мкл розчину субстрату тетраметилбензидину . Внесення розчину субстрату тетраметилбензидину в лунки необхідно здійснити 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.
10	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.
11	Визначте величину оптичної густини (ОГ) в лунках планшета за допомогою планшетного фотометра при довжині хвилі 450 нм. Вимірювання ОГ вмісту лунок планшета необхідно здійснити протягом 15 хв після внесення стоп-реагенту. Бланк фотометра виставляйте за калібрувальною пробою С1 або за повітрям.
12	Побудуйте у лінійних координатах калібрувальний графік: вісь абсцис (x) – концентрація вільного ПСА в калібрувальних пробах (нг/мл), вісь ординат (y) – оптична густина калібрувальних проб (ОГ 450 нм). Для алгоритму обчислення (апроксимації) калібрувального графіка використовуйте інтервальний (відрізково- лінійний, «від точки до точки») метод.
13	Визначте за калібрувальним графіком вміст вільного ПСА у досліджуваних зразках.

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.

Примітка: значення співвідношення вільний ПСА/загальний ПСА необхідно проводити на Наборах однієї фірми-виробника.

Співвідношення вільний ПСА/загальний ПСА, % (Набір «ЗАГАЛЬНИЙ ПСА-ІФА» ТОВ «ХЕМА» кат№ K221) слід використовувати тільки, якщо значення загального ПСА більше 4.0 нг/мл!

Доброякісні стани	>10.0
Аденокарцинома простати	<10.0

11. ЛІТЕРАТУРА

- Christensson A, Bjork T, Nilsson O, et al. Serum Prostate Specific Antigen Complexed to α 1-Antichymotrypsin As An Indicator of Prostate Cancer. J. of Urol. 150:100-105; 1993.
- Lilja H, Christensson A, Dahlen U, et al. Prostate-specific antigen in serum occurs predominantly in complex with α -1-antichymotrypsin. Clin Chem 37:1618-1625, 1991.
- Stenman U-H, Leinonen J, Alfthan H, Rannikko S, Tuhkanen K, Alfthan O. A complex between prostate-specific antigen and α -1-antichymotrypsin is the major form of prostate-specific antigen in serum of patients with prostate cancer: assay of the complex improves clinical sensitivity for cancer. Cancer Res. 51:222-226, 1991.
- Catalona WJ, Smith DS, Ratliff TL, Basler JW. Detection of organ-confined prostate cancer is increased through prostate-specific antigen-based screening. JAMA. 270:948-954, 1993.
- Stamey TA, Yang N Hay AR, McNeal JE, Freiha, FS, Redwine E. Prostate-specific antigen as a serum marker for adenocarcinoma of the prostate. N Engl J Med. 317-: 909-916, 1987.
- Junker R, Brandt B, Zechel C, and Assmann, G. Comparison of Prostate-specific antigen (PSA) measured by four combinations of free-PSA and total PSA assays. Clinical Chemistry 43:1588-1594, 1997.
- Luderer AA, Chen Y-T, Soriano TF, et al. Measurements of the proportion of free to total prostate-specific antigen improves diagnostic performance of prostate-specific antigen in the diagnostic gray zone of total prostate-specific antigen. Urology 46:187-194, 1995.

З питань якості Набору «**вільний 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