УТВЕРЖДАЮ
Директор
УП «ХОП ИБОХ НАН Беларуси»
_____ В.В.Симирский
«___» ___03___ 2024 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

НАБОР РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СВОБОДНОГО СПЕЦИФИЧЕСКОГО АНТИГЕНА ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ ИММУНОРАДИОМЕТРИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ИРМА-ПСА свободный-СТ

ТУ РБ 100185129.065-2005, изм. 5

РАЗРАБОТАНО
Ведущий инженер-технолог
УП «ХОП ИБОХ НАН Беларуси»
_____ И.Н. Гук
«29» 03 2024 г.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

1 НАЗНАЧЕНИЕ НАБОРА

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

Анализ может быть проведен как на автоматическом анализаторе РИА\ИРМА Stratec SR 300, так и на другом подобном медицинском оборудовании.

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 свободному ПСА, жидкий препарат, готов к использованию, 1 флакон, 17 мл, общая активность (280-600) кБк;
- пробирки полистирольные с иммобилизованными моноклональными антителами к свободному ПСА, готовы к использованию, 100 шт.;
- шесть калибровочных проб в диапазоне концентраций свободного ПСА (0; 0,3-30) нг/мл (точные значения концентраций свободного ПСА

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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 Европейского стандарта ПСА BCR-613 (IRMM, Бельгия):

- концентрат промывочного раствора (КПР), 1 флакон, 21 мл;
- контрольная сыворотка (КС) – жидкий препарат, содержащий известное количество свободного ПСА, 1 флакон, 1 мл.

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 Набор ИРМА-ПСА свободный-СТ обеспечивает определение свободной формы ПСА. Диапазон определяемых концентраций свободного ПСА – (0,1-30) нг/мл.

2.5 В основе определения ПСА лежит иммунорадиометрический метод, в котором используются два моноклональных антитела к двум разным эпитопам молекулы ПСА. Образцы или калибровочные пробы инкубируют в пробирках, покрытых моноклональными антителами, совместно с меченными [^{125}I]-моноклональными антителами. После инкубации жидкое содержимое пробирок удаляют и промывают пробирки для устранения несвязанных меченых антител. Измеряют связанную активность [^{125}I].

Концентрацию свободного ПСА в неизвестных образцах находят по калибровочному графику зависимости связанной активности [^{125}I]-моноклональных антител к свободному ПСА от концентрации свободного ПСА в калибровочных пробах.

3 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

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

При работе с набором следует соблюдать правила работы с радиоактивными веществами (далее - РВ) согласно требованиям Санитарных норм и правил «Требования к обеспечению радиационной безопасности персонала и населения при осуществлении деятельности по использованию атомной энергии и источников ионизирующего излучения», утверждённых Постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь № 137 от 31.12.2013 г.

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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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

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

3.3 Работы проводить с соблюдением мер предосторожности в соответствии с требованиями [1], [2]. В случае пролива сыворотки крови на рабочие поверхности, необходимо проводить дезинфекцию в соответствии с требованиями [3].

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

Все лица, занятые при производстве набора, должны проходить обязательный медицинский осмотр в соответствии с требованиями [4].

3.5 Все радиоактивные отходы, образованные в процессе использования набора собираются, хранятся и удаляются согласно Санитарным нормам и правилам «Требования к обеспечению радиационной безопасности персонала и населения при обращении с радиоактивными отходами» утверждённые Постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь №142 от 31.12.2015 г.

4 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

Для проведения анализа необходимо использовать следующее оборудование:

- гамма-счетчик колодезного типа, позволяющий измерять активность изотопа [^{125}I];
- прибор для встряхивания пробирок вибрационного типа;
- водоструйный насос;
- магнитная мешалка;
- пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкостей от 0,1 до 2,0 мл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 3%);
- штатив для пробирок;
- цилиндр мерный вместимостью 500 мл;
- колба плоскодонная вместимостью 500 мл;
- вода дистиллированная;
- перчатки резиновые хирургические.

5 ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

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

5.2 Приготовление промывочного раствора (разведение в 20 раз)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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

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

6 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

6.1 Пробирки с иммобилизованными моноклональными антителами к свободному ПСА маркировать следующим образом (в дубликатах):

B_0-B_5 – для калибровочных проб свободного ПСА;

$B_{КС}$ – для КС;

B_X – для исследуемых проб сыворотки крови человека.

6.2 В пробирки B_0-B_5 внести по 0,05 мл (50 мкл) соответствующих калибровочных проб. В пробирки $B_{КС}$ внести по 0,05 мл (50 мкл) контрольной сыворотки. В пробирки B_X внести по 0,05 мл (50 мкл) исследуемых сывороток крови человека.

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

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

6.5 После окончания инкубации тщательно удалить из всех пробирок жидкость с помощью водоструйного насоса. Во все пробирки внести по 2 мл промывочного раствора (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 операций анализа приведена в таблице 1.

Таблица 1

<table>
<tr><td rowspan="2">Пробирки (в дубликатах)</td><td colspan="6">Последовательность операций</td></tr>
<tr><td>Калибровочные пробы, КС и исследуемые сыворотки крови человека,
мл</td><td>[^{125}I]-МКАТ к ПСА,
мл</td><td>Инкубировать 2 ч при постоянном встряхивании при температуре (18-25) °С</td><td>Тщательно удалить из всех пробирок жидкость с помощью водоструйного насоса</td><td>Промывочный раствор
мл</td><td>Сразу удалить промывочный раствор с помощью водоструйного насоса. Повторить стадию промывки.</td></tr>
<tr><td>B_0-B_5</td><td>0,05</td><td>0,15</td><td rowspan="3"></td><td rowspan="3"></td><td>2</td><td rowspan="3"></td></tr>
<tr><td>$B_{КС}$</td><td>0,05</td><td>0,15</td><td>2</td></tr>
<tr><td>B_X</td><td>0,05</td><td>0,15</td><td>2</td></tr>
<tr><td colspan="7">Измерить скорость счета [^{125}I] в каждой пробирке в течение 1 мин</td></tr>
</table>

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

7 РАСЧЕТЫ И ГРАФИЧЕСКИЕ ПОСТРОЕНИЯ

7.1 Найти средние арифметические значения скоростей счета [^{125}I] для каждой пары пробирок и рассчитать величину B_i/B_5 для каждой калибровочной пробы, контрольной или исследуемой сыворотки, где B_i – среднее арифметическое значение скорости счета [^{125}I] в пробирках B_1-B_5, $B_{КС}$ или B_X.

7.2 Построить калибровочный график в полулогарифмических координатах, откладывая на оси ординат (линейная) отношения B_i/B_5, в %, а по оси абсцисс (логарифмическая) – значения концентраций свободного ПСА в нг/мл в соответствующих калибровочных пробах.

Определить по калибровочному графику концентрацию свободного ПСА в нг/мл в контрольных и исследуемых сыворотках крови человека.

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 мечения йодом-125.

8.2 Чувствительность

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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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 Срок годности набора – 60 суток.

9.3 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 – не более 3 месяцев (допускается только однократное замораживание и размораживание образцов). Размораживание образцов проводят при комнатной температуре.

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

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

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

9.7 Для получения достоверных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора и квалифицированное проведение анализа.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Пояснения к символам

Графический символ	Его значение и объяснение
SN	**Серийный номер** Настоящий символ сопровождается указанием серийного номера изготовителя
	Использовать до Настоящий символ сопровождается датой, указывающей, что изделие рекомендуется использовать до истечения установленного срока; дата состоит из четырех цифр, указывающих год, двух цифр, указывающих месяц, и двух цифр, указывающих день
IVD	**Изделие для диагностики in vitro**
	Ограничение температуры Рядом с верхней и нижней горизонтальными линиями указывается верхняя и нижняя границы температурного диапазона
	Изготовитель Настоящий символ сопровождается информацией о наименовании и адресе изготовителя
	Обратитесь к руководству по эксплуатации Настоящий символ отсылает к руководству по эксплуатации для получения информации, необходимой для надлежащего применения изделия
	Содержимого достаточно для проведения n-тестирований Настоящий символ сопровождается указанием количества определений
	Знак радиационной опасности Настоящий символ сопровождается указанием общей активности изотопа [^{125}I] в наборе, кБк

УП «ХОП ИБОХ НАН Беларуси» ул. Академика В.Ф.Купревича, д.5, корп.3, 220141, г. Минск, Республика Беларусь

Тел./факс +375-17-272-52-57 E-mail:hopmang.bel@gmail.com http://www.hopiboh.org

По вопросам, касающимся качества набора, обращаться в ОТК, тел. +375-17-396-87-38

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Библиография

[1] Сборник нормативных документов по проблеме ВИЧ/СПИД

Утвержден приказом Министерства здравоохранения Республики Беларусь № 351 от 16.12.1998 г.

[2] Санитарные нормы и правила «Требования безопасности при осуществлении работ с условно патогенными микроорганизмами и патогенными биологическими агентами, к организации и проведению их учета, хранения, передачи и транспортировки», утвержденные Постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 06.01.2017 г. №2

[6] Приказ Министерства здравоохранения Республики Беларусь №165 от 25.11.2022 г. «О проведении дезинфекции и стерилизации в учреждениях здравоохранения»

[7] «Инструкция о проведении обязательных и внеочередных медицинских осмотров работающих», утвержденная Постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 29.07.2017 г. №74

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru