



DiaSorin Deutschland GmbH

von Hevesy-Strasse 3 • D-63128 Dietzenbach
Tel. +49 .60 74 .40 1.400 • Fax +49 .60 74 .40 1.420
E-Mail: information@diasorin.de



LIAISON® fPSA (314391) Свободный простатоспецифический антиген

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Количественное определение свободного простатоспецифического антигена (свПСА) в человеческой сыворотке и плазме (ЭДТА, гепарин) методом хемилюминесцентного иммуноанализа (CLIA) с помощью анализаторов линейки LIAISON® с целью мониторинга состояния больных карциномой простаты.

Использовать только для “in vitro” диагностики.

2. ВВЕДЕНИЕ

ПСА представляет собой сериновую протеазу и является ферментом, секретируемым эпителием протоков предстательной железы. В норме ПСА разжижает семенную жидкость. Как только ПСА попадает в кровоток, он связывается с ингибиторами протеаз, которые подавляют его активность. Наиболее важными ингибиторами ПСА являются α_1 -антихимотрипсин (АХТ) и α_2 -макроглобулин (АМГ). АМГ полностью покрывает молекулу ПСА так, что она перестает определяться в сыворотке, тогда как комплекс ПСА с АХТ не мешает определению антигена.

Так как ПСА – органспецифичный маркер, его определение в большей мере используется для первичной диагностики и, наряду с пальцевым ректальным обследованием, скрининга категорий высокого риска, особенно мужчин старше 50 лет. Доброкачественные нарушения, такие как простатическая гиперплазия или воспалительные процессы в прилегающих урогенитальных тканях, могут также привести к увеличению концентрации сывороточного ПСА, что снижает специфичность данного маркера.

Однако соотношение концентрации свободного и общего ПСА различно в случае доброкачественной гиперплазии простаты и карциномы простаты. Таким образом, дифференциация злокачественных и доброкачественных заболеваний возможна благодаря определению отношения свПСА/ПСА.

Для точного определения этого соотношения необходимо обеспечить, чтобы концентрация общего ПСА (как свободного, так и связанного с АХТ) определялась равным образом.

3. ПРИНЦИП МЕТОДА

Метод количественного определения свПСА представляет собой 1-ступенчатый хемилюминесцентный иммуноанализ (CLIA) по принципу сэндвича. Два разных типа высоко специфичных мышинных моноклональных антител к свПСА связаны с магнитными микрочастицами (твердая фаза) и мечены производным изолюминола (конъюгат антител с красителем). Во время инкубации молекулы ПСА, присутствующие в калибраторах, контролях и пробах, связываются с антителами твердой фазы и, затем, с антителами, мечеными изолюминолом. Сэндвич образуется только при наличии в пробе молекул антигена. После инкубации не связавшиеся молекулы удаляются во время цикла промывки. Затем к реакционной смеси добавляются реактивы для активации, индуцирующие хемилюминесцентную реакцию. Интенсивность люминесценции, измеряемая с помощью фотоумножителя в относительных единицах интенсивности, отражает концентрацию свПСА в калибраторах, контролях и пробах пациентов.

4. СОСТАВ НАБОРА

Магнитные частицы (2,3 мл)	Магнитные частицы, покрытые мышинными моноклональными антителами к свПСА; фосфатно-солевой буфер; БСА; 0,09% азид натрия.
Калибратор 1 (1 мл)	Человеческий ПСА в растворе человеческого альбумина. 0,09% азид натрия.
Калибратор 2 (1 мл)	Человеческий ПСА в растворе человеческого альбумина. 0,09% азид натрия.
Конъюгат (17 мл)	Мышинные моноклональные антитела к свПСА, меченные производным изолюминола (аминобутилэтилизололюминолом); фосфатный буфер; БСА; мышинные IgG; 0,09% азид натрия.
Раствор для разведения образцов (10 мл)	Человеческий сывороточный альбумин; 0,09% азид натрия.
Количество определений	100

Все реагенты готовы к использованию. Порядок расположения реактивов в таблице отражает их расположение в картридже реактивов.

Необходимые материалы, не входящие в набор

Анализаторы LIAISON® XL	Анализаторы LIAISON®
Кюветы (каталожный номер X0016). Одноразовые наконечники (каталожный номер X0015). Набор запускающих реактивов XL (каталожный номер 319200). Системная / промывочная жидкость (каталожный номер 319100). Мешки для отходов XL (каталожный номер X0025)	Реакционные модули (каталожный номер 319130). Набор запускающих реактивов (каталожный номер 319102) или набор запускающих реактивов XL (каталожный номер 319200). Реактив для ежедневной проверки анализатора (каталожный номер 319150). Системная / промывочная жидкость (каталожный номер 319100). Мешки для отходов (каталожный номер 450003). Набор растворов для обслуживания анализатора (каталожный номер 310990).

Дополнительные материалы, рекомендованные для работы

Контроль свободного ПСА (каталожный номер 319111)

5. ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ

Только для *In vitro* диагностики.

Все образцы человеческой сыворотки/плазмы, использованные для производства набора, были протестированы на наличие антител к вирусу гепатита С, ВИЧ 1 и ВИЧ 2, а также HBs-антигена и были признаны отрицательно реагирующими в вышеуказанных тестах. Но, поскольку не существует метода исследований, который бы гарантировал полную инфекционную безопасность биоматериалов человеческого происхождения, рекомендуется обращаться с набором, как с потенциально инфекционным.

6. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Запрещено есть, пить, курить и использовать косметические средства в лаборатории. Не пипетируйте растворы ртом.

Избегайте прямого контакта с потенциально инфекционными материалами, надевайте защитную одежду, защитные очки и одноразовые перчатки. Тщательно мойте руки после работы.

Избегайте разбрызгивания растворов и образования аэрозолей. В случае разбрызгивания реактивов протрите поверхность 5% раствором гипохлорита натрия.

Рекомендуется обращаться с пробами, реактивами и материалами биологического происхождения, как с потенциально способными к переносу инфекционных агентов. Необходимо утилизировать отходы в соответствии с местными требованиями санитарно-эпидемиологического контроля и экологического контроля. Любые материалы перед повторным использованием должны быть автоклавированы при температуре 121°C в течение 1 часа, перед утилизацией жидких отходов необходимо провести их обеззараживание добавлением гипохлорита до конечной концентрации 5% и выдержать в течение полчаса.

7. ПОДГОТОВКА ИНТЕГРАЛЬНОГО КАРТРИДЖА РЕАКТИВОВ

7.1 Интегральный картридж реактивов.

Пожалуйста, обратите внимание на следующие важные меры предосторожности при работе с реагентами:

Ресуспендирование магнитных частиц

Магнитные частицы должны быть полностью ресуспендированы до того, как интеграл будет помещен в прибор. Чтобы обеспечить полное ресуспендирование частиц, выполните следующие действия:

Перед удалением алюминиевых мембран с флаконов, проверните колесо флакона с магнитными частицами, пока цвет суспензии не станет равномерно коричневым. Аккуратно перемешайте их содержимое, держа интеграл горизонтально, чтобы избежать пенообразования. Осмотрите нижнюю часть флакона, чтобы убедиться, что все магнитные частицы были ресуспендированы.

При необходимости повторите процедуру до полного ресуспендирования магнитных частиц.

После удаления алюминиевой мембраны тщательно протрите поверхность каждого флакона для удаления остатков жидкости, если необходимо.

Вспенивание реагентов

Чтобы обеспечить оптимальные рабочие характеристики интеграла, следует избегать пенообразования реагентов. Придерживайтесь приведенных ниже рекомендаций по предотвращению вспенивания:

Перед использованием интеграла осмотрите реагенты, чтобы убедиться в отсутствии пены. Если после ресуспендирования магнитных частиц пена появилась, поместите интеграл в анализатор и подождите, пока пена исчезнет. Интеграл готов к использованию только тогда, когда пена исчезла, а интеграл с ресуспендированными частицами находится на борту.

Установка интеграла в область загрузки реактивов

Анализатор LIAISON®

- Установите интеграл в область загрузки реактивов анализатора так, чтобы штрих-код был расположен слева, и оставьте для перемешивания магнитных частиц в течение 30 минут. Анализатор автоматически перемешивает и полностью ресуспендирует магнитные частицы за это время.
- Следуйте инструкции по эксплуатации анализатора для загрузки проб и начала исследования

Анализатор LIAISON® XL

- Анализатор LIAISON® XL оснащен встроенным твердотельным магнитным устройством, которое помогает ресуспендировать микрочастицы до размещения интеграла с реагентами в области загрузки реактивов анализатора. Для уточнения деталей обратитесь к руководству по эксплуатации анализатора.
 - а. Вставьте интеграл с реагентами в специальный разъем.
 - б. Оставьте интеграл с реагентами в твердотельном магнитном устройстве, по крайней мере, на 30 секунд (допускается до нескольких минут). Повторите по мере необходимости.
- Установите интеграл в область загрузки реактивов анализатора так, чтобы штрих-код был расположен слева, и оставьте для перемешивания магнитных частиц в течение 15 минут. Анализатор автоматически перемешивает и полностью ресуспендирует магнитные частицы за это время.
- Следуйте инструкции по эксплуатации анализатора для загрузки проб и начала исследования

7.2 Контроли

Для правильной хранения, подготовки и постановки и набора контрольных материалов LIAISON® Control fPSA Set следовать соответствующей инструкции.

8. ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ ИНТЕГРАЛЬНОГО КАРТРИДЖА РЕАКТИВОВ

Всегда храните интегралы в вертикальном положении, в противном случае последующее перемешивание магнитных частиц будет затруднено. Избегайте попадания прямых солнечных лучей.

Невскрытые реактивы стабильны до окончания срока годности при условии их хранения в вертикальном положении при температуре 2-8°C. Запрещается замораживать реактивы, входящие в состав картриджа. Запрещается использовать интеграл после окончания срока годности, указанного на этикетке интеграла. После вскрытия интеграла (удаления алюминиевых мембран) его содержимое стабильно в течение не менее 2 недель при условии хранения при температуре 2-8°C в холодильнике или на борту анализатора. После окончания этого периода использование интеграла возможно при условии, если результаты исследования контрольных сывороток лежат в допустимых пределах.

9. ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Сыворотка или плазма. ЭДТА и гепарин могут быть использованы в качестве антикоагулянтов. Сыворотка/плазма должна быть отделена от клеток после забора крови как можно скорее. Мутные, липемичные пробы, а также пробы с твердыми частицами и дебрисом эритроцитов перед исследованием могут потребовать дополнительной очистки путем фильтрации или центрифугирования. Не рекомендуется исследовать сильно гемолизированные и липемичные пробы, а также пробы с признаками бактериальной контаминации. Перед установкой пробы в анализатор необходимо удалить все пузырьки с ее поверхности.

Стабильность: 24 часа при температуре 2-8°C. Для более длительного хранения пробы должны быть заморожены при температуре -20°C или ниже. После разморозки пробу необходимо аккуратно перемешать. Избегайте повторного замораживания пробы.

Минимально необходимый объем 200 µл (50 µл на исследование + 150 µл мертвый объем).

10. КАЛИБРОВКА

Исследование калибраторов, входящих в состав интеграла, позволяет перекалибровать мастер-кривую, хранящуюся в памяти анализатора, с использованием значений концентрации калибраторов, зашифрованных в штрих-коде этикетки интеграла. Возможно провести до 6 калибровок (суммарно)

Калибровка должна быть проведена в трех повторах в следующих случаях:

- Используется новая серия набора реактивов или набора запускающих реактивов.
- Прошло более 2 недель с момента последней калибровки.
- Используется новый набор реактивов.
- Было проведено обслуживание анализатора.
- Результаты исследования контрольных сывороток выходят за пределы допустимого диапазона.

Анализатор LIAISON®: значения концентраций калибратора содержатся в штрих-коде интеграла.

Анализатор LIAISON® XL: значения концентраций калибратора содержатся в радиочастотной метке.

11. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

Строгое следование рекомендациям инструкции пользователя гарантирует получение корректных результатов.

Анализатор LIAISON®. Для идентификации каждой методики используется информация, зашифрованная в штрих-коде этикетки интеграла. Если информации с штрих-кода не читается, то картридж является негодным к использованию и должен быть утилизирован (см. Инструкцию пользователя).

Анализатор LIAISON® XL. Для идентификации каждой методики используется информация, зашифрованная в радиочастотной метке интеграла. Если информации с радиочастотной метки не читается, то картридж является негодным к использованию и должен быть утилизирован (см. Инструкцию пользователя).

Процедура анализа, выполняемого анализатором, состоит из следующих стадий:

1. Раскапывание калибраторов, контролей или проб в кюветы.
2. Добавление магнитных частиц.
3. Добавление конъюгата.
4. Инкубация.
5. Промывка Системной/промывочной жидкостью.
6. Добавление запускающих реактивов и измерение интенсивности флуоресценции.

12. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Каждая лаборатория должна установить частоту проведения контроля качества самостоятельно, хорошей лабораторной практикой является их ежедневное измерение вместе с пробами пациентов и после проведения калибровки.

Для проведения внутреннего контроля качества можно использовать контрольные сыворотки LIAISON® (каталожный номер 319111). Если результаты измерения контрольных сывороток выходят за допустимые пределы, необходимо повторно провести калибровку методики и измерение контрольных материалов. Если после успешной повторной калибровки результаты измерения контрольных сывороток по-прежнему выходят за допустимые пределы, необходимо провести контроль качества с использованием новых флаконов контрольных материалов. Если и в этом случае результаты контрольных измерений выходят за допустимые пределы, то результаты анализа проб пациентов недостоверны и их нельзя сообщать пациентам.

Перед использованием других контрольных материалов необходимо оценить возможность их использования с данным набором реактивов, после чего необходимо установить подходящие пределы допустимых значений.

13. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализатор автоматически рассчитывает концентрацию β_2 -микроглобулина в мг/л во всех типах проб. За более подробной информацией обратитесь к Инструкции пользователя. Результаты измерений калибраторов и контролей анализаторами LIAISON® и LIAISON® XL в относительных световых единицах (RLU) или концентрационных единицах могут различаться, но результаты анализов проб пациентов будут одинаковыми.

Анализатор автоматически рассчитывает концентрацию свПСА в нг/мл. За более подробной информацией обратитесь к Инструкции пользователя.

Измеряемый диапазон: 0,04-25 нг/мл.

13.1 Стандартизация

Исследование было откалибровано по референсному стандарту NIBSC 96/668 (в соответствии с референсным стандартом Stamey).

13.2 Диапазон исследования

До 25 нг/мл свободного ПСА в сыворотке/плазме.

13.3 Референсные границы

В рамках скрининговой программы по профилактике рака простаты, охватывающей 111 пациентов (средний возраст 61,8 лет), с использованием наборов реактивов LIAISON® PSA и LIAISON® fPSA были исследованы пробы на общий ПСА и свободный ПСА. Диагностическая эффективность дифференциации доброкачественных и злокачественных заболеваний простаты значительно повысилось за счет вычисления соотношения свПСА/ПСА в диапазоне концентраций общего ПСА от 3 до 10 нг/мл.

Граничное значение для соотношения свПСА/ПСА составило 0,1. Значения $<0,1$ были получены в случае больных карциномой простаты, тогда как значения $>0,1$ были получены в случае доброкачественной гиперплазии простаты. Благодаря использованию данного граничного значения клиническая специфичность анализа в диапазоне концентраций общего ПСА 3-10 нг/мл, оцененная с помощью ROC-кривой, достигла 95%.

В соответствии с общепринятой лабораторной практикой каждая лаборатория должна установить собственные референсные значения, отражающие их типовую популяцию. В качестве ориентировочных значений можно использовать приведенные ниже данные.

14. ОГРАНИЧЕНИЯ

Строгое следование инструкциям к прибору и реактиву необходимо для получения достоверных результатов.

Бактериальная контаминация или нагревание пробы могут повлиять на результат исследования.

Определение соотношения свПСА/ПСА полезно только для диагностики и скрининга карциномы простаты до начала лечения. К настоящему моменту не существует достоверных клинических результатов о возможности его использования во время лечения. Терапевтическое вмешательство может существенно повлиять на соотношение концентраций фракций ПСА, и, значит, вышеприведенного граничное значение не может быть использовано.

ПСА содержит 6 основных эпитопов, которые могут различаться по своей экспрессии. У больных доброкачественной гиперплазией простаты могут образовываться аутоантитела к ПСА. Все эти эффекты могут случайным образом повлиять на результат измерения концентрации ПСА, особенно фракции антигена, связанного с АХТ, а, значит, и на результат вычисления соотношения свПСА/ПСА.

Также было показано, что манипуляции с простатой (например, пальцевое ректальное обследование) может вызвать изменение соотношения свПСА/ПСА.

Пробы пациентов, получающих препараты мышиных моноклональных антител в целях терапии или диагностики, могут содержать анти-мышиные антитела (НАМА). Результаты исследования таких проб с помощью иммунологических методик, основанных на использовании моноклональных антител, могут быть завышены или занижены. Несмотря на то, что НАМА-нейтрализующие компоненты входят в состав реактивов, слишком высокие концентрации НАМА могут случайным образом исказить результаты измерений.

В связи с этим при постановке диагноза результаты всегда следует рассматривать вместе с данными истории болезни и других диагностических исследований.

15. СПЕЦИФИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ИССЛЕДОВАНИЯ

15.1 Аналитическая специфичность.

Аналитическую специфичность можно определить, как способность теста безошибочно выявлять специфический анализ в присутствии потенциально мешающих факторов в матриксе пробы (например, антикоагулянтов, гемолиза, результата обработки пробы).

15.2 Интерференция: контролируемые исследования потенциально мешающих факторов или условий продемонстрировали, что характеристики теста не менялись в присутствии гемолиза (вплоть до концентрации гемоглобина 1000 мг/дл), липемии (вплоть до концентрации триглицеридов 30 мг/мл), билирубинемии (вплоть до концентрации билирубина 0,2 мг/мл).

15.3 Перекрестная реактивность:

Интерференция метотриксата, циклофосфамида или доксорубина в терапевтических дозах не обнаружена.

15.4 Точность при исследовании на анализаторе LIAISON®

Различные пробы, содержащие разные концентрации специфического анализатора, были проанализированы с целью определения повторяемости и воспроизводимости теста (то есть вариабельности внутри серии и между сериями).

Вариация внутри серии			Вариация между сериями		
Среднее значение (нг/мл)	КВ (%)	Кол-во	Среднее значение (нг/мл)	КВ (%)	Кол-во
0,60	4,7	40	0,98	8,1	25
4,25	3,3	40	1,93	6,8	25
7,70	3,3	40	4,19	4,1	25
21,81	2,0	40	16,47	5,3	22

15.5 Точность при исследовании на анализаторе LIAISON® XL

Различные пробы, содержащие разные концентрации специфического анализатора, были проанализированы с целью определения повторяемости и воспроизводимости теста (то есть вариабельности внутри серии и между сериями).

Вариация внутри серии			Вариация между сериями		
Среднее значение (нг/мл)	КВ (%)	Кол-во	Среднее значение (нг/мл)	КВ (%)	Кол-во
0,56	3,2	20	0,44	8,3	20
1,73	3,4	20	1,58	4,6	20
7,01	2,6	20	7,14	7,9	20
19,53	2,2	20	13,75	3,3	20

15.6 Правильность исследования

Правильность исследования была определена с помощью теста разведения.

15.7 Тест разведения.

Пробы (сыоротка) с высокой концентрацией свободного ПСА были исследованы перед и после разведения. Результаты были проанализированы с помощью метода линейной регрессии.

Разведение	Полученные значения (мг/л)	Ожидаемые значения (мг/л)	Восстановление (%)
1:1,25	8,01	8,22	97
1:1,67	5,79	6,17	94
1:2,5	4,19	4,11	102
1:5	2,22	2,06	108
1:10	1,03	1,03	100

15.8 Тест восстановления.

Пробы с внесением свободного ПСА были с помощью LIAISON® fPSA.

В таблице представлены результаты восстановления разного количества свободного ПСА внесенного в дилуент (0 нг/мл).

Начальная концентрация: 9,56 нг/мл.

Полученные значения (нг/мл)	Ожидаемые значения (нг/мл)	Восстановление (%)
10,20	9,56	107
7,97	7,66	104
5,56	5,75	97
4,18	3,85	109
2,14	1,94	110

15.9 Эффект высокой дозы

Эффекта насыщения не наблюдалось до концентрации свободного ПСА 10000 нг/мл.

При исследовании проб с крайне высокой концентрацией аналита, может наблюдаться эффект занижения результатов за счет влияния эффекта насыщения. Оценка влияния эффекта насыщения была проведена путем исследования пяти высококонцентрированных свободным ПСА-смешанных образцов. Результат анализа, как и ожидалось, превышал верхнюю границу измеряемого диапазона и, значит, не привел к ошибочной классификации пробы.

15.10 Аналитическая чувствительность:

определенная как минимальная концентрация от 0 с 2 стандартными отклонениями составила менее $\leq 0,04$ нг/мл.