

СПб ГУЗ «Городской клинический онкологический диспансер»

Е.О. Комлева

**Диагностическая и прогностическая значимость
количественного определения простатического
специфического антигена (ПСА)
в сыворотке крови**

Санкт-Петербург
2010

Это один из случаев, когда исключительно логическое мышление должно быть использовано для тщательного анализа и отбора уже известных факторов.
А. Конан-Дойль «Записки о Шерлоке Холмсе»

Рак предстательной железы является одним из самых распространенных злокачественных новообразований у мужчин и относится к наиболее важным социальным проблемам современности. Для диагностики данного заболевания используется комплексный подход, включающий лабораторное определение уровня онкологических маркеров, проведение ультразвуковых исследований, анализ тканей опухоли.

Данное пособие посвящено одному из методов выявления рака предстательной железы - лабораторной диагностике. В издании подробно освещены основные правила проведения диагностики *in vitro*, приведены алгоритмы обследования пациентов, использование которых позволяет повысить выявляемость заболевания.

Методические рекомендации предназначены для врачей клинической лабораторной диагностики, врачей — онкологов и врачей других специальностей.

Список основных сокращений

ДГПЖ — доброкачественная гиперплазия предстательной железы.
ОМ — онкологический маркер (онкомаркер).
ПЖ — предстательная железа.
ПРИ — пальцевое ректальное исследование.
ПСА — простатический специфический антиген.
ПЦР — полимеразная цепная реакция.
РПЖ — рак предстательной железы.
РПЭ — радикальная простатэктомия.
ТРУЗИ — трансректальное ультразвуковое исследование.
УЗИ — ультразвуковое исследование.

ISBN

© Коллектив авторов, 2010
© Издательство 2010

Оглавление

Введение	5
Комплекс оптимальных характеристик лабораторного теста на онкомаркеры	8
Тактика рационального применения онкомаркеров	10
Рак предстательной железы. Распространенность заболевания. Необходимость скрининга. ПСА как наиболее эффективный скрининг-тест.....	12
Алгоритм стандартного обследования для диагностики рака предстательной железы	19
Варианты алгоритма диагностического обследования в зависимости от результатов первичной биопсии предстательной железы	21
ПСА. Природа антигена. Молекулярные формы.....	23
Дискриминационный уровень	25
Факторы, влияющие на уровень ПСА.....	26
Показания к проведению исследованию уровня ПСА.....	27
Методы количественного анализа ПСА	27
Преаналитический этап	27

Аналитический этап.....	29
Постаналитический этап	34
Лабораторный паспорт исследований на маркеры рака предстательной железы.....	29
Алгоритм оптимизации специфичности теста на ПСА.....	36
Мониторинг посттерапевтического уровня ПСА при раке предстательной железы.....	38
Молекулярная диагностика рака предстательной железы	40
Список литературы	47
Приложение 1. Требования, разработанные экспертами ВОЗ к скринингу для выявления злокачественных новообразований	49
Приложение 2. Инструкция по применению к набору реагентов для иммуноферментного определения общего ПСА в сыворотке крови	50
Приложение 3. Инструкция по применению к набору реагентов для иммуноферментного определения свободного ПСА в сыворотке крови	63
Приложение 4. Инструкция по применению набора контрольных материалов «Онкомаркеры» для контроля качества количественных методов клинических лабораторных исследований.....	77
Приложение 5. Рекомендации по выявлению хук-эффекта высоких концентрации при определении ПСА	82

Введение

Потенциал лабораторной медицины в области клинической онкологии характеризует выраженный динамизм развития. В немалой степени это ассоциируется как с внедрением в практику новых онкомаркеров (ОМ¹), так и с углублением наших знаний относительно разрешающей способности успешных сформировать «клон» классических. Простатический специфический антиген (ПСА) с полным основанием может быть выделен даже из числа последних.

ОМ впервые заинтересовали клиницистов еще в 1928г., когда Асхейм и Зондек сумели выделить из мочи хорионический гонадотропин человека (ХГЧ). Затем удалось доказать перспективность количественного определения гормона как одного из диагностических критериев хориокарциномы (трофобластическая опухоль).

В дальнейшем сложилось мнение, что ОМ являются макромолекулами (главным образом, белками с простетической группой в виде углеводов или липидов), повышение концентрации или первичная детекция которых в биологических средах (периферическая кровь, моча, содержимое кист, асцитическая жидкость, другой биологический материал), доказательно коррелирует с триадой факторов:

- наличие злокачественного новообразования (его рецидива);
- прогноз клинического течения опухолевого процесса;
- резекция (редукция) опухоли, как результат проведенного лечения.

¹ Более корректным термином является — маркеры, ассоциированные с опухолями.

Общепринятая классификация ОМ продолжает нуждаться в своей разработке. Заслуживает внимания предложение учитывать их биохимическую структуру, функции в обеспечении нормальной жизнедеятельности клетки, роль в процессах эмбриогенеза организма человека (биологическая классификация ОМ). Руководствуясь сформулированными критериями удастся выделить ряд групп ОМ:

- Онкофетальные и онкоплацентарные антигены (РЭА, АФП, β -ХГЧ, трофобластический β -глобулин).
- Гликопротеины, ассоциированные с опухолями (СА 125, СА 19-9, СА 15-3, СА 72-4, СА 242, SCC).
- Цитокератины (антиген рака мочевого пузыря UBC, CYFRA 21-1, TRA, TPS).
- Ферменты (ПСА, HCE, Tu M2-PK, Bone TRAP 5b).
- Цитокины [ИЛ-6, ИЛ-10, эпидермальный фактор роста (EGF), VEGF и др.].
- Белки острой фазы воспаления [С-реактивный белок (CRB), ферритин].

Сейчас установлено, что ОМ представляет собой продукт синтеза метаболически дезогранизованной опухолевой клетки. К настоящему времени идентифицировано свыше 200 подобных соединений, однако практический интерес для целей клинической лабораторной диагностики, представляет сравнительно ограниченный их перечень (Табл. 1).

Таблица 1. Наиболее информативные онкомаркеры для различных злокачественных новообразований.

Локализация карцином	Опухолевые маркеры
Рак молочной железы	СА 15-3, РЭА, TPS, СА 72-4 (гормоны пролактин, эстрадиол)
Опухоли яичников: эпителиальные, герминогенные, гранулёзочелюточные	СА 125, СА 72-4, СА 19-9, β -ХГЧ, АФП, Эстрадиол, ингибин
Опухоли яичек	β -ХГЧ, АФП
Рак шейки матки	SCC, РЭА, TPS, CYFRA 21-1
Рак вульвы	SCC
Рак эндометрия	СА 125, СА 19-9, РЭА, СА 72-4
Рак пищевода	SCC, Tu M2-PK
Рак желудка	СА 72-4, РЭА, СА 19-9
Рак кишечника	РЭА, СА 19-9, СА 72-4, Tu M2-PK
Рак поджелудочной железы	СА 19-9, СА 242, Tu M2-PK
Рак мочевого пузыря	UBC, ВТА, NMP-22, SCC
Рак почки	Tu M2-PK, SCC, СА 125
Рак предстательной железы	ПСА _{общ.} , ПСА _{св.} /ПСА _{общ.}
Рак легкого: мелкоклеточный, плоскоклеточный, аденокарцинома, крупноклеточный	HCE, РЭА, Tu M2-PK, SCC, CYFRA 21-1, РЭА, РЭА, Tu M2-PK, СА 72-4, SCC, CYFRA 21-1, РЭА
Рак щитовидной железы: фолликулярный, папиллярный, медулярный	Тиреоглобулин, ТТГ, Кальцитонин, РЭА
Меланома	S-100
Костные метастазы	Bone-TRAP-5b

Комплекс оптимальных характеристик лабораторного теста на ОМ.

Комплекс оптимальных характеристик лабораторного теста на ОМ должен включать следующие параметры:

- высокое качество измерений:
 - надежность,
 - правильность,
 - точность;
- воспроизводимость результатов (значение коэффициента вариации — CV внутри теста и между тестами соответственно <5% и <10%;
- широкий аналитический диапазон;
- специфичность >95%;
- чувствительность >50%;
- положительная корреляция получаемых результатов с клеточной массой злокачественного новообразования;
- возможность проведения аналитической процедуры в условиях современной клинико-диагностической лаборатории;
- приемлемый уровень финансовых и временных затрат;
- использование экологически безопасных реагентов.

Соответствие продукции требованиям Евросоюза по критерию безопасности, которые отражают стандарты качества ISO 9001:2000; ISO 13 485 подтверждается за счет наличия специальной маркировки (CE).

Специфичность ОМ — частота получения истинно отрицательных результатов его диагностического поиска у здоровых лиц или в условиях наличия доброкачественной опухоли. Специфичность измеряют в %.

Очевидно, что чем ниже оказывается доля (процент) ложноположительных результатов обнаружения данного ОМ, тем закономерно выше его специфичность при раке конкретной локализации.

Чувствительность ОМ — частота получения истинно положительных результатов его динамического поиска онкологических больных, для которых признают специфичным данный ОМ. Чувствительность измеряют в %.

Таким образом, чем с большей частотой (в более значительном проценте случаев) данный ОМ обеспечивает адекватность диагностики злокачественной опухоли, тем закономерно выше его чувствительность при раке конкретной локализации.

Существенной характеристикой каждого ОМ является также дискриминационный уровень (ДУ). Последний приравнивается к верхней границе концентрации соответствующего протеина в исследуемой биологической среде организма клинически здоровых индивидуумов.

Маркер может рассматриваться в качестве опухолевого, когда при заданном значении ДУ, его специфичность составляет как минимум 90–95%, а чувствительность >50%.

Жесткость требований (одновременное наличие 100% специфичности и чувствительности), традиционно предъявляемых к маркеру, работающему как идеальный, не позволяет рассматривать в данном качестве, любой из ныне известных ОМ. Доказано также, что подобная оценка сохраняет свою правомерность и в отношении различных вариантов их совместного применения.

Тактика рационального применения онкомаркеров.

Базовый принцип использования ОМ в клинико-лабораторной диагностике сводится к получению аналитически корректных результатов. Кроме того, соответствующая информация должна обладать и очевидной с клинических позиций значимостью.

Соответствующая постановка вопроса ассоциируется с реальной возможностью за счет определения уровня ОМ обеспечить:

- рациональное направление диагностического поиска при подозрении на онкологическое заболевание;
- получение исходной информации для формулирования прогноза его развития;
- мониторинг течения заболевания и контроль эффективности проводимой (проведенной) терапии [рекомендации, разработанные Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ), применительно именно к последнему варианту ситуации предоставлены в Табл. 2].

Таблица 2. График проведения исследований уровня онкомаркеров (рекомендации ВОЗ).

Время после окончания лечения (годы)	Периодичность тестирования
1-й	1 раз в мес.
2-й	1 раз в 2 мес.
3-й	1 раз в 3 мес.
4 - 5-й	1 раз в 6 мес.

Примечание. Время для тестирования посттерапевтического уровня ОМ (принимается за исходный в процессе дальнейшего мониторинга) требуется устанавливать, руководствуясь длительностью биологического периода полужизни конкретного маркера. Уровень ОМ необходимо контролировать при наличии подозрения на рецидив и/или метастаз опухоли, а также перед любым значимым изменением курса лечения.

В процессе осуществления контроля за динамикой уровня ОМ, требуется учитывать эффект кумуляции факторов, которые могут оказать влияние на конечный результат процедуры тестирования *in vivo*, а также *in vitro*.

Факторы, влияющие *in vivo* на уровень ОМ в крови:

- пол, возраст, физиологическое состояние (беременность, менопауза, фаза менструального цикла), национальная и этническая принадлежность, генетически обусловленные особенности пациента;
- наличие и характер сопутствующих заболеваний;
- условия получения пробы крови;
- применение определенных диагностических исследований (биопсия, колоноскопия, пальцевое ректальное исследование (ПРИ), рентгенография, цистоскопия);
- характер опухоли (гистологический тип, клеточная масса, кровото- и лимфоснабжение);
- наличие метастазов и рецидива опухоли;
- характер проводимого (проведенного) лечения (хирургическая операция — радикальность, продолжительность времени после выполнения; химиотерапия, лучевая терапия), эффективность соответствующих технологий;

- продолжительность биологического периода полужизни ОМ, активность его биотрансформации;
- прием определенных лекарственных препаратов и/или БАД;
- воздействие на организм пациента токсичных соединений (прием алкоголя, табакокурение, токсико- и наркомания).

Факторы, влияющие in vitro на уровень ОМ в крови:

- условия транспортировки и хранения пробы крови, ее контаминация;
- продолжительность времени между получением пробы и ее центрифугированием;
- наличие гемолиза, иктеричность, липемия сыворотки;
- интерференция определенных лекарственных средств и/или БАД.

Рак предстательной железы. Распространенность. Необходимость скрининга. ПСА как наиболее эффективный скрининг-тест.

Рак предстательной железы (РПЖ) — злокачественная опухоль (рак простаты), развивающаяся из эпителия выводных протоков и секреторных отделов ПЖ.

РПЖ — безусловно наиболее распространенное среди встречающихся у мужчин онкологических поражений мочеполовой системы. Согласно некоторым оценкам, рак данной локализации становится в мировом масштабе причиной смерти >204 000 человек ежегодно. На протяжении этого же периода, от РПЖ умирают около 30 350 американцев и 85 200 жителей Европы.

Одновременно подчеркивают, что болезнь, по-существу, не регистрируется ранее 40 лет а затем с каждым из последующих десятилетий жизни становится все более частой.

В России РПЖ среди злокачественных заболеваний мужчин занимает 4-е место (после рака легкого, желудка и кожи). Абсолютное количество заболевших РПЖ в РФ — 16 861 случаев, что в структуре онкологической заболеваемости мужчин составляет 7,7% (статистические данные за 2005 г).

Не может не настораживать и современный темп прироста распространения РПЖ, уступающий только свойственному для рака легких.

Более детальный анализ ситуации, которая складывается в РФ, заставляет констатировать: практически у 70% больных РПЖ впервые диагностируется на III или даже IV стадии.

Таким образом, количество мужчин, страдающих РПЖ, ощутимо превышает количество опухолей, выявленных своевременно. Этим обусловлены высокие показатели летальности в течение первого года после обнаружения РПЖ, а также факт слабо выраженного увеличения индекса накопления живущих пациентов.

В свете всего сказанного, РПЖ должен быть отнесен к числу актуальных медико-социальных проблем мужской популяции.

Заболеваемость РПЖ в Санкт-Петербурге занимает второе место в структуре онкопатологии мужского населения (*Табл. 3*)

Таблица 3. Структура основной онкологической заболеваемости мужского населения Санкт-Петербурга (данные Популяционного ракового регистра за 2008 г).

Ранг	Локализация опухоли	Код МКБ-10	Абсолютное число	%
1	Трахея, бронхи, легкое	С 33, 34	1290	17,3
2	Предстательная железа	С 61	853	11,4
3	Желудок	С 16	754	10,1
4	Ободочная кишка	С 18	602	8,1

Показателен также рост численности больных РПЖ, который регистрируется в Санкт-Петербурге, начиная с 1990 г. Как видно из данных (Табл. 4), он оказался к настоящему времени более, чем 3-х кратным. Подобная динамика в целом повторяет тренд, объективно фиксируемый в развитых странах мира.

Таблица 4. Динамика количества больных РПЖ в Санкт-Петербурге за период 1990 – 2008 гг.

Годы наблюдения	1990	1995	2000	2005	2006	2007	2008
Кол-во больных РПЖ	1158	1231	2080	3081	3324	3551	3981

Косвенным подтверждением этого вывода является увеличение (Табл. 5) контингента больных, прошедших лечение по поводу РПЖ в Городском клиническом диспансере Санкт-Петербурга (ГКОД СПб).

Таблица 5. Динамика количества больных РПЖ, прошедших лечение в ГКОД СПб за период 2006 – 2008 гг.

Годы наблюдения	2006		2007		2008	
	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%
Кол-во больных РПЖ	261	1,23	392	1,72	434	1,80

Примечание. Абс. — абсолютное количество больных РПЖ.

Таким образом, существует настоятельная необходимость внедрения программы скрининга¹, которая позволяет выявить локализованные формы РПЖ у мужчин, начиная с 50-летнего возраста.

Целесообразность проведения скринингового обследования контингента геронтологического профиля должна оцениваться с учетом триады лимитирующих факторов:

- возраст;
- наличие интеркуррентных заболеваний;
- предполагаемая продолжительность жизни.

Резолюция международного симпозиума «Рак предстательной железы» (Санкт-Петербург, 1999 г.) рекомендовала для внедрения в качестве скрининга комплекс, состоящий из трех методов:

- количественное определение простатического специфического антигена (ПСА) в сыворотке крови;
- кожно-пальцевое ректальное исследование (ПРИ);
- трансректальное ультразвуковое исследование (ТРУЗИ).

¹ Скрининг (от англ. screen – просеивать) — целенаправленное выявление отклонений в состоянии здоровья групп риска, обеспечиваемое за счет использования отвечающих ряду специальных требований диагностических технологий (скрининг-тестов). Набор последних образует скрининг-программу. Рекомендации экспертов Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) по данному вопросу изложены в Приложении 1.

При этом уточняется, что скрининговые тесты необходимо проводить один раз в год, а для пациентов группы высокого риска по РПЖ — один раз в шесть месяцев.

Роль изложенной программы скрининга на РПЖ в противо-раковой борьбе предопределяет оптимальное сочетание достаточной простоты используемых методов и потенциальной возможности обнаружения ранних (внутрикапсулярных) стадий карциномы.

Тем самым увеличивается вероятность благоприятного исхода хирургического лечения заболевания и отсутствия выраженного ухудшения качества жизни пациента.

Характерно, что страны, широко использующие скрининг на РПЖ, демонстрируют практически оптимальные показатели 5-летней выживаемости получивших лечение больных (около 100%).

Подобный эффект несомненно связан с реальной возможностью диагностировать локализованные и местнораспространенные формы РПЖ (стратегия выявления за счет скрининга пациентов с ранними стадиями развития опухоли).

Между тем, в условиях диссеминированного процесса (стадия РПЖ чаще всего диагностируемая у больных, самостоятельно обратившихся за специализированной медицинской помощью), выживаемость по 5-летнему сроку наблюдения оказывается значительно сниженной (как правило, не более 30%).

Интегральная характеристика значимости рассматриваемого скрининга складывается из увеличения выявляемости РПЖ (на 82%), при одновременном возрастании количества случаев его диагностирования в дومتастатической стадии (на 13,9%). В качестве закономерного итога, благодаря проведе-

нию скрининга регистрируется известное снижение смертности от данной опухоли (на 4%).

Одним из подтверждений превентивной роли рассматриваемой технологии скрининга на РПЖ являются результаты его 5-летнего применения на базе Российского онкологического научного центра Академии медицинских наук (РОНЦ РАМН) им. Н.Н. Блохина.

За период 1996–2000 гг. в процессе профилактического обследования 1 129 клинически здоровых мужчин (возраст пациентов составил 40–80 лет), РПЖ был диагностирован в 64 случаях или у 5,54% соответствующего контингента пациентов (Табл. 6).

Таблица 6. Динамика количества больных РПЖ по результатам скрининга в РОНЦ РАМН (период 1996–2000 гг.).

Годы наблюдения	1996		1997		1998		1999		2000		1996-2000	
	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%
Кол-во больных РПЖ	54	4,8	6	0,5	3	0,25	1	0,09	0	0	64	5,64

Примечание. Абс. — абсолютное количество больных РПЖ

Около 80% выявленных опухолей оказалось представленным аденокарциномой различной степени дифференцировки. Остальные случаи РПЖ имели смешанную природу.

В результате параллельного изучения диагностической ценности отдельных компонентов скрининга, удалось доказать, что максимальное значение чувствительности (94,3%) отличает тест на уровень ПСА в сыворотке крови (Табл. 7).

Таблица 7. Диагностическая ценность различных скрининг-тестов на РПЖ.

Диагностический параметр скрининг-теста %	Скрининг-тест		
	ПРИ	ТРУЗИ	Уровень ПСА
Чувствительность	55,7	69,4	94,3
Специфичность	95,7	92,2	88,5

Известно, что в Санкт-Петербурге реализовалась программа «Онкология 2001–2005 гг.». В ее рамках клинико-диагностическая лаборатория Городского клинического онкологического диспансера (ГКОД СПб) провела исследование уровня ПСА сыворотки крови у 3 980 пациентов (возраст 50–75 лет).

Таблица 8. Уровень ПСА в сыворотке крови обследованных больных (данные ГКОД СПб за 2001–2005 гг.).

Уровень ПСА (нг/мл)	Абс.	%
0 - 4	2 426	61,0
4 - 10	568	14,3
10 - 20	342	8,6
> 20	644	16,1

Уровни ПСА, которые были получены в ходе второго этапа нашей работы (2006–2008 г.), связанного с обследованием 2 851 больного, дали основание распределить весь массив аналитических величин на 6 диапазонов (Табл. 9).

Таблица 9. Распределение больных по уровню ПСА в сыворотке крови (данные ГКОД СПб за 2006–2008 гг.).

Уровень ПСА (нг/мл)	Годы наблюдения					
	2006		2007		2008	
	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%
0 - 4	243	64,3	237	67,0	1 180	55,7
> 4 - 10	56	14,8	67	18,9	382	18,0
> 10 - 20	27	7,2	22	6,2	158	7,6
> 20 - 50	22	5,8	12	3,4	142	6,6
> 50 - 100	5	1,3	6	1,7	71	3,4
> 100	25	6,6	10	2,8	186	8,7
Всего	378		354		2 119	

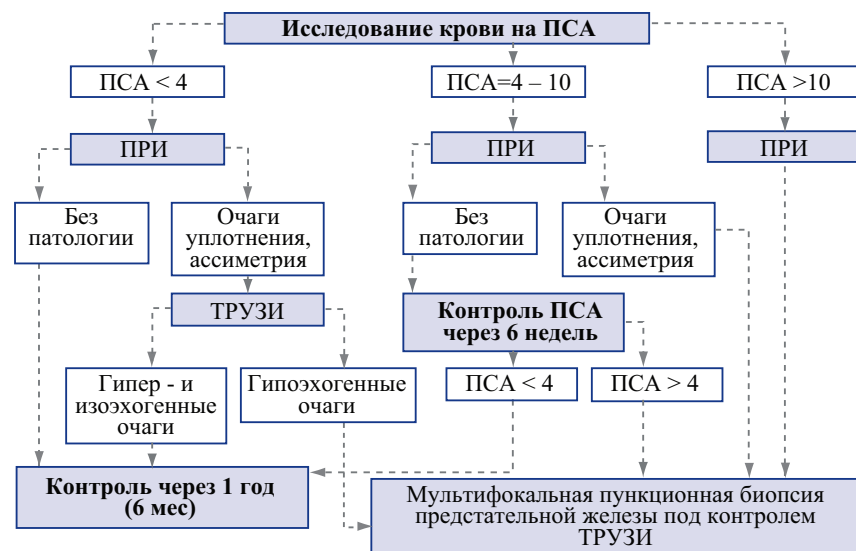
Алгоритм стандартного обследования для диагностики рака предстательной железы.

Результаты определения ПСА нашли эффективное использование как исходная информация в алгоритме диагностического поиска при наличии подозрения на РПЖ (Схема 1).

Если концентрация ПСА <4 нг/мл и результат ПРИ не выявляет наличия опухоли, повторный осмотр требуется через один год (для пациентов с отягощенной по РПЖ наследственностью — через шесть месяцев).

При уровне ПСА >4 нг/мл и наличии пальпаторно определяемых участков уплотнения ПЖ показано ТРУЗИ. В случае выявления гиперэхогенных (кальцинаты) или изоэхогенных тканей (узлы доброкачественной гиперплазии ПЖ – ДГПЖ) рекомендуется контроль состояния пациента через 6–12 месяцев. Выявление очагов гипоэхогенного характера делает показанным мультифокальную пункционную биопсию ПЖ под контролем ТРУЗИ.

Схема 1. Алгоритм стандартного обследования для диагностики РПЖ.



Примечание. ПСА – (нг/мл).

Если ПРИ не обнаруживает патологических изменений ПЖ, а уровень ПСА соответствует, так называемой серой зоне (4-10 нг/мл), следует рекомендовать повторное определение онкомаркера через 6 недель. Указанный период используют для проведения двух – или трехнедельного курса антибактериальной терапии. В случае снижения концентрации ПСА до нормального уровня (< 4 нг/мл), обследование прекращают на 6–12 месяцев.

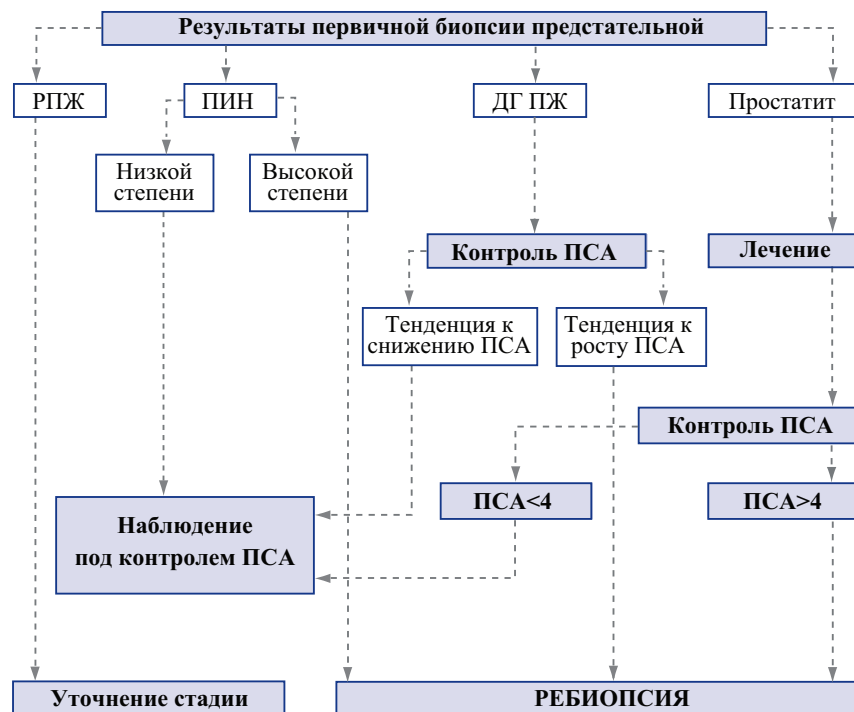
Если при повторном анализе высокий уровень ПСА продолжает сохраняться, необходима мультифокальная пункционная биопсия ПЖ под контролем ТРУЗИ. На фоне сочетания умеренного (в пределах 4–10 нг/мл) повышения концентрации ПСА и наличия диагностируемых пальпаторно изменений ПЖ, также показана биопсия. При значениях ПСА >10 нг/мл ее требуется выполнять в обязательном порядке.

Варианты алгоритма диагностического обследования в зависимости от результатов первичной биопсии предстательной железы.

В условиях выявления простатической интраэпителиальной неоплазии (ПИН) низкой степени (low-grade-PIN) наблюдение пациента допустимо ограничить контролем уровня ПСА. При наличии же участков ПИН высокой степени (high-grade-PIN) требуется выполнить повторную биопсию ПЖ через 3 месяца. В пользу рациональности подобной тактики свидетельствует быстрое развитие РПЖ на фоне соответствующей ПИН.

Ребиопсия показана и в тех ситуациях, когда, несмотря на результат первичного обследования, выявивший наличие ДГПЖ, у пациента фиксируется высокий (>10 нг/мл) уровень ПСА или происходит интенсивный ($\geq 20\%$ за 6 месяцев) прирост значения данного параметра (Схема 2).

Схема 2. Варианты алгоритма диагностического обследования в зависимости от результатов первичной биопсии ПЖ.



ПСА. Природа антигена. Молекулярные формы.

ПСА признан в качестве лучшего скринингового маркера для выявления РПЖ на ранней, отличающейся достаточно благоприятным прогнозом стадии развития опухоли.

Данный ОМ является гликопротеином (сериновая протеаза семейства калликреинов с молекулярной массой 34 кДа), образованным полипептидной цепью из 237 аминокислот и 5 дисульфидных связей, содержит 10% углеводных остатков.

Впервые ПСА был выделен из экстракта ПЖ (М. Wang и соавт., 1979), эпителиальными клетками которой он продуцируется (органоспецифичность ОМ), как в физиологических условиях, так и с повышенной активностью при гиперплазии ПЖ. В качестве ОМ начал применяться с 1987 г.

Минимальные количества ПСА постоянно присутствуют и в организме женщин (эпителиальные клетки молочной железы, парауретральных желез, эндометрия).

Экзокриновая функция ПСА состоит в разжижении (улучшении реологических показателей) эякулята за счет характерной для антигена трипсино- и химотрипсиноподобной активности.

Ген ПСА имеет участок с определенной гомологичной последовательностью для андрогенов, в связи с чем биосинтез ПСА-белков контролируется действием андрогенов через андроген-рецепторы эпителиальных клеток желез простаты. Считают, что андрогены непосредственно регулируют транскрипцию гена ПСА.

Идентифицированы три формы ПСА, одновременно и в определенных соотношениях (Табл. 10) присутствующие в сы-

воротке крови: свободная (10–30%), а также две разновидности формы, связанной с ингибиторами протеаз — комплекс с α_1 -антихимотрипсином — АХТ (70–95% — преобладающая форма) или — с α_2 -макроглобулином (0,1%).

Последний комплекс иммунологически неактивен, тогда как другие формы ПСА могут быть определены с применением иммунологических методов исследования.

Уровень общего ПСА представляет собой арифметическую сумму концентраций свободной и связанной форм антигена. Биологический период полужизни общего ПСА — 2–3 дня, свободного — 7 часов.

Таблица 10. Молекулярные формы ПСА.

Молекулярные формы ПСА	Ингибиторы протеаз	Молекулярная масса, кД	Относительная концентрация в сыворотке крови, %
Свободный ПСА (активная и неактивная формы) ПСА- α_1 -АХТ ПСА- α_1 -ИП	— α_1 -АХТ α_1 -ингибитор протеаз	34 100 80 и 190	10 - 30 70 - 90 <1 (обнаруживается в сыворотке при концентрации >40 нг/мл)
ПСА- α_2 -МГ	α_2 -МГ	800	<0,1 (не измеряется методом иммуноферментного анализа)

Примечание.

ПСА- α_1 -АХТ — ПСА, связанный с α_1 антихимотрипсином;

ПСА- α_1 -ИП — ПСА, связанный с α_1 ингибитором;

ПСА- α_2 -МГ — ПСА, связанный с α_2 макроглобулином.

Дискриминационный уровень.

Физиологическая концентрация ПСА_{общ.} в сыворотке крови мужчин, которые имеют возраст не старше 50 лет ≤ 4 нг/мл (Табл. 11).

Таблица 11. Диагностическая шкала концентрации ПСА_{общ.}

Квалификационный вариант уровня ПСА		
Пороговый	Пограничный (серая зона)	Патологический
Концентрация ПСА (нг/мл)		
< 4,0	4 - 10,0	> 10,0

Адекватная интерпретация результатов исследования ПСА предполагает учет контрольного уровня антигена (точки разделения или cut-off). Последний соответствует значению допустимой верхней границы концентрации ОМ в крови здоровых людей и у пациентов с доброкачественной опухолью (например, с диагностированной доброкачественной гиперплазией ПЖ). Для ПСА cut-off находится в диапазоне 4–10 нг/мл.

Концентрация ПСА_{общ.} постепенно увеличивается во второй половине жизни. Таким образом, верхняя граница физиологического уровня антигена для различных возрастных периодов должна устанавливаться дифференцированно. Известна в этом плане роль и этнической принадлежности пациента. Ниже (Табл. 12) представлены данные, конкретизирующие значение каждого из рассмотренных факторов.

Таблица 12. Диагностическая шкала концентрации ПСА_{общ.}

Возраст, количество лет	Азиаты	Афроамериканцы	Белые
	ПСА нг/мл		
40 - 49	2.0	2.0	2.5
50 - 59	3.0	4.0	3.5
60 - 69	4.0	4.0	4.5
70 - 79	5.0	5.0	6.5

Факторы, влияющие на уровень ПСА.

Причины повышения уровня ПСА_{общ.}

- Рак предстательной железы.

Причины повышения уровня ПСА_{общ.}, не связанные с РПЖ.

- Доброкачественная гиперплазия предстательной железы.
- Простатит.
- Инфаркт предстательной железы.
- Цистоскопия.
- Биопсия предстательной железы.
- Пожилой и, особенно, старческий возраст.

Причины повышения уровня ПСА_{своб.}, не связанные с РПЖ.

- Механическое раздражение предстательной железы (в частности, пальцевое ректальное исследование).
- Эякуляция.
- Езда на велосипеде.

Показания к проведению исследования уровня ПСА.

- Скрининг с целью раннего выявления РПЖ.
- Дифференциальная диагностика РПЖ и ДГПЖ.
- Прогноз развития РПЖ.
- Контроль при радикальном хирургическом лечении РПЖ.
- Мониторинг с целью оценки эффективности консервативной терапии и доклинического выявления рецидивов РПЖ.

Методы количественного анализа ПСА.

- Иммуноферментный (ИФА)¹.
- Радиоиммунологический (РИА).
- Хемилюменесцентный (ХЛА).
- Электрохемилюменесцентный (ЭХЛА).
- Молекулярно-генетический (МГА).
- Точность и правильность результата количественного определения ПСА не могут быть достигнуты без адекватного учета мешающего влияния комплекса факторов, которые характерны для отдельных этапов данного исследования.

Преаналитический этап.

Требования к подготовке пациента.

Проба крови для тестирования должна быть получена в условиях точного соблюдения рутинных требований, из которых складывается оптимальная технология подготовки пациента

¹ Приложения 2 и 3 содержат инструкции по применению наборов для иммуноферментного определения общего и свободного ПСА в сыворотке крови.

при клиническом анализе крови.

Важно лишний раз подчеркнуть необходимость отмены приема любых лекарственных средств и БАД не позднее, чем за 24 часа до проведения лабораторного исследования. Кроме того, в течение этого же времени пациенту должно быть рекомендовано половое воздержание.

Подъем уровня ПСА, как известно, регистрируется в ответ на проведение колоноскопии, лазерной терапии при трансуретральной биопсии, ТРУЗИ, цистоскопии.

Таким образом, к определению уровня ПСА необходимо приступать до указанных процедур, либо через 7 дней (в случае биопсии ПЖ и цистоскопии, даже через месяц) после их назначения.

Для биохимического контроля результатов хирургического лечения РПЖ, уровень ПСА целесообразно тестировать не ранее, чем через 2—3 мес. после выполнения операции. В противном случае увеличивается вероятность получения ложноположительных результатов, обусловленных незавершенностью клиренса предоперационных концентраций антигена.

В случае необходимости дифференцировать повышение уровня ПСА, связанное с развитием воспалительного процесса в ПЖ (абсцесс, простатит), от объясняемого ее малигнизацией, тестирование антигена необходимо провести повторно. Исследование требуется приурочить к завершению курса антибактериальной терапии. При РПЖ полученный результат не будет отличаться от исходного или превышать его.

Требования к пробе.

Центрифугировать пробу (отделять сыворотку) требуется сразу после взятия крови (допускается интервал с продолжи-

тельностью не более 1 часа между этими операциями). В бланке направления на анализ должно быть указано точное время получения пробы крови.

Сыворотки, которые имеют визуальные признаки гемолиза эритроцитов, а также липедемии, не подлежат дальнейшему исследованию.

В случае вынужденной необходимости отсрочить выполнение анализа, предельный срок хранения сыворотки составляет 24 часа (при температуре +4°C) или 6 месяцев (при температуре — 20°C).

Сыворотка крови, калибратор и контрольные материалы должны в процессе тестирования иметь температуру 18—25°C.

Содержимое пробирки после оттаивания рекомендуется несколько раз перевернуть в вертикальной плоскости, не допуская при этом пенообразования. Повторение цикла «замораживание — оттаивание» исключается.

С целью предупреждения контаминации проб, используемые в аналитической процедуре пластиковые пробирки (с устройством, которое позволяет их герметично закрывать), а также наконечники для пипеток должны быть одноразовыми.

Аналитический этап.

Базовым принципом работы клинко-диагностической лаборатории является обеспечение соответствия требованиям следующих регламентов:

- DIN EN ISO 15 189 — 2003 «Медицинские лаборатории. Частные требования к качеству и компетентности»;

- ГОСТ Р ИСО/МЭК 17 025 — 2006 «Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий»;
- ОСТ 91500.130001 — 2003 «Правила проведения внутрилабораторного контроля качества количественных методов клинических лабораторных исследований с использованием контрольных материалов».

Для проведения внутрилабораторного контроля качества можно рекомендовать панель контрольных материалов «ПолиКМ-онко» производства компании «Алкор Био» (Россия)¹. Ее использование позволяет оценить правильность и воспроизводимость полученного аналитического результата при количественном определении 11 онкомаркеров (АФП, пролактин, ПСА_{общ.}, ПСА_{своб.}, РЭА, СА 125, СА 15-3, СА 19-9, тиреоглобулин, ферритин, ХГЧ).

Среди импортных контрольных материалов заслуживает внимания ЛИПОЧЕК опухолевые маркеры. Уровень I и II для оценки качества исследований опухолевых антигенов [производитель компания «Био-Рад» (США)].

Специалист клинико-диагностической лаборатории должен быть информирован относительно аналитических характеристик тест-системы, которая используется для определения уровня ПСА (референсное значение, специфичность, чувствительность, диапазон измерения, точность, коэффициент вариации, хук-эффект высоких концентраций).

Это позволит не допустить технологических ошибок в процессе определения концентрации антигена (наиболее типичные из них представлены в Табл. 13), а также будет способствовать правильной интерпретации получаемых результатов.

¹ Приложение 4 содержит Инструкцию по применению набора контрольных материалов «Онкомаркеры» для контроля качества количественных методов клинических лабораторных исследований

Таблица 13. Потенциальные источники ошибочных результатов количественного определения ПСА.

Источник ошибки	Причина снижения качества измерений. Корректирующие мероприятия.
Хук-эффект при высоких концентрациях ¹	Характеризуется ошибочно низкими результатами теста. Хук-эффект удастся минимизировать за счет: а) использования на твердом носителе антител с высокой связывающей способностью; б) двойного разведения образцов; в) применения последовательного двухступенчатого анализа, включающего отмывку.
Перенос образца	Возможно получение ошибочно высоких концентраций анализируемого образца, отсутствие которых следует периодически контролировать.
Интерференция гетерофильных антител (анти-Ig G) или антител (АТ) к мышиным иммуноглобулинам (НАМА)	Ложноположительные или ложноотрицательные результаты могут быть получены в образцах, содержащих АТ к анти-Ig G, способные реагировать с АТ используемыми в анализе. Наличие НАМА часто индуцируемых у онкологических больных, которым вводили мышиные моноклональные АТ в целях лечения, также могут давать ошибочные результаты. [Подобную интерференцию удастся выявить за счет: а) повторного анализа образца после обработки блокирующим агентом (коммерчески иммобилизованным на пробирках); б) добавления к реакционной смеси неиммунной мышиной сыворотки; в) исследования образца другим методом].

Лабораторно-диагностический процесс всегда представляет собой комплекс измерительных систем, которые генерируют конечный аналитический результат за счет использования специфических составляющих (исходные реагенты, их дериваты, калибраторы, другие расходные материалы) в специфических условиях исследования (приборный парк, личность оператора).

При этом целевая установка производителей реагентов состоит в разработке и внедрении стабильных тест-систем, обладающих хорошей воспроизводимостью как внутри одной серии исследований, так и между отдельными их сериями. Необходимым условием достижения оптимальных значений точности и

¹ Приложение 5 содержит Рекомендации по выявлению хук-эффекта высоких концентрации при определении ПСА

воспроизводимости является проведение стандартизации реагентов в процессе их промышленного синтеза.

Современный рынок коммерческих наборов для определения ПСА характеризуется значительным разнообразием.

В связи с этим нами был проведен их сравнительный анализ, результаты которого сведены в *Табл. 14*. Как видно из последней, импортные биохимические наборы могут в практике работы клинико-диагностических лабораторий быть вполне адекватно заменены отечественными аналогами.

Таблица 14. Сравнительная оценка тест-систем, наиболее широко применяемых для количественного определения ПСА в сыворотке крови.

Наименование тест-системы	Производитель	Диапазон измерений нг/мл	Чувствительность нг/мл	Принцип метода	Стандартизация
Аксим ПСАобщ.	Эбботт (США)	0,1 - 50	0,04	ИФА на микро-частицах МИФА	Первый Международный Стандарт ВОЗ, 96/670
Аксим ПСАсвоб.	Эбботт (США)	0,9 - 10	0,02	ИФА на микро-частицах МИФА	Первый Международный Стандарт ВОЗ, 96/670
Архитект ПСАобщ.	Эбботт (США)	0 - 100	0,008	Сэндвич	NCCLS Документ EP-5A
Архитект ПСАсвоб.	Эбботт (США)	0 - 30	0,008	Сэндвич	NCCLS Документ EP-5A
Элексис ПСАобщ.	Хоффманн-Ля РОШ (Швейцария)	0,002 - 100	0,002	Сэндвич	Стендфордский Референтный Стандарт
Элексис ПСАсвоб.	Хоффманн-Ля РОШ (Швейцария)	0,01 - 50	0,01	Сэндвич	Референтный Стандарт ВОЗ, 96/668
Онко ИФА-общий ПСА	Алкор Био (Россия)	0 - 30	0,2	Сэндвич	РУ №ФС012а2003/5454-06 от 29.12.2006 Международный сертификат ISO 9001 - 2000
Онко ИФА-своб. ПСА	Алкор Био (Россия)	0,2 - 10	0,08	Сэндвич	РУ №ФС012а2003/5438-06 от 29.12.2006 Международный сертификат ISO 9001 - 2000

Постаналитический этап.

В лабораторном отчете следует отразить использованный метод тестирования уровня ПСА, референсное значение показателя, чувствительность анализа. Больные РПЖ, как известно, нуждаются в динамическом наблюдении, поэтому важно рационально организовать архивирование получаемой аналитической информации. Рекомендуется, во-первых, ее для наглядности представлять в виде графиков. Во-вторых, использовать паспорт лабораторных исследований на ОМ.

Разработанная нами форма соответствующего документа представлена ниже.

Объективизация факта повышения концентрации ПСА достигается за счет проведения повторного тестирования (надежность выводов, базирующихся на результатах однократного измерения приходится считать сомнительной).

В оптимальном варианте процесс аналитического сопровождения пациента требуется осуществлять без смены клиничко-диагностической лаборатории. Также постоянными должны быть применяемые тест-системы и метод исследования.

В случае изменения последнего, образец требуется первоначально исследовать с применением каждого из методов. Это позволит убедиться в стабильности уровня ПСА или охарактеризует его тренд.

Важным условием эффективности лечебного процесса при РПЖ является наличие отлаженной системы взаимодействия специалистов КДЛ и клиницистов. Лечащий врач должен быть, в частности, своевременно информирован об изменении применяемой аналитической технологии и/или тест-системы.

Лабораторный паспорт исследований на маркеры рака предстательной железы.

1. Лечебное учреждение _____
2. Фамилия _____ Имя _____
Отчество _____ больного
3. Возраст _____ лет
4. Диагноз _____ стадия I, II, III, IV (нужное подчеркнуть),
гистологический тип опухоли
5. Проведенное лечение _____

Таблица 1. Динамика уровня онкомаркеров.

Дата тестирования	Форма ПСА		ПСА _{своб.} x100% ПСА _{общ.}		Биокинетика ПСА	
					V прироста	ВУП
	нг/мл		%		нг/мл/год	месяцы
	ПСА _{общ.}	ПСА _{своб.}	ЛВ	РВ	ЛВ	РВ
	ЛВ	РВ	ЛВ	РВ		

Условные сокращения: ЛВ – Лабораторная величина, РВ – Референсная величина, V – Скорость прироста, ВУП – Время удвоения ПСА_{общ.}

Таблица 2. Лабораторный отчет о проведенных исследованиях.

Онкомаркер	Дата тестирования	Метод определения	Основное оборудование	Тест-система, ее чувствительность	Подпись врача КЛД
ПСА _{общ.}					
ПСА _{своб.}					
ПСА _{своб.} x100% ПСА _{общ.}					

Алгоритм оптимизации специфичности теста на ПСА

Изыскания в области повышения диагностической ценности рассматриваемого теста обозначили роль дополнительных к ПСА_{общ.} критериев:

- фракция свободного ПСА (ПСА_{своб.});
- процентное соотношение уровней свободного и общего ПСА (ПСА_{общ.}):

$$\frac{\text{ПСА}_{\text{своб.}}}{\text{ПСА}_{\text{общ.}}} \times 100\%$$

- референсные уровни ПСА_{общ.}, в зависимости от возраста пациента;
- *плотность ПСА* — отношение уровня ПСА_{общ.} к объему ПЖ, установленному с помощью ТРУЗИ (ППСА);
- плотность ПСА_{общ.} в переходной зоне ПЖ (ППСА ПЗ);
- размер прироста уровня ПСА_{общ.} за период ежегодного наблюдения.

Целесообразность исследования соотношения концентраций свободной (несвязанной) фракции ПСА и ПСА_{общ.}, для оценки характера патологического процесса, развивающегося в ПЖ, вполне очевидна.

Арифметическая величина указанного показателя не испытывает влияния фактора возраста. Известно также, что прогрессирование РПЖ и снижение доли ПСА_{своб.} коррелирует между собой. В противоположность этому, концентрация ПСА связанного с α_1 -химотрипсином, на фоне РПЖ увеличивается.

Итогом данных рассуждений является признание значения показателя (ПСА_{общ.}/ПСА_{своб.}) $\times 100\%$, равного 15%, как порогового для благоприятного прогноза при обнаружении гипертро-

фии ПЖ. Между тем, его уровень $< 15\%$ делает необходимым выполнение УЗИ и биопсии ПЖ, в силу увеличения вероятности наличия РПЖ.

Известно, что с возрастом, при условии сохранения нормальной функции тестикул, у мужчин регистрируется увеличение массы ПЖ (в пределах от 0,4 до 1,2 г/год). Отсюда возникает необходимость дифференцированной регламентации возрастного уровня антигена (Табл. 15).

Таблица 15. Возрастные референсные значения уровня ПСА_{общ.} для клинически здоровых мужчин (российская популяция).

Учитываемый показатель	Возраст, количество лет			
	40 - 49	50 - 59	60 - 69	70 - 79
ПСА _{общ.} , нг/мл	2,5	3,5	4,5	6,5

Современная технология диагностики характера гипертрофических процессов в ПЖ предполагает учет данных (Табл. 15). Вероятность наличия РПЖ актуализируется по мере роста превышения результатов тестирования в сравнении с возрастной нормой ПСА_{общ.} для данного пациента. Рассматриваемый диагностический алгоритм, несомненно, более предпочтителен, чем базирующийся на использовании «всевозрастного» порогового уровня концентрации антигена.

Заслуживает также внимания размер ежегодного прироста уровня ПСА_{общ.} Пороговое значение указанного прироста ранее принималось на уровне 0,75 нг/мл и, соответственно, превышение данного показателя связывали с риском развития РПЖ. В послед-

нее время преобладает мнение, что для мужчин до 60-летнего возраста размер прироста уровня ПСА должен быть 0,4 нг/мл/год.

Мониторинг посттерапевтического уровня ПСА при раке предстательной железы.

С учетом продолжительности элиминации из организма остаточных количеств ПСА_{общ.}, к лабораторному контролю результатов хирургического лечения РПЖ следует приступать не ранее, чем через 60—90 дней после выполнения РПЭ.

ПСА является органоспецифическим антигеном. Казалось бы резонно утверждать, что радикальное удаление ПЖ должно приводить к снижению его концентраций до нулевых значений.

Однако, более правильно ориентироваться в данной ситуации на уровень аналитической чувствительности конкретной тест-системы (например, для ее варианта, выпускаемого ООО «Алкор-Био», данный параметр не > 0,2 нг/мл).

Считается допустимой вариабельность получаемых результатов в пределах границ функциональной чувствительности, которая учитывает аналитический порог используемой тест-системы и коэффициент вариации (не > 20%).

Общепризнанным фактом является диагностическая ценность повышения ПСА_{общ.} в результате РПЭ как индикатора наличия продолжительного роста.

Согласно рекомендациям Европейской ассоциации урологов, наибольшая вероятность (около 80%) биохимического рецидива РПЖ после радикальной простатэктомии, отмечается когда время удвоения послеоперационного уровня ПСА_{общ.} (ВУП) 11 мес.

В процессе гормонотерапии контрольное обследование об-

щего ПСА проводят через 3 и 6 мес. от момента начала ее курса. Оптимально, чтобы уровень антигена характеризовали при этом показатели < 4 нг/мл.

На фоне лучевой терапии убыль концентрации ПСА_{общ.} не столь выражена, как при РПЭ. В качестве критерия ее эффективности принимают, как минимум, 50% снижение уровня ПСА, которое регистрируют через 1 мес. после прекращения лучевого воздействия.

В заключение отметим, что рассмотренная выше программа скрининга на РПЖ не свободна от определенных недостатков:

- отсутствие информации, которая в полном соответствии с критериями доказательной медицины подтверждает корреляцию выраженного эффекта снижения смертности от РПЖ и проведения требующихся исследований;
- наличие значительного процента ложноположительных результатов (элемент гипердиагностики РПЖ), что может обусловить выполнение «напрасных» биопсий простаты;
- риск развития осложнений, связанных с проведением ТРУЗИ, как процедуры, включающей инвазионный компонент;
- неоптимальная с позиций коэффициента «экономические затраты — эффективность» характеристика комплекса используемых тестов.

Таким образом, среди экспертов пока отсутствует единая оценка роли скрининга на РПЖ в успехах онкоурологии. Проблематичность ситуации делает актуальной интенсификацию методических и методологических изысканий в соответствующей области.

Лучше, разумеется, стародавний враг хорошего, однако на данный момент развития медицинской науки и практики, ПСА должен расцениваться как наиболее ценный биомаркер при гипертрофических процессах в РПЖ. Результаты его тестирования содержат, несомненно, значимый объем клинико-диагностической информации.

Молекулярная диагностика рака предстательной железы.

Опухоль — это патологический процесс, представленный новообразованной тканью, в которой изменения генетического аппарата клеток приводит к нарушению регуляции их роста и дифференцировки¹.

Прогресс, который наметился в области ранней (досимптомной) и при этом точной диагностики злокачественных новообразований, представляет собой одно из неоспоримых достижений современной онкологии.

Вместе с тем, предлагаемый набор методов биохимических, цитологических, эндоскопических исследований, в силу ряда свойственных им характеристик, оставляет желать лучшего.

С одной стороны, разрешающая способность большинства из указанных процедур позволяет обнаруживать новообразования величиной не менее 5—10 мм (лишь в порядке исключения 1—2 мм). Между тем, опухоли указанного размера образованы клонами клеток, уже прошедших ряд узловых этапов онкогенеза, что делает их носителями достаточно выраженного метастатического потенциала.

¹ М.А. Пальцев, Н.М. Аничков. Опухоли//Патологическая анатомия: Учебник. В2т. — Медицина, 2001. — Т.1. — с. 262.

С другой стороны, широкое внедрение методов инструментальной онкодиагностики ограничивает высокая стоимость используемого оборудования и расходных материалов. Нельзя также игнорировать отсутствие абсолютной безопасности для пациента ряда подобных исследований.

В этой связи сейчас определенно активизировались разработки принципиально иных подходов к ранней диагностике опухолей, в частности, к поиску их генетических онкомаркеров (ГОМ).

Методом молекулярной детекции является полимеразная цепная реакция (ПЦР), позволяющая обнаружить как мутированные фрагменты ДНК, так и аномально экспрессирующиеся РНК-транскрипты («обратная» ПЦР).

Молекулярно-генетические подходы в данном случае наиболее перспективны. В отличие от цитологического анализа и биохимической диагностики по белковым маркерам они характеризуются абсолютной чувствительностью и специфичностью.

Известно, что ген, кодирующий ПСА, локализован на длинном плече 19-й хромосомы, имея в своем составе 5 экзонов, 4 интрона и 2 запускающих участка, а также 3 нерасшифрованных конца. Продуцировать этот антиген способны лишь клетки, имеющие андрогенные рецепторы (АР).

Данный ген экспрессируется исключительно в ПЖ, поэтому его выявление в периферической крови, лимфатических узлах или костном мозге может свидетельствовать о диссеминировании РПЖ. Эффективность теста составляет 100%, а чувствительность — 1 клетка на 10 млн. лимфоцитов.

Ген p53 локализован в геноме человека на коротком плече хромосомы 17, в локусе 17p13.1. Кодирован ядерный фосфопр-

теид (белок *p53*), который состоит из 393 аминокислот и выполняет регуляторную роль в цикле клеточного деления.

Ген *p53* является классическим супрессором опухолевого роста (антионкогеном). В случае повреждения ДНК отмечается его активация, что приводит к остановке клеточного цикла и запуску процессов репарации поврежденных молекул. Продукт гена *p53* также отвечает за апоптотическое самоустранение клеток, получивших критические повреждения молекулы ДНК.

При нарушении функции гена *p53* (например, в результате точечной мутации, другого повреждения) контроль над клеточным циклом утрачивается: клетки-мутанты, несмотря на повреждение ДНК, продолжают активно пролиферировать, что приводит к развитию опухолей.

Мутация гена *p53*, сопровождающаяся продукцией белка с длительным периодом полураспада выявляется иммуногистохимически в 75% случаев РПЖ.

Протоонкоген Bcl-2 является антиапоптозным белком. Гиперэкспрессия данного гена, активированного при транслокации, предупреждает развитие апоптоза. Экспрессия Bcl-2 выявлена при раке различной локализации.

В случае РПЖ Bcl-2 участвует в формировании андрогенрезистентного фенотипа и опухолевой устойчивости к химиотерапевтическим препаратам. Согласно данным разных авторов, выявлена гиперэкспрессия Bcl-2 в 65% случаев гормонорезистентного РПЖ и у 25% больных РПЖ, не получавших гормонотерапию.

Сочетание усиленной экспрессии Bcl-2 с наличием мутаций гена *p53* приходится рассматривать как негативный прогностический фактор при РПЖ.

Теломераза человека hTERT (*Homo sapiens telomerase reverse transcriptase*) — фермент, состоящий из белковой части и РНК, который достраивает недореплицированные третичные концы тепломер ДНК короткими повторяющимися последовательностями.

Подобное восстановление тепломерных повторов ДНК в клетках с активной теломеразой приводит клетки к иммортализации за счет отмены ограничений на число делений.

Ген теломеразы *hTERT* активируется во многих типах злокачественно перерожденных клеток. Установлено, что его повышенный уровень в случае РПЖ достигает 208%.

Специфический ген рака простаты ДЛ3-рса3 является наиболее важным маркером злокачественного поражения ПЖ, не продуцируется в других органах и тканях. Его уровень значительно возрастает в 95% случаев локализованных и распространенных форм РПЖ. Активное применение данного теста потенциально приведет к снижению количества неоправданных биопсий ПЖ, в силу его высокой перспективности для диагностики РПЖ.

Инсулинозависимые факторы роста (IGF) включают два митогена: *IGF-1* и *IGF-2*, которые играют важную роль в клеточной пролиферации, дифференцировке и апоптозе. Считают, что использование соотношения IGF-1/ПСА с пороговым значением, равным 25, обладает 95% чувствительностью в отношении РПЖ и позволяет исключить 24% неоправданных биопсий.

Е-кадгерины. Эпителиальные клетки ПЖ находятся в адгезионном контакте друг с другом за счет взаимодействия кадгеринов - гликопротеинов соседних мембран (плазмолемм). Повреждение гена *CDH1*, кодирующего одно из этих соедине-

ний (Е-кадгерин), сопряженное с утратой межклеточных «мостиков», один из первых этапов развития опухоли. Исчезновение окраски на Е-кадгерин в гистологических препаратах РПЖ строго коррелирует с последующим развитием метастазов.

Простатспецифический мембранный антиген (ПСМА) — мембранный гликопротеин с молекулярной массой около 100кД. Построен из одной полипептидной цепи, включающей 750 аминокислотных остатков. Чаще определяется в мембране клеток, чем в их цитоплазме.

Доказано, что уровень ПСМА повышается как в случае локализованных, так и распространенных стадий заболевания. В метастатической ткани у пациентов с гормонорефрактерным РПЖ содержание ПСМА увеличивается. Имеются основания расценивать данный показатель как лучший маркер наличия метастазов первичной опухоли (метастатического прогрессирования) при РПЖ.

Исследования наиболее часто повреждаемых при РПЖ генов (разработка молекулярного портрета данной опухоли), с позиций их пригодности для диагностики и прогноза данного заболевания, продолжаются. Наиболее надежны в этом плане оказались гены тирозин-киназ, а также их рецепторы: рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), HER-2 и HER-3, ген глутатион-S-трансферазы (*GSTPI*).

Особые перспективы в плане совершенствования морфологической верификации опухолей ПЖ по результатам исследования материала пункционной биопсии, связывают с открытием нового иммуногистохимического маркера, обозначаемого аббревиатурой AMACR. Последний представляет собой пероксисомный и митохондриальный фермент.

Важна область практического применения AMACR заключается в обнаружении резистентных к лучевой терапии раковых клеток.

Среди задач серьезной диагностической сложности постоянно называют необходимость различения аденокарциномы ПЖ с простатической интрэпителиальной неоплазией (ПИН) высокой степени.

Считается, что эффективность ее решения может обеспечить применение иммуногистохимических методик (выявление цитокератинов высокой молекулярной массы, CD57, виментина и других пролиферативных маркеров — PCNA, Ki 67).

Если принимать во внимание только максимально перспективные исследования, уже сейчас не трудно выделить шесть научно-прикладных направлений молекулярной диагностики РПЖ:

- идентификация маркеров, которые характерны для пусковых стадий опухолевого роста;
- обнаружение генетических нарушений, сигнализирующих о реальности неблагоприятного прогноза развития заболевания и высокой инвазивности опухоли (выраженность ее метастатического потенциала, невосприимчивость к рационально назначаемой терапии, короткая продолжительность достигаемых периодов ремиссии, значительное ухудшение качества жизни пациента);
- диагностика наличия микрометастазов;
- тестирование наследственных форм опухоли;
- поиск маркеров (полиморфных форм ДНК), определяющих эффективность химиотерапии и назначения таргетных препаратов (таргетная терапия основана на коррекции мо-

лекулярных дефектов, которые возникают в геноме клетки при опухолевой трансформации);

- анализ ДНК-полиморфизмов, повышающих риск развития конкретного типа опухоли ПЖ в группах риска.

Необходимым итогом молекулярно-генетических исследований РПЖ должно стать создание комплексной диагностической системы, которая будет эффективно интегрировать новейшие достижения молекулярной генетики, фундаментальной и прикладной биохимии, а также клинической онкологии.

Список литературы

1. Карпищенко А.И., Антонов В.Г., Бутенко А.Б. Онкомаркеры и их диагностическое значение. — СПб, 1999. — 48 с.
2. Кикиева Т.В., Немцова М.В., Франк Г.А. и др. Системным ДНК-маркерам в диагностике рака предстательной железы./Системы генетических и эпигенетических маркеров в диагностике онкологических заболеваний/Под ред. М.А. Пальцева и Д.В. Залетаева. — М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2009. — с. 153 — 187.
3. Кишкун А.А. Иммунологические и серологические исследования в клинической практике. — М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2006. — 536 с.
4. Клиническая онкоурология/Под ред. Б.П. Матвеева/М.: Медицина, 2003. — с. 433 — 606.
5. Комлева Е.О., Волков В.В., Николаев Д.А. Количественное определение в крови простатического специфического антигена как скрининг-тест ранней диагностики рака предстательной железы//Актуальные вопросы клинической онкологии. — СПб.: Аграф+, 2006. — с. 181 — 185.
6. Лоран О.Б., Пушкарь Д.Ю., Франк Г.А. Простат-специфический антиген и морфологическая характеристика рака предстательной железы. — М.: МЕДпресс, 1999. — 144 с.
7. Матвеев Б.П., Бухаркин Б.В., Матвеев В.Б. Рак предстательной железы. — М., 1999. — 153 с.
8. Практическая онкоурология: избранные лекции. Под ре-

- дакцией *А.В. Воробьева, С.А. Тюляндина, В.М. Моисеенко*. Санкт-Петербург: Центр ТОММ, 2008. — 368 с.
9. *Пушкарь Д.Ю.* Радикальная простатэктомия. — М.: МЕДпресс-информ, 2004. — 168 с.
10. *Пушкарь Д.Ю., Раснер П.И.* Диагностика и лечение локализованного рака предстательной железы. — М.: МЕДпресс-информ, 2008. — 320 с.
11. Рак предстательной железы/Под ред. *Н.Е. Кушлинского, Ю.Н. Соловьева, М.Ф. Трапезниковой*. — М.: Издательство РАМН, 2002. — 432 с.
12. *Родоман В.Е., Авдошин В.П., Колесников Г.П.* Заболевания предстательной железы. Руководство для врачей. — М.: ООО «Медицинское информационное агенство», 2009. — 672 с.
13. *Русаков И.Г., Алексеев Б.Я., Воробьев Н.В.* Рак предстательной железы.//Онкология: национальное руководство/Под ред. *В.И. Чиссова, М.И. Давыдова*. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. — с. 788 — 798.
14. *Хансон К.П., Имянитов Е.Н.* Молекулярные механизмы возникновения рака предстательной железы//Лекции по фундаментальной и клинической онкологии/Под ред. *В.М. Моисеенко, А.Ф. Урманчеевой, К.П. Хансона*. — СПб.: ООО «Издательство Н-Л», 2004. — с. 76 — 85.

Приложение 1.

Требования, разработанные экспертами ВОЗ к скринингу для выявления злокачественных новообразований.

- существование надежного скрининг-теста, регистрирующего предклиническую фазу заболевания;
- достаточная продолжительность латентного развития заболевания;
- должна существовать возможность для морфологической верификации заболевания;
- методы обследования должны быть приемлемы для населения (доступны, чувствительны и специфичны, не давать осложнений);
- необходима общепринятая стратегия лечения выявленных больных;
- лечение диагностированного заболевания должно быть эффективным;
- затраты на скрининг больных, включая уточнение диагноза и лечение, должны быть экономически оправданы в отношении общих затрат национального здравоохранения.

«Утверждаю»
Руководитель Департамента
государственного контроля
лекарственных средств, изделий медицинского
назначения и медицинской техники МЗ РФ

В.Е. Акимочкин
«04» августа 2003 г.

Приложение 2.

Инструкция по применению набора реагентов для иммуноферментного определения общего про- статспецифического антигена на сыворотке крови (ОнкоИФА-общий ПСА).

Рекомендована Комиссией по наборам реагентов
для иммуноферментного (неинфекционные),
радиоиммунологического и других видов
иммунохимического анализа Комитета по
новой медицинской технике МЗ РФ
(протокол № 3 от 24 марта 2003 г.)

1. Назначение.

1.1. Набор реагентов ОнкоИФА-общий ПСА предназна-
чен для количественного определения содержания общего
простат-специфического антигена (ПСА) в сыворотке кро-
ви человека методом твердофазного иммуноферментного
анализа.

1.2. ПСА представляет собой гликопротеин с молекулярной
массой около 32 000 Да, состоящий из одной полипептид-
ной цепи. ПСА является сериновой протеазой, продуци-
руемой исключительно эпителием человеческой проста-

ты. В норме ПСА секретируется в семенную жидкость в
высоких концентрациях, где он является ферментативно
активным, и напрямую вовлечен в разжижение семенного
сгустка. В кровотоке ПСА присутствует в низких концент-
рациях. Увеличение концентрации ПСА в сыворотке крови
свидетельствует о патологиях простаты, таких как доброка-
чественная гиперплазия и злокачественное перерождение
ткани простаты. Определение ПСА широко используется
для обнаружения и мониторинга пациентов с раком про-
статы.

Показано, что ПСА образует стабильные комплексы с раз-
личными ингибиторами протеаз. Основная часть ПСА в сыво-
ротке крови человека присутствует в виде комплекса с α_1 -ан-
тихимо трипсином (ПСА-АХТ). Однако существует большая
разница в соотношении свободного ПСА и ПСА-АХТ комп-
лекса среди различных пациентов. Доля свободного ПСА выше
в случае доброкачественной гиперплазии в сравнении с раком
простаты.

1.3. Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах
40 неизвестных, 6 калибровочных проб, одной пробы кон-
трольной сыворотки и одной пробы для определения опти-
ческой плотности раствора ТМБ при использовании всех
стрипов одновременно (всего 96 определений).

Примечание: в случае дробного применения набор может
быть использован только в течение месяца после вскрытия ком-
понентов набора.

2. Принцип работы набора.

В наборе ОнкоИФА-общий ПСА использован «сэндвич»-
вариант твердофазного иммуноферментного анализа. Для реа-

лизации этого варианта использованы два моноклональных антитела с различной эпитопной специфичностью к ПСА. Одно из них иммобилизовано на твердой фазе (внутренняя поверхность лунок), второе конъюгировано с пероксидазой хрена. В лунках, при добавлении исследуемого образца и конъюгата анти-ПСА-пероксидаза, во время инкубации одновременно происходит иммобилизация ПСА, содержащегося в исследуемом образце, и связывание его с конъюгатом. При удалении содержимого из лунок и промывке происходит удаление избытка конъюгата анти-ПСА-пероксидаза, не связавшегося с иммобилизованным в ходе инкубации ПСА. Количество связавшегося конъюгата прямо пропорционально количеству ПСА в исследуемом образце.

Во время инкубации с раствором ТМБ происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски прямо пропорциональна количеству ПСА в исследуемом образце. После измерения оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочного графика рассчитывается концентрация ПСА в исследуемых образцах.

3. Состав работа.

3.1. Комплект из двенадцати восьмилуночных стрипов в рамке с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок антителами к ПСА, маркирован «Стрипы с иммобилизованными антителами к ПСА» — 1 пакет;

3.2. калибровочные пробы на основе сыворотки крови крупного рогатого скота, содержащие известные количества ПСА: 0; 1; 2,5; 5; 10; 30 нг/мл; концентрации ПСА в калибровочных пробах могут несколько отличаться от указанных величин, точные величины указаны на этикетках флаконов — 6 флаконов (лиофилизированные препараты или

жидкости по 0,5 мл);

3.3. конъюгат анти-ПСА-пероксидаза, маркирован «Конъюгат Е» — 1 флакон (14 мл);

3.4. буфер для разведения образцов сыворотки крови, маркирован «Буфер Д» — 1 флакон (3 мл);

3.5. концентрированный буферный раствор для промывки лунок, маркирован «Буфер Р» — 1 флакон (14 мл);

3.6. раствор тетраметилбензидина, маркирован «Раствор ТМБ» — 1 флакон (14 мл);

3.7. стоп-реагент (1 Н соляная кислота), маркирован «Стоп-реагент» — 1 флакон (14 мл);

3.8. контрольная сыворотка на основе сыворотки крови человека с известным содержанием ПСА, маркирована «Контрольная сыворотка» — 1 флакон (лиофилизированный препарат или жидкость 0,5 мл);

3.9. пакет полиэтиленовый закрывающийся (при упаковке стрипов в пакет из 2-слойного полиэтилена).

4. Аналитические характеристики набора.

4.1. Специфичность. Оба моноклональных антитела, использованные в наборе демонстрируют эквимоллярное взаимодействие, как со свободным ПСА так и с ПСА-АХТ комплексом.

4.2. Коэффициент вариации результатов определения ПСА в одном и том же образце сыворотки крови с использованием набора ОнкоИФА-общий ПСА не превышает 8%.

4.3. Линейность. Зависимость концентрации ПСА в образцах сыворотки крови при разведении их буфером Д имеет линейный характер в диапазоне концентраций 1–30 нг/мл и составляет $\pm 10\%$.

4.4. Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» ПСА — соответствие измеренной концентрации ПСА предписанной в пробе, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы 2,5 нг/мл. Процент открытия составляет 90—110.

4.5. Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая набором концентрация ПСА в сыворотке крови человека не превышает 0,2 нг/мл.

4.6. Хук-эффект высоких концентраций. В наборах реагентов, основанных на «сэндвич»-принципе анализа, при высоких концентрациях аналита зависимость величины оптической плотности от концентрации становится обратно пропорциональной (так называемый хук-эффект высоких концентраций). При использовании набора ОнкоИФА-общий ПСА хук-эффект не обнаружен вплоть до концентрации общего ПСА 1200 нг/мл.

4.7. Клиническая проверка. Диапазон значений концентраций ПСА до 4 нг/мл был определен как нормальный. Концентрация ПСА от 4 нг/мл до 10 нг/мл характерна для незлокачественных урологических заболеваний; выше — для злокачественных опухолей простаты.

4.8. Рекомендуется в каждой лаборатории при использовании набора уточнить значения концентраций ПСА, соответствующие нормальным.

5. Меры предосторожности.

5.1. Потенциальный риск применения набора — класс 2а.

5.2. Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

5.3. При работе с набором следует соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г).

5.4. Стоп-реагент представляет собой 1 Н раствор соляной кислоты. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания раствора стоп-реагента на кожу и слизистые необходимо промыть пораженный участок большим количеством проточной воды.

5.5. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, т.к. в состав набора входят производные крови человека, которые являются потенциально инфицированным материалом, способным длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусных инфекций.

5.6. Химическая посуда и оборудование, которые используются в работе с набором, должны быть соответствующим образом маркированы и храниться отдельно.

5.7. Запрещается прием пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами.

6. Оборудование и материалы, необходимые при работе с набором:

- спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках при длине волны 450 нм;
- прибор для встряхивания рамки со стрипами (термостати-

руемый шейкер), позволяющий производить встряхивание с амплитудой колебаний 3–4 мм и частотой 8–13 Гц (500–800 об/мин) при температуре +37°C;

- пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками с изменяемым объемом отбора жидкостей: на 5–50 мкл; 40–200 мкл; 200–1000 мкл; 1000–5000 мкл;
- пипетка полуавтоматическая восьмиканальная со сменными наконечниками, позволяющая отбирать объемы жидкостей до 300 мкл;
- цилиндр мерный, позволяющий отмерять 300 мл;
- стакан стеклянный вместимостью 500 мл;
- вода дистиллированная;
- бумага фильтровальная;
- перчатки резиновые или пластиковые.

7. Подготовка реагентов для анализа.

7.1. Калибровочные пробы и контрольная сыворотка.

- Жидкие калибровочные пробы и контрольная сыворотка готовы к использованию.
- Для восстановления лиофилизированных калибровочных проб и контрольной сыворотки перед вскрытием флаконов легким постукиванием стряхнуть частицы, прилипшие к стенкам флаконов или к крышкам. Открыть флаконы и положить крышки перевернутыми на сухую поверхность. В каждый флакон с калибровочной пробой и контрольной сывороткой внести по 0,5 мл дистиллированной воды и закрыть крышками. Выдержать флаконы в течение 10 минут при комнатной температуре (+18...25°C) без перемешивания. Затем, аккуратно наклоняя и вращая флаконы, перемешать их содержимое до полного растворения, избегая пенообразования.

зования. В течение следующих 10 минут выдержать флаконы при комнатной температуре, периодически перемешивая.

Хранить при температуре +2...8°C не более 1 месяца.

7.2. Буфер Д готов к использованию.

7.3. Предварительное разведение исследуемых образцов сывороток крови. Если значения ПСА в исследуемых образцах по предварительным данным выше 30 нг/мл, образцы следует последовательно развести буфером Д в 5 и 25 раз:

Образец №1 (разведение в 5 раз): 120 мкл буфера Д + 30 мкл исследуемого образца.

Образец №2 (разведение в 25 раз): 120 мкл буфера Д + 30 мкл *Образца №1*.

При каждом разведении необходимо тщательное перемешивание.

Разводить образцы сыворотки крови следует только в день проведения анализа.

Если при измерении концентрация образца №2 оказывается выше 30 нг/мл, то следует приготовить следующие образцы:

Образец №3 (разведение в 50 раз): 50 мкл буфера Д + 50 мкл *Образца №2*.

Образец №4 (разведение в 100 раз): 50 мкл буфера Д + 50 мкл *Образца №3*.

7.4. Стрипы. Перед вскрытием пакет со стрипами необходимо выдержать при комнатной температуре (+18...25°C) в течение времени не менее 30 минут. Вскрыть пакет и переставить на свободную рамку необходимое количество стрипов. Оставшиеся стрипы поместить в пакет с этикеткой (при упаковке стрипов в пакет из 2-слойного полиэтилена), который затем вложить в прозрачный пакет с замком и герметич-

но закрыть. Хранить в пакете с герметично закрытым замком при температуре +2...8°C в течение всего срока годности.

7.5. Конъюгат анти-ПСА-пероксидаза готов к использованию.

7.6. Промывочный буфер. Необходимое количество буфера Р развести дистиллированной водой в 20 раз.

Например:

5 мл буфера Р + 95 мл дистиллированной воды.

Тщательно перемешать, избегая пенообразования. Хранить закрытым при комнатной температуре не более 5 суток. Оставшийся неиспользованным буфер Р хранить закрытым при температуре +2...8°C в течение всего срока годности.

7.7. Раствор тетраметилбензидина (ТМБ) готов к использованию.

7.8. Стоп-реагент готов к использованию.

8. Проведение анализа.

8.1. Все реагенты перед проведением анализа должны быть тщательно перемешаны и доведены до комнатной температуры (+18...25°C). На странице 15 приведена схема проведения анализа.

8.2. Составить протокол маркировки лунок. Лунки промаркировать следующим образом:

- A1, A2 — №1 для измерения величины оптической плотности раствора ТМБ;
- B1, B2 — №2 для измерения величины оптической плотности калибровочной пробы 0 нг/мл;
- C1, C2 — №3 для измерения величины оптической плотности калибровочной пробы 1 нг/мл;
- D1, D2 — №4 для измерения величины оптической плотности калибровочной пробы 2,5 нг/мл;

E1, E2 — №5 для измерения величины оптической плотности калибровочной пробы 5 нг/мл;

F1, F2 — №6 для измерения величины оптической плотности калибровочной пробы 10 нг/мл;

G1, G2 — №7 для измерения величины оптической плотности калибровочной пробы 30 нг/мл;

H1, H2 — №8 для измерения величины оптической плотности контрольной сыворотки.

8.3. Во все лунки, кроме лунок A1 и A2, внести по 100 мкл конъюгата анти-ПСА-пероксидаза.

8.4. Внести в соответствующие лунки по 20 мкл калибровочных проб и контрольной сыворотки, в оставшиеся лунки по 20 мкл исследуемой сыворотки крови в дубликатах.

Примечание: Допускается промывка лунок при помощи автоматического промывочного устройства.

8.5. Немедленно внести во все лунки по 100 мкл раствора ТМБ. Инкубировать стрипы в темноте при комнатной температуре (+18...25°C) в течение 15–30 минут в зависимости от степени развития окраски.

8.6. Добавить во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор ТМБ, по 100 мкл стоп-реагента для остановки ферментной реакции, встряхивать на шейкере в течение 1–2 минут.

8.7. Измерить на фотометре вертикального сканирования оптическую плотность раствора в лунках при длине волны 450 нм.

Если программа фотометра позволяет вычитать величину оптической плотности в лунках A1 и A2 из значений оптических плотностей всех остальных лунок, то для дальнейших расчетов необходимо использовать величину В — среднее арифметическое

значение оптической плотности в лунках, содержащих калибровочные или исследуемые пробы.

Если программа фотометра не позволяет вычитать величину оптической плотности в лунках А1 и А2, то необходимо пользоваться формулой $B - BT$, где BT — среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках А1 и А2.

В линейных координатах построить калибровочный график зависимости B (ед. опт. плотн.) от концентрации ПСА в калибровочных пробах (нг/мл).

Определить содержание ПСА в пробах по калибровочному графику. В случае предварительного разведения образцов необходимо измеренную концентрацию ПСА умножить на фактор разведения.

8.8. Если по техническим причинам невозможно измерить оптическую плотность в лунках планшета непосредственно после выполнения п. 8.8, то следует иметь в виду, что окраска в лунках планшета стабильна в течение времени не более 20 минут при комнатной температуре (+18...25°C).

9. Условия хранения и эксплуатации набора.

9.1. Набор ОнкоИФА-общий ПСА должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре +2...8°C в течение всего срока годности. Допускается хранение набора при температуре до +25°C не более 5 суток.

Срок годности набора — 12 месяцев.

В случае дробного использования компоненты набора необходимо хранить следующим образом:

- стрипы поместить в пакет с этикеткой (при упаковке стрипов в пакет из 2-слойного полиэтилена), который затем вложить в прозрачный пластиковый пакет с замком и герметично закрыть.

Хранить в герметично закрытом пакете с замком при температуре +2...8°C в течение всего срока годности;

- восстановленные (растворенные) из лиофилизированных препаратов калибровочные пробы и контрольную сыворотку хранить при температуре +2...8°C не более 1 месяца;
- жидкие, готовые к использованию, калибровочные пробы и контрольную сыворотку после вскрытия флаконов хранить при температуре +2...8°C не более 1 месяца;
- конъюгат Е, буфер Д и раствор ТМБ после вскрытия флаконов хранить при температуре +2...8°C не более 1 месяца;
- буферный раствор для промывки лунок, подготовленный к использованию, хранить закрытым при комнатной температуре (+18...25°C) не более 5 суток;
- буфер Р и стоп-реагент хранить при температуре +2...8°C в течение всего срока годности.

9.2. Пробы сыворотки крови хранить при температуре +2...8°C не более 2 дней; при необходимости более длительного хранения (до 3 месяцев) — при температуре — 20°C и ниже. Избегать повторных циклов замораживания-размораживания.

9.3. Для проведения анализа не следует использовать плазму крови, гемолизированную, мутную сыворотку, а также сыворотку, содержащую азид натрия.

9.4. При использовании набора для проведения нескольких независимых серий анализов необходимо иметь в виду, что для каждого независимого эксперимента необходимо построение нового калибровочного графика и рекомендуется определение концентрации общего ПСА в контрольной сыворотке.

9.5. Запрещается использовать стоп-реагенты из наборов реагентов других фирм-производителей.

9.6. Не допускается смешивание или одновременное использование реагентов из разных партий, за исключением ТМБ, стоп-реагента и промывочного буфера.

9.7. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции.

Схема проведения анализа.

Стадия анализа и реагенты	Номер пары лунок в соответствии с маркировкой по п. 8.2								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9-48
Конъюгат анти-ПСА-перокси	-	100	100	100	100	100	100	100	100
КП 0 нг/мл, мклдаза, мкл	-	20	-	-	-	-	-	-	-
КП 1 нг/мл, мкл	-	-	20	-	-	-	-	-	-
КП 2,5 нг/мл, мкл	-	-	-	20	-	-	-	-	-
КП 5 нг/мл, мкл	-	-	-	-	20	-	-	-	-
КП 10 нг/мл, мкл	-	-	-	-	-	20	-	-	-
КП 30 нг/мл, мкл	-	-	-	-	-	-	20	-	-
КС, мкл	-	-	-	-	-	-	-	20	-
СХ, мкл	-	-	-	-	-	-	-	-	20
Инкубация №1	1 час, термостатируемый шейкер, +37°C								
5-кратная промывка: промывочный буфер, мкл	5х 300	5х 300	5х 300	5х 300	5х 300	5х 300	5х 300	5х 300	5х 300
Раствор ТМБ, мкл	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Инкубация №2	КТ, темное место, 15–30 минут								
Стоп-реагент, мкл	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Перемешивание	Шейкер, 1–2 минуты								
Измерение ОП растворов в лунках стрипов	Фотометр, 450 нм								
Расчет результатов	Калькулятор и масштабная бумага либо соответствующая компьютерная программа								

Примечания: КП — калибровочная проба; КС — контрольная сыворотка; СХ — анализируемые пробы; ОП — оптическая плотность; КТ — комнатная температура (+18...25°C).

«Утверждаю»
Руководитель Департамента
государственного контроля
лекарственных средств, изделий медицинского
назначения и медицинской техники МЗ РФ

В.Е. Акимочкин
«04» августа 2003 г.

Приложение 3.

Инструкция по применению набора реагентов для иммуноферментного определения свободного простат-специфического антигена в сыворотке крови (ОнкоИФА-общий ПСА).

Рекомендована Комиссией по наборам реагентов для иммуноферментного (неинфекционные), радиоиммунологического и других видов иммунохимического анализа Комитета по новой медицинской технике МЗ РФ (протокол № 3 от 24 марта 2003 г.)

1. Назначение.

1.1. Набор реагентов ОнкоИФА-свободный ПСА предназначен для количественного определения содержания свободной фракции простат-специфического антигена (свободного ПСА) в сыворотке крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. ПСА представляет собой гликопротеин с молекулярной массой около 32 000 Да, состоящий из одной полипептидной цепи. ПСА является сериновой протеазой, продуцируемой исключительно эпителием человеческой простаты.

ты. В норме ПСА секретируется в семенную жидкость в высоких концентрациях, где он является ферментативно активным и напрямую вовлечен в разжижение семенного сгустка. В кровотоке ПСА присутствует в низких концентрациях. Увеличение концентрации ПСА в сыворотке крови свидетельствует о патологиях простаты, таких как доброкачественная гиперплазия и злокачественное перерождение ткани простаты. Определение ПСА широко используется для обнаружения и мониторинга пациентов с раком простаты.

Показано, что ПСА образует стабильные комплексы с различными ингибиторами протеаз. Основная часть ПСА в сыворотке крови человека присутствует в виде комплекса с α_1 -антихимотрипсином (ПСА-АХТ). Однако существует большая разница в соотношении свободного ПСА и ПСА-АХТ комплекса среди различных пациентов. Доля свободного ПСА выше в случае доброкачественной гиперплазии в сравнении с раком простаты.

1.3. Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 40 неизвестных, 6 калибровочных проб, одной пробы контрольной сыворотки и одной пробы для определения оптической плотности раствора ТМБ при использовании всех стрипов одновременно (всего 96 определений).

Примечания: в случае дробного применения набор может быть использован только в течение месяца после вскрытия компонентов набора.

2. Принцип работы набора.

В наборе ОнкоИФА-свободный ПСА использован «сэндвич»-вариант твердофазного иммуноферментного анализа. Для

реализации этого варианта использованы два моноклональных антитела с различной эпитопной специфичностью к ПСА. Одно из них иммобилизовано на твердой фазе (внутренняя поверхность лунок), второе конъюгировано с пероксидазой хрена.

В лунках, при добавлении исследуемого образца и аналитического буфера, во время первой инкубации происходит связывание свободного ПСА с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок моноклональными антителами, специфичными к уникальному эпитопу на молекуле свободного ПСА. Во время второй инкубации конъюгат моноклональных антител к ПСА с пероксидазой связывается со свободным ПСА, иммобилизованным в ходе первой инкубации.

Во время инкубации с раствором ТМБ происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски прямо пропорциональна концентрации свободного ПСА в исследуемом образце. После измерения оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочного графика рассчитывается концентрация свободного ПСА в исследуемых образцах.

3. Состав набора:

- Комплект из двенадцати восьмилуночных стрипов в рамке с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок антителами к ПСА, маркирован «Стрипы с иммобилизованными антителами к свободному ПСА» — 1 пакет;
- калибровочные пробы на основе сыворотки крови крупного рогатого скота, содержащие известные количества свободного ПСА: 0; 0,2; 0,5; 2; 5; 10 нг/мл; концентрации свободного ПСА в калибровочных пробах могут несколько отличаться от указанных величин, точные величины указаны на этикетках флаконов — 6 флаконов (лиофилизирован-

ные препараты или жидкости по 0,5 мл);

- аналитический буфер, маркирован «Буфер А» — 1 флакон (14 мл);
- конъюгат анти-ПСА-пероксидаза, маркирован «Конъюгат Е» — 1 флакон (14 мл);
- концентрированный буферный раствор для промывки лунок, маркирован «Буфер Р» — 2 флакона (по 14 мл);
- раствор тетраметилбензидина, маркирован «Раствор ТМБ» — 1 флакон (14 мл);
- стоп-реагент (1 Н соляная кислота), маркирован «Стоп-реагент» — 1 флакон (14 мл);
- контрольная сыворотка на основе сыворотки крови человека с известным содержанием свободного ПСА, маркирована «Контрольная сыворотка» — 1 флакон (лиофилизированный препарат или жидкость 0,5 мл);
- пакет закрывающийся полиэтиленовый (при упаковке стрипов в пакет из 2-слойного полиэтилена).

4. Аналитические характеристики набора.

4.1. Специфичность. Не обнаружено перекрестной реакции моноклональных антител к свободному ПСА с ПСА-АХТ комплексом.

4.2. Коэффициент вариации результатов определения свободного ПСА в одном и том же образце сыворотки крови с использованием набора ОнкоИФА-свободный ПСА не превышает 8%.

4.3. Линейность. Зависимость концентрации свободного ПСА в образцах сыворотки крови при разведении их калибровочной пробой 0 нг/мл имеет линейный характер в диапазоне концентраций 0,2–10 нг/мл и составляет $\pm 10\%$.

4.4. Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» свободного ПСА — соответствие измеренной концентрации свободного ПСА предписанной в пробе, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы 0,5 нг/мл. Процент открытия составляет 90–110%.

4.5. Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая набором концентрация свободного ПСА в сыворотке крови человека не превышает 0,08 нг/мл.

4.6. Клиническая проверка. Отношение концентрации свободного ПСА к концентрации общего ПСА может быть использовано как критерий для дифференциальной диагностики рака простаты и доброкачественной гиперплазии предстательной железы (ДГПЖ) у пациентов с умеренно увеличенным (4–10 нг/мл) уровнем общего ПСА. Отношение концентрации свободного ПСА к концентрации общего ПСА выражается в процентах и имеет вид:

$$\frac{\text{Концентрация свободного ПСА}}{\text{Концентрация общего ПСА}} \times 100\%$$

Значение соотношения концентраций свободного и общего ПСА ниже определенного уровня (по данным литературы — 14–16%) с большой вероятностью свидетельствует о наличии рака предстательной железы, однако конкретный уровень этого порогового соотношения в различных лабораториях и клиниках подвержен некоторым колебаниям. Измерение концентрации одного только свободного ПСА в сыворотке (без измерения концентрации общего ПСА и расчета их соотношения) не имеет самостоятельного диагностического значения. Для получения корректных зна-

чений соотношения свободного и общего ПСА необходимо измерять их в один день, не допуская повторного замораживания-размораживания образца.

4.7. Рекомендуется в каждой лаборатории при использовании набора уточнить пороговое соотношение концентраций ПСА.

5. Меры предосторожности.

5.1. Потенциальный риск применения набора — класс 2а.

5.2. Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

5.3. При работе с набором следует соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

5.4. Стоп-реагент представляет собой 1 Н раствор соляной кислоты. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания раствора стоп-реагента на кожу и слизистые необходимо промыть пораженный участок большим количеством проточной воды.

5.5. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, т.к. в состав набора входят образцы и производные крови человека, которые являются потенциально инфицированным материалом, способным длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусных инфекций.

5.6. Химическая посуда и оборудование, которые исполь-

зуются в работе с набором, должны быть соответствующим образом маркированы и храниться отдельно.

5.7. Запрещается прием пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами.

6. Оборудование и материалы, необходимые при работе с набором:

- Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках при длине волны 450 нм;
- прибор для встряхивания рамки со стрипами (термостатируемый шейкер), позволяющий производить встряхивание с амплитудой колебаний 3–4 мм и частотой 8–13 Гц (500–800 об/мин) при температуре +37°C;
- пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками с изменяемым объемом отбора жидкостей: на 5–50 мкл, 40–200 мкл; 200–1000 мкл; 1000–5000 мкл;
- пипетка полуавтоматическая восьмиканальная со сменными наконечниками, позволяющая отбирать объемы жидкости до 300 мкл;
- цилиндр мерный, позволяющий отмерять 600 мл;
- стакан стеклянный вместимостью 800 мл;
- вода дистиллированная;
- бумага фильтровальная;
- перчатки резиновые или пластиковые.

7. Подготовка реагентов для анализа

7.1. Калибровочные пробы и контрольная сыворотка.

- Жидкие калибровочные пробы и контрольная сыворотка готовы к использованию.

- Для восстановления лиофилизированных калибровочных проб и контрольной сыворотки перед вскрытием флаконов легким постукиванием стряхнуть частицы, прилипшие к стенкам флаконов или к крышкам. Открыть флаконы и положить крышки перевернутыми на сухую поверхность. В каждый флакон с калибровочной пробой и контрольной сывороткой внести по 0,5 мл дистиллированной воды и закрыть крышками. Выдержать флаконы в течение 10 минут при комнатной температуре (+18...25°C) без перемешивания. Затем, аккуратно наклоняя и вращая флаконы, перемешать их содержимое до полного растворения, избегая пенообразования. В течение следующих 10 минут выдерживать флаконы при комнатной температуре (+18...25°C), периодически перемешивая.

Хранить при температуре +2...8°C не более 1 месяца.

7.2. Стрипы. Перед вскрытием пакет со стрипами необходимо выдерживать при комнатной температуре в течение времени не менее 30 минут. Вскрыть пакет и переставить на свободную рамку необходимое количество стрипов. Оставшиеся стрипы поместить в пакет с этикеткой (при упаковке стрипов в пакет из 2-слойного полиэтилена), который затем вложить в прозрачный пакет с замком и герметично закрыть. Хранить в пакете с герметично закрытым замком при температуре +2...8°C в течение всего срока годности.

7.3. Аналитический буфер готов к использованию.

7.4. Конъюгат Е готов к использованию.

7.5. Промывочный буфер. Необходимое количество буфера Р развести дистиллированной водой в 20 раз.

Например: 5 мл буфера Р + 95 мл дистиллированной воды.

Тщательно перемешать, избегая пенообразования. Хранить закрытым при комнатной температуре не более 5 суток. Оставшийся неиспользованным буфер Р хранить закрытым при температуре +2...8°C в течение всего срока годности.

7.6. Раствор тетраметилбензидина (ТМБ) готов к использованию.

7.7. Стоп-реагент готов к использованию.

8. Проведение анализа.

8.1. Все реагенты перед проведением анализа должны быть тщательно перемешаны и доведены до комнатной температуры (+18...25°C). На странице 76 приведена схема проведения анализа.

8.2. Составить протокол маркировки лунок. Лунки промаркировать следующим образом:

- | | | |
|--------|---|---|
| A1, A2 | — | №1 для измерения величины оптической плотности раствора ТМБ; |
| B1, B2 | — | №2 для измерения величины оптической плотности калибровочной пробы 0 нг/мл; |
| C1, C2 | — | №3 для измерения величины оптической плотности калибровочной пробы 0,2 нг/мл; |
| D1, D2 | — | №4 для измерения величины оптической плотности калибровочной пробы 0,5 нг/мл; |
| E1, E2 | — | №5 для измерения величины оптической плотности калибровочной пробы 2 нг/мл; |
| F1, F2 | — | №6 для измерения величины оптической плотности калибровочной пробы 5 нг/мл; |
| G1, G2 | — | №7 для измерения величины оптической плотности калибровочной пробы 10 нг/мл; |
| H1, H2 | — | №8 для измерения величины оптической плотности контрольной сыворотки. |

8.3. Во все лунки, кроме лунок А1 и А2, внести по 100 мкл буфера А.

8.4. Внести в соответствующие лунки по 50 мкл калибровочных проб и контрольной сыворотки, в оставшиеся лунки по 50 мкл исследуемой сыворотки крови в дубликатах.

Примечание: общее время внесения калибровочных проб, контрольной сыворотки и исследуемых сывороток крови не должно превышать 15 минут, иначе время инкубации разных образцов будет значительно различаться, что приведет к неправильным результатам.

8.5. Инкубировать стрипы в течение 1 часа при встряхивании в термостатируемом шейкере при температуре $+37^{\circ}\text{C}$ со скоростью 500–800 об/мин.

8.6. По окончании инкубации удалить содержимое лунок декантированием и промыть лунки пять раз. При каждой промывке во все лунки добавить по 300 мкл промывочного буфера, приготовленного по п. 7.5, встряхнуть рамку на шейкере в течение 5–10 секунд с последующим декантированием. После последнего декантирования тщательно удалить остатки жидкости из лунок постукиванием рамки со стрипами в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

Допускается промывка лунок при помощи автоматического промывочного устройства.

8.7. Во все лунки, кроме лунок А1 и А2, немедленно внести по 120 мкл раствора конъюгата анти-ПСА-пероксидаза.

8.8. Инкубировать стрипы согласно п. 8.5.

8.9. По окончании второй инкубации удалить содержимое

лунок декантированием и промыть лунки согласно п.8.6.

8.10. Немедленно внести во все лунки по 100 мкл раствора ТМБ. Инкубировать стрипы в темноте при комнатной температуре ($+18...25^{\circ}\text{C}$) в течение 15–30 минут в зависимости от степени развития окраски.

8.11. Добавить во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор ТМБ, по 100 мкл стоп-реагента для остановки ферментной реакции, встряхивать на шейкере в течение 1–2 минут.

8.12. Измерить на фотометре вертикального сканирования оптическую плотность раствора в лунках при длине волны 450 нм.

Если программа фотометра позволяет вычитать величину оптической плотности в лунках А1 и А2 из значений оптических плотностей всех остальных лунок, то для дальнейших расчетов необходимо использовать величину В — среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках, содержащих калибровочные или исследуемые пробы.

Если программа фотометра не позволяет вычитать величину оптической плотности в лунках А1 и А2, то необходимо пользоваться формулой $B - BT$, где BT — среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках А1 и А2.

В линейных координатах построить калибровочный график зависимости В (ед. опт. плотн.) от концентрации свободного ПСА в калибровочных пробах (нг/мл).

Определить содержание свободного ПСА в пробах по калибровочному графику.

8.13. Если по техническим причинам невозможно измерить оптическую плотность в лунках планшета непосредственно

после выполнения п. 8.11, то следует иметь в виду, что окраска в лунках планшета стабильна в течение времени не более 20 минут при комнатной температуре (+18...25°C).

9. Условия хранения и эксплуатации набора.

9.1. Набор ОнкоИФА-свободный ПСА должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре +2...8°C в течение всего срока годности. Допускается хранение набора при температуре до +25°C не более 5 суток. Срок годности набора — 12 месяцев.

В случае дробного использования компоненты набора необходимо хранить следующим образом:

- стрипы поместить в пакет с этикеткой (при упаковке стрипов в пакет из 2-слойного полиэтилена), который затем вложить в прозрачный пластиковый пакет с замком и герметично закрыть. Хранить в герметично закрытом пакете с замком при температуре +2...8°C в течение всего срока годности;
- восстановленные (растворенные) из лиофилизированных препаратов калибровочные пробы и контрольную сыворотку хранить при температуре +2...8°C не более 1 месяца;
- жидкие, готовые к использованию, калибровочные пробы и контрольную сыворотку после вскрытия флаконов хранить при температуре +2...8°C не более 1 месяца;
- конъюгат Е и раствор ТМБ после вскрытия флаконов хранить при температуре +2...8°C не более 1 месяца;
- буферный раствор для промывки лунок, подготовленный к использованию, хранить закрытым при комнатной температуре (+18...25°C) не более 5 суток;
- буфер А, буфер Р и стоп-реагент после вскрытия флаконов

хранить при температуре +2...8°C в течение всего срока годности.

9.2. Пробы сыворотки крови хранить при температуре +2...8°C не более 2 дней; при необходимости более длительного хранения (до 3 месяцев) — при температуре – 20°C и ниже. Избегать повторных циклов замораживания — размораживания.

9.3. Для проведения анализа не следует использовать плазму крови, гемолизированную и мутную сыворотку.

9.4. При использовании набора для проведения нескольких независимых серий анализов необходимо иметь в виду следующее:

- количество независимых экспериментов, которое можно провести с помощью данного набора (4 эксперимента), ограничено объемом калибровочных проб;
- для каждого независимого эксперимента необходимо построение нового калибровочного графика и рекомендуется определение концентрации свободного ПСА в контрольной сыворотке.

9.5. Запрещается использовать стоп-реагенты из наборов реагентов других фирм-производителей.

9.6. Не допускается смешивание или одновременное использование реагентов из разных партий, за исключением ТМБ, стоп-реагента и промывочного буфера.

9.7. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции.

Схема проведения анализа.

Стадия анализа и реагенты	Номер пары лунок в соответствии с маркировкой по п. 8.2								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9-48
Буфер А, мкл	-	100	100	100	100	100	100	100	100
КП 0 нг/мл, мкл	-	50	-	-	-	-	-	-	-
КП 0,2 нг/мл, мкл	-	-	50	-	-	-	-	-	-
КП 0,5 нг/мл, мкл	-	-	-	50	-	-	-	-	-
КП 2 нг/мл, мкл	-	-	-	-	50	-	-	-	-
КП 5 нг/мл, мкл	-	-	-	-	-	50	-	-	-
КП 10 нг/мл, мкл	-	-	-	-	-	-	50	-	-
КС, мкл	-	-	-	-	-	-	-	50	-
СХ, мкл	-	-	-	-	-	-	-	-	50
Инкубация №1	1 час, термостатируемый шейкер, +37°C								
5-кратная промывка: промывочный буфер, мкл	5х 300	5х 300	5х 300	5х 300	5х 300	5х 300	5х 300	5х 300	5х 300
Конъюгатант-ПСА-пероксидаза, мкл	-	120	120	120	120	120	120	120	120
Инкубация №2	1 час, термостатируемый шейкер, +37°C								
5-кратная промывка: промывочный буфер, мкл	5х 300	5х 300	5х 300	5х 300	5х 300	5х 300	5х 300	5х 300	5х 300
Раствор ТМБ, мкл	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Инкубация №3	КТ, темное место, 15–30 минут								
Стоп-реагент, мкл	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Перемешивание	Шейкер, 1–2 минуты								
Измерение ОП растворов в лунках стрипов	Фотометр, 450 нм								
Расчет результатов	Калькулятор и масштабная бумага либо соответствующая компьютерная программа								

Примечания: КП — калибровочная проба; КС — контрольная сыворотка; СХ — анализируемые пробы; ОП — оптическая плотность; КТ — комнатная температура (+18...25°C).

«Утверждаю»
Генеральный директор
ООО «Компания Алкор Био»

Швырев М.В.
«23» апреля 2009 г

Приложение 4.

Инструкция по применению набора контрольных материалов «ОНКОМАРКЕРЫ» для контроля качества количественных методов клинических лабораторных исследований (ПолиКМ-онко).

1. Назначение.

1.1. Набор аттестованных контрольных материалов ПолиКМ-онко предназначен для использования в качестве контрольных сывороток для контроля правильности и воспроизводимости результатов лабораторных исследований количественного определения опухолевых маркеров и других веществ, определяемых с помощью иммуноаналитических методов. Набор неаттестованных контрольных материалов ПолиКМ-онко предназначен только для контроля воспроизводимости результатов лабораторных исследований количественного определения опухолевых маркеров.

1.2. Набор предназначен для определения аналитов: Альфа-фетопrotein (АФП), Карциноэмбриональный антиген (РЭА), Пролактин, Простат-специфический антиген (Общий ПСА (оПСА) и Свободный ПСА (сПСА)), Раковые антигены (СА 125, СА 15-3, СА 19-9), Тиреоглобулин (ТГ), Ферритин,

Хорионический гонадотропин (ХГЧ).

2. Характеристики набора.

2.1. Принцип действия.

Набор контрольных образцов на основе сыворотки крови человека позволяет определять концентрации входящих в его состав очищенных препаратов гормонов, опухолевых маркеров и других веществ с помощью метода иммуноанализа для контроля правильности и воспроизводимости результатов лабораторных исследований количественного определения этих аналитов.

2.2. Состав набора.

В состав набора входят флаконы из темного стекла с лиофилизированными препаратами контрольных образцов, укупоренные резиновым стоппером и завальцованные цветным алюминиевым колпачком:

уровень 1 (норма) — алюминиевый колпачок красного цвета;

уровень 2 (повышенное содержание маркеров) — алюминиевый колпачок зеленого цвета;

уровень 3 (патологически высокое содержание маркеров) — алюминиевый колпачок синего цвета.

2.3. Варианты комплектации:

- комплект из трех уровней по 1 флакону каждого;
- комплект из трех флаконов одного уровня;
- каждый уровень поштучно.

3. Меры предосторожности.

3.1. Потенциальный риск применения набора — класс 2а.

3.2. Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

3.3. При работе с набором следует соблюдать «Правила ус-

ройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарноэпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

3.4. Компоненты на основе крови человека, входящие в состав набора, проверены на ВИЧ и гемоконтактные гепатиты. Однако ни один из существующих методов проверки не дает абсолютной гарантии отсутствия возбудителя, поэтому эти компоненты являются потенциально инфицированным материалом, способным длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусных инфекций. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки.

3.5. Химическая посуда и оборудование, которые используются в работе с набором, должны быть соответствующим образом маркированы и храниться отдельно.

3.6. Запрещается прием пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами.

4. Оборудование и материалы.

- Пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками с изменяемым объемом отбора жидкостей: на 200—1000 мкл; на 1000—5000 мкл;
- вода дистиллированная;
- перчатки резиновые или пластиковые.

5. Подготовка контрольных материалов для анализа.

5.1. Для восстановления лиофилизированных контрольных материалов перед вскрытием флаконов легким постукиванием

стряхнуть частицы, прилипшие к стенкам флаконов или к крышкам. Открыть флаконы и положить крышки перевернутыми на сухую поверхность.

5.2. В каждый флакон по стенке внести точно по 2,5 мл дистиллированной воды и закрыть крышками (точность дозирования добавляемой воды прямо влияет на точность получаемых результатов!). Выдержать флаконы в течение 10 минут при комнатной температуре (+18...25°C) без перемешивания.

5.3. Аккуратно наклоняя и вращая флаконы, перемешать их содержимое до полного растворения, избегая пенообразования. В течение следующих 20 минут выдержать флаконы при комнатной температуре, периодически перемешивая.

5.4. Убедиться, что на стенках и крышках не осталось нерастворенных частиц.

6. Проведение анализа.

Провести определения аналитов в соответствии с инструкцией производителя тест-системы.

7. Условия хранения и эксплуатации набора.

7.1. Набор контрольных материалов ПолиКМ-онко должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре +2...8°C в течение всего срока годности.

Срок годности набора – 2 года.

7.2. Восстановленные (растворенные) контрольные материалы хранить при температуре +2...8°C. Исследование СА 15-3, СА 19-9, сПСА, Ферритина, АФП и Пролактина должно быть проведено в течение одного дня; оПСА – в течение двух дней. Допускается исследование РЭА, СА 125, ТГ и ХГЧ в течение пяти последующих дней.

7.3. Для экономного использования контрольного материала и для исследований, которые не могут быть выполнены в указанные сроки, допускается после растворения разделить содержимое флаконов на аликвоты. Объемы аликвот поместить в пробирки или флаконы соответствующего объема и хранить герметично закрытыми при температуре – 20°C и ниже не более 1 месяца. Избегать повторных циклов замораживания-размораживания, так как повторение этой процедуры может привести к недопустимо большим изменениям в концентрации онкомаркеров. СА 15-3 и СА 19-9 не выдерживают замораживания, поэтому эти аналиты необходимо определять в день растворения.

7.4. При помутнении содержимого флаконов не следует использовать контрольные материалы для проведения анализа.

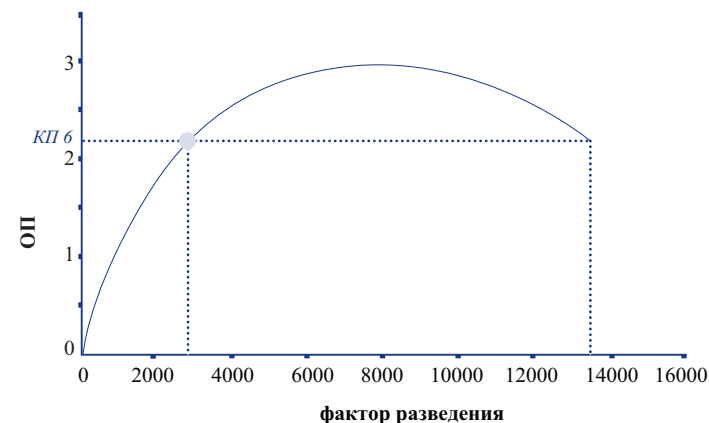
7.5. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции.

Приложение 5.

Рекомендации по выявлению хук-эффекта высоких концентраций при определении ПСА с помощью набора реагентов «ОнкоИФА-общий ПСА».

Хук-эффект высоких концентраций характерен для ИФА наборов-реагентов, основанных на «сэндвич» — принципе анализа. Проявляется он в изменении прямо пропорциональной зависимости величины оптической плотности (ОП) от концентрации на обратно пропорциональную.

На практике это выглядит следующим образом: ОП неразведенного образца меньше или равна ОП калибровочной пробы с максимальной концентрацией (в случае набора реагентов «ОнкоИФА-общий ПСА» - это КП №6). При разведении такого образца наблюдается рост ОП с увеличением фактора разведения. В случае общего ПСА хук-эффект объясняется следующим: концентрация аналита в таком образце значительно превосходит количество доступных антител (АТ). В результате этого происходит насыщение аналитом как АТ твердой фазы (планшет), так и АТ конъюгата. В итоге «сэндвич» не образуется. При дальнейшем разведении такой сыворотки ее ОП выходит на плато, а затем начинает снижаться и, наконец, снова становится меньше ОП КП №6 (см. график). Лишь начиная с этого фактора разведения (*) становится возможным установить истинную концентрацию аналита в образце.



Для того, чтобы не пропустить сыворотки, находящиеся в зоне хук-эффекта в лабораториях с большим потоком измеряемых сывороток в отсутствие каких-либо сведений о диагнозе пациентов рекомендуем применять следующий алгоритм:

Общий ПСА: Алгоритм поиска сывороток, находящихся в зоне хук-эффекта (из статьи Cole T, Johnson D, Eveland B, Nahm M *Cost-Effective Method for Detection of "Hook Effect" in Tumor Marker Immunometric Assays. Clinical Chemistry. 1993. 39 (4) 695-696*).

1. Разделить исследуемые сыворотки на группы по 10 образцов.
2. Для каждой группы из 10 образцов создать пул, содержащий по 10 мкл каждой из 10 сывороток, входящих в группу. Получится пул, в котором каждая индивидуальная сыворотка разведена в 10 раз.
3. Сделать 10-кратное разведение этого пула буфером для разведения общего ПСА. Для этого 10 мкл пула смешать с 90 мкл буфера.

4. Поставить все 10 индивидуальных сывороток, пул и его 10-ти кратное разведение в анализ в наборе «ОнкоИФА-общий ПСА» согласно инструкции.

5. Методика оценки: если в группе нет образцов в зоне хук-эффекта, то концентрации, определяемые в пуле и его разведении (умноженная на 10) будут близкими и разводить все сыворотки группы нет необходимости. Если в группе образцов есть сыворотка(-ки) в зоне хук-эффекта, то значение концентрации, определяемое в разведенном в 10 раз пуловом образце будет многократно большим, чем в самом пуловом образце. В этом случае следует развести каждую из 10 индивидуальных сывороток в 10, 100 и 1000 раз буфером для разведения общего ПСА и повторить анализ.

6. Те сыворотки, ОП которых при разведении в 10 или в 100 раз становится выше ОП КП №6 находятся в зоне хук-эффекта. Для определения их истинной концентрации, при условии, что высокая точность определения не требуется, может быть достаточно использовать концентрацию, определенную в образце разведенном в 1000 раз.

Схема разведения:

Разведение(1) в 10 раз: 10 мкл сыворотки + 90 мкл буфера

Разведение(2) в 100 раз: 10 мкл разведения (1)+ 90 мкл буфера

Разведение(3) в 1000 раз: 10 мкл разведения (2)+ 90 мкл буфера

В случае, если необходима высокая точность определения концентрации общего ПСА (например при мониторинге лечения онкобольных) или когда сведения о пациенте дают основания предполагать у него сверхвысокую концентрацию общего ПСА, рекомендуем пользоваться следующим алгоритмом:

1. Поставить неразведенные образцы в анализ в наборе «ОнкоИФА-общий ПСА» в дубликатах согласно инструкции. Сравнить ОП цельной сыворотки с ОП КП №6 и других КП, полученных в данном конкретном анализе:

- ОП цельной сыворотки > ОП КП №6, но не более чем в 2 раза перейти к п. 2;
- КП5 < ОП цельной сыворотки < ОП КП №6 перейти к п. 2;
- ОП цельной сыворотки < ОП КП №5 перейти к п. 3.

2. Развести сыворотку буфером для разведения общего ПСА последовательно в 50, 100, 200, 400, 800 и более раз. Разведения поставить в анализ в наборе «Онко-ИФА-общий ПСА» согласно инструкции перейти к п. 4.

3. Развести сыворотку буфером для разведения общего ПСА последовательно в 100, 200, 400, 800, 1600 и более раз. Разведения поставить в анализ в наборе «ОнкоИФА-общий ПСА» согласно инструкции перейти к п. 4.

4. Для расчета истинной концентрации выбрать такие разведения образца, ОП которых меньше ОП КП №6 в данном конкретном анализе. Запрещается использовать для сравнения ОП КП №6, полученную в другом анализе!

5. Рассчитать среднюю концентрацию общего ПСА в образце на основании не менее 3-х последовательных разведений образца, удовлетворяющих условию п. 4.

6. Если лаборатория проводит мониторинг лечения больного, то для последующих обследований используйте ту же схему разведений, что и при начале мониторинга.

Схема разведения:

Разведение(1) в 50 раз: 10 мкл сыворотки + 490 мкл буфера.

Разведение(2) в 100 раз: 100 мкл разведения (1)+ 100 мкл буфера.

Разведение(3) в 200 раз: 100 мкл разведения (2)+ 100 мкл буфера.

