

РОЗРОБКА ТА ВАЛІДАЦІЯ ВИСОКОІНФОРМАТИВНОГО ІМУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛІЗУ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ВІЛЬНОГО ПРОСТАТ-СПЕЦИФІЧНОГО АНТИГЕНУ

А.Г. Комар^{1,2}, О.І. Козерецька³, О.Б. Бесараб², О.Ю. Галкін^{2,4}

¹ДП “Український медичний центр сертифікації” МОЗ України, Київ, Україна

²КПІ ім. Ігоря Сікорського, Київ, Україна

³ТОВ “Хема”, Київ, Україна

⁴Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, Київ, Україна

*Corresponding author: alexfbt@gmail.com

Received 12 November 2019; Accepted 4 December 2019

Проблематика. Простат-специфічний антиген (PSA) є ключовим маркером, що використовується в моніторингу пацієнтів із гіперплазією передміхурової залози, ризиком розвитку та раком передміхурової залози. Клінічна лабораторна діагностика для такого роду пацієнтів реалізується із використанням відповідних серологічних тестів. Засоби імуноферментної діагностики являють собою біоаналітичні продукти, на які поширюються вимоги щодо медичних виробів для діагностики *in vitro*. Таким чином, актуальною задачею сучасної аналітичної біотехнології є покращення біоаналітичних і техніко-економічних показників діагностичних наборів, а також їх валідація як передумова допуску такого роду продукції на ринок.

Мета. Наукове обґрунтування складу і технології отримання високоінформативного імуноферментного аналізу (ІФА) для кількісного визначення вільного PSA у сироватці (крові) людини, а також його біоаналітична валідація на момент виготовлення та закінчення строку придатності.

Методика реалізації. Для конструювання ІФА використовували раніше отриманий та охарактеризований набір моноклональних антитіл (мАт) до різних епітопів PSA. Пероксидазні кон'югати мАт синтезували методом періодатного окиснення. У роботі використано 1-й міжнародний стандарт PSA Всесвітньої організації охорони здоров'я (WHO International Standard Prostate Specific Antigen) та сироватки крові людей із різним вмістом PSA. Валідацію розробленого ІФА проводили за загальноприйнятною схемою, що застосовується для кількісних біоаналітичних методик.

Результати. На першому етапі роботи було проведено визначення оптимальної конфігурації мАт для розробки неконкурентного “сендвіч”-варіанта ІФА. Досліджувані мАт були охарактеризовані за такими показниками: активність у ІФА (відносно PSA, його комплексу з α_1 -антихімотрипсином (α_1 -АСТ) та спорідненого білка калікреїну-2), ізотип, титр, константа афінності, порівняльна епітопна специфічність, ступінь інгібування ензиматичної активності PSA, джерело походження (Balb/c чи NZB миші). З урахуванням цих характеристик було сформовано принцип використання мАт для конструювання ІФА для визначення різних форм PSA (вільна молекула та зв'язана з α_1 -АСТ). Для різних діапазонів концентрацій PSA було оцінено доцільність сумісного використання різних мАт для визначення вільного PSA. На другому етапі роботи було проведено розробку протоколу постановки кількісного ІФА (визначення кількості компонентів реагентів, оптимальних часових і температурних показників для всіх етапів аналізу). На фінальному етапі дослідження проводили валідацію розробленого ІФА, визначаючи такі показники: діагностична специфічність, лінійність, межі виявлення та кількісного визначення (аналітична чутливість), прецизійність, правильність (точність).

Висновки. Антитіла епітопів P2 і P4 (і різних груп специфічності) являють собою найбільш оптимальну комбінацію для “сендвіч”-варіанта ІФА для визначення вільного PSA. Сорбційно-детекційна здатність різних пар мАт корелює з їх афінністю. Найкращими антитілами для використання для сорбції на твердій фазі були антитіла 26B9, 21B7 і 11G5 епітопу P2 (II група специфічності), а для детекції – 14C8 і 21D7 епітопу P4 (I група специфічності). Найбільш виражені сорбційно-детекційні властивості мала пара високоафінних мАт 26B9–14C8. Сумісне використання імуноферментних кон'югатів мАт 14C8 і 21D7 приводить до підвищення чутливості при дослідженні концентрацій PSA у діапазоні 1–10 нг/мл. Валідаційні характеристики визначали на момент випуску імуноферментного набору та на момент закінчення строку придатності (1 рік). Середнє значення діагностичної специфічності становить 100,6%. Методика є лінійною в діапазоні 0,1–30 нг/мл, невизначеність калібрувального графіка є незначущою. Розрахункова межа виявлення становить 0,001782 нг/мл, а межа кількісного визначення (аналітична чутливість) збігається з межею відтворюваності й становить 0,0054 нг/мл. Правильність (систематична похибка) становить 0,03 нг/мл і є статистично незначущою.

Ключові слова: вільний простат-специфічний антиген; імуноферментний аналіз; валідація.

Вступ

Простатичний специфічний антиген (prostate-specific antigen, PSA), відомий також як гамма-семинопротеїн (gamma-seminoprotein) чи калікреїн-3 (kallikrein 3, KLK3), є глікопротеїновим ферментом із молекулярною масою 34 кДа, містить 237 амінокислотних залишків, відноситься до серинових протеїназ (ЕС 3.4.21.77), кодується геном KLK3, що локалізований на 19-й хромосомі (19q13) у людини. PSA у спермі розщеплює семеногеліни, наявні в сім'яному коагуляті. Загальний рівень PSA збільшується в сироватці пацієнтів із простатитом, доброякісною гіперплазією та раком передміхурової залози (РПЗ). PSA являє собою біомаркер для оцінки ризику розвитку РПЗ. Інгібітори протеази в сироватці, такі як α_1 -антихімотрипсин (α_1 -АСТ), α_2 -макроглобулін (α_2 -М) та інші білки гострого стану, утворюють незворотні комплекси з циркулюючим PSA і гальмують його протеолітичну активність. У плазмі сперми й, відповідно, у сироватці (плазмі) крові PSA може перебувати у вільній інтактній (неактивній) протеолітичній формі або бути зв'язаним з інгібіторами серинової протеазної активності [1–4]. Більша частина PSA (близько 75 %), потрапляючи в периферійний кровотік, стає неактивною через утворення комплексу молекулярною масою 90 кДа з α_1 -АСТ. Не більше 1 % PSA утворює з α_2 -М комплекс молекулярною масою 800 кДа [4].

Визначення концентрації PSA у сироватці крові людини наразі є загальноприйнятим підходом до моніторингу стану пацієнтів із доброякісною гіперплазією та РПЗ. При цьому в сироватці крові визначають концентрацію вільного та загального PSA, а також розраховують співвідношення між цими формами PSA [4]. Для виявлення PSA запропоновано чимало аналітичних методів, зокрема такі: електрохімічний, хемілюмінесценція, електрохемілюмінесценція, флуоресценція, поверхневий плазмонний резонанс, імуноферментний та імунохроматографічний аналізи, мас-спектрометрія [4]. Найбільш зручним й одночасно інформативним методом для використання в клінічній лабораторній діагностиці, на нашу думку, є саме імуноферментний аналіз (ІФА). З одного боку, сучасні лабораторні служби країн із різним рівнем розвитку системи охорони здоров'я активно використовують ІФА для клінічного обстеження пацієнтів, а з іншого боку, серед усіх методів клінічної лабораторної діагностики ІФА харак-

теризується найкращими показниками інформативності (передусім – специфічністю, чутливістю). Розробка нових і вдосконалення існуючих серологічних методів визначення клінічно значущих аналітів є актуальним завданням аналітичної біотехнології. З огляду на регуляторні вимоги щодо медичних виробів для діагностики *in vitro*, які регламентують процедури допуску на ринок засобів для імуноферментної діагностики в Україні та країнах Європейського Союзу, проведення досліджень з біоаналітичної валідації є обов'язковим [6, 7].

Метою роботи була наукова розробка високоінформативного ІФА для кількісного визначення вільного PSA у сироватці (крові) людини, а також проведення його біоаналітичної валідації згідно з вимогами до медичних виробів для діагностики *in vitro*.

Матеріали і методи

Препарати PSA. Для проведення валідації використовували загальний PSA, виділений із сім'яної рідини людини методом імуноафінної хроматографії та стандартизований (відкалібрований) за допомогою 1-го міжнародного стандарту PSA Всесвітньої організації охорони здоров'я (WHO International Standard Prostate Specific Antigen (90:10), NIBSC code: 96/670), який містить зв'язану та вільну форми PSA у співвідношенні 9:1.

Процедура твердофазового ІФА (“антитільний сендвіч”). Сорбцію моноклональних антитіл (мАт) до PSA проводили у 0,05 М карбонат-бікарбонатному буфері (рН 9,6) протягом ночі за 4 °С у концентрації 2 мкг/мл (100 мкл/лунка). Для відмивання використовували фосфатно-сольовий буфер із додаванням 0,05 % твін-20, рН 7,2 (ФСБТ). Досліджувані зразки сироватки (плазми) крові та стандартні зразки PSA вносили у лунки ІФА-планшета в об'ємі 100 мкл. Планшет інкубували упродовж 1 год за температури 37 °С і потім двічі відмивали ФСБТ. Для визначення зв'язаного PSA в утвореному імунохімічному комплексі використовували кон'югат мАт до PSA з іншою епітопоною специфічністю з пероксидазою хрому (HRP), який інкубували упродовж 1 год за кімнатної температури. Планшет тричі відмивали ФСБТ і один раз дистильованою водою. При детекції результатів аналізу субстратом слугував 0,003 %-ний розчин перекису водню в 0,15 М цитратному буферному розчині, рН 5,0, а хромогеном був 3,3',5,5'-тетра-

метилбензидин (ТМБ). Реакцію зупиняли додаванням 50 мкл 2 М сірчаної кислоти, після чого вимірювали оптичну густину розчину в лунках планшету за довжини хвилі 450/620 нм.

Синтез пероксидазних кон'югатів мАт. Кон'югування моноклональних антитіл із HRP здійснювали у масовому співвідношенні мАт і ферменту 2:1 методом періодатного окиснення за Tijssen [7] із модифікаціями. Пероксидазу хрому ("Sigma", США) розчиняли в 0,1 М бікарбонатному буферному розчині (рН 8,3) до концентрації 15 мг/мл і додавали аналогічний об'єм 14 мМ розчину періодату натрію. Для окиснення HRP отриману суміш біомолекул інкубували упродовж 2 год за кімнатної температури. Одержаний таким чином розчин окисненої HRP змішували з розчином мАт, що було попередньо діалізовані проти 0,1 М карбонатного буферного розчину (рН 9,2). Одержану суміш переносили в хроматографічну колонку і додавали 1/3 частину сухого сефадексу G-25, інкубували упродовж 3 год за кімнатної температури. Розчин кон'югату елюювали з колонки і додавали 1/20 об'ємну частку водного розчину борогідрату натрію (5 мг/мл). Для зупинки реакції суміш залишали на 30 хв за кімнатної температури, додавали ще 3/20 частини розчину борогідрату натрію, інкубували упродовж 60 хв. Одержаний розчин пероксидазного кон'югату мАт переводили в 0,02 М фосфатний буферний розчин з 0,15 М NaCl, застосовуючи діаліз.

Математичні (статистичні) методи. Регресійний аналіз отримуваних експериментальних даних проводили згідно з відповідними рекомендаціями [8–10] та із застосуванням програмних комплексів MathCAD і Microsoft Excel. Загалом валідацію біоаналітичної методики проводили за схемою, що була описана раніше [11].

Діагностичну специфічність (ДС) розраховували за формулою

$$ДС = |C_{0+\text{добавка}} - C_0| / C_{\text{добавка}} \times 100\%, \quad (1)$$

де C_0 – концентрація шуканого аналіту в досліджуваному зразку; $C_{\text{добавка}}$ – відома концентрація аналіту в стандартному зразку; $C_{0+\text{добавка}}$ – концентрація шуканого аналіту в об'єднаній пробі досліджуваного та стандартного зразків.

Стандартне відхилення для нульової концентрації S_x розраховували за формулою

$$S_x = \frac{S_0}{b} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \left(\frac{S_b}{b}\right)^2 \times \left(\frac{Y_0 - Y_{\text{сер}}}{S_0}\right)^2}, \quad (2)$$

де m – кількість точок досліджуваного калібрувального графіка; n – кількість повторів визначення; b – коефіцієнт нахилу лінії регресії; S_0^2 – дисперсія різниці між дослідними та розрахованими за рівнянням лінійної регресії значеннями; S_b – дисперсія коефіцієнта b ; Y_0 – значення залежної змінної при $x=0$; $Y_{\text{сер}}$ – середнє арифметичне значення змінної y з урахуванням Y_0 .

Межу проміжної прецизійності R розраховували за формулою

$$R = t \sqrt{2 \times S_R^2}, \quad (3)$$

де S_R – стандартне відхилення в умовах відтворюваності, виражене через середньозважену дисперсію для кожного діапазону концентрацій ($S_R = \sqrt{S_{\text{сер}}^2}$); t – критичне значення критерію Стьюдента за довірчої вірогідності 0,95 і певної кількості ступенів свободи.

Систематичну похибку аналізу (зсув) θ визначали як різницю між середнім значенням результатів аналізу $X_{\text{сер}}$ і значенням стандартного зразка (СЗ) $X_{\text{ст}}$. Значимість отриманого значення θ перевіряли за розрахунковим критерієм Стьюдента:

$$t = \frac{|\theta|}{\sqrt{\frac{S^2}{L} + \frac{\Delta_{\text{ст}}^2}{3}}}, \quad (4)$$

де S – дисперсія середніх значень для різних визначень; L – кількість визначень; $\Delta_{\text{ст}}$ – похибка СЗ.

Результати

Визначення оптимальної конфігурації мАт для розробки неконкурентного "сендвіч"-варіанта твердофазового імуноферментного аналізу. На попередніх етапах роботи [12] нами було отримано набір високоактивних і специфічних мАт до PSA та встановлено їх імунохімічну характеристику. Характеристика найбільш перспективних для використання в імунобіотехнології мАт наведена в табл. 1. Антитіла групи специфічності I спрямовані до епітопів PSA, що екрануються при його зв'язуванні з α_1 -АСТ (ці мАт можуть бути використані для виявлення лише вільного PSA). Антитіла II групи специфічності, навпаки, спрямовані до епітопів PSA, що не екрануються при його зв'язуванні з α_1 -АСТ (ці антитіла здатні детектувати загальний PSA: як вільні молекули, так і зв'язані з α_1 -АСТ) (рис. 1).

Таблиця 1: Характеристика мАт до PSA [12]

мАт	Джерело (інbredна мишача лінія)	ОГ у непрямому ІФА при тестуванні на			Ізотип	Титр	Константа афінності, 10^9 M^{-1}	Епітоп	Група специфічності	Ступінь інгібування ензиматичної активності PSA
		PSA	PSA- α_1 -АСТ	hK2						
14C8	Valb/c	2,141	0,015	0,039	IgG _{2a}	1:800	16	P4	I	18,0
11G5	Valb/c	2,224	2,051	0,141	IgG _{2a}	1:800	16	P2	II	-0,2
21D7	NZB	2,574	0,054	0,042	IgG ₁	1:1600	20	P4	I	-3,4
23B4	NZB	2,479	2,051	0,045	IgG _{2b}	1:800	16	P3	II	92,4
21B7	NZB	2,158	2,054	0,066	IgG ₁	1:800	8	P2	II	98,7
21F4	NZB	2,469	2,603	0,057	IgG ₁	1:1600	16	P3	II	60,3
27C10	NZB	2,425	2,197	0,032	IgG _{2a}	1:1600	20	P3	II	26,2
26B9	NZB	1,984	1,935	0,074	IgG ₁	1:800	16	P2	II	3,6

Примітка. У таблиці наведено середні значення величин за результатами дослідження супернатантів гібридом у 4-х повторностях; $p < 0,05$.

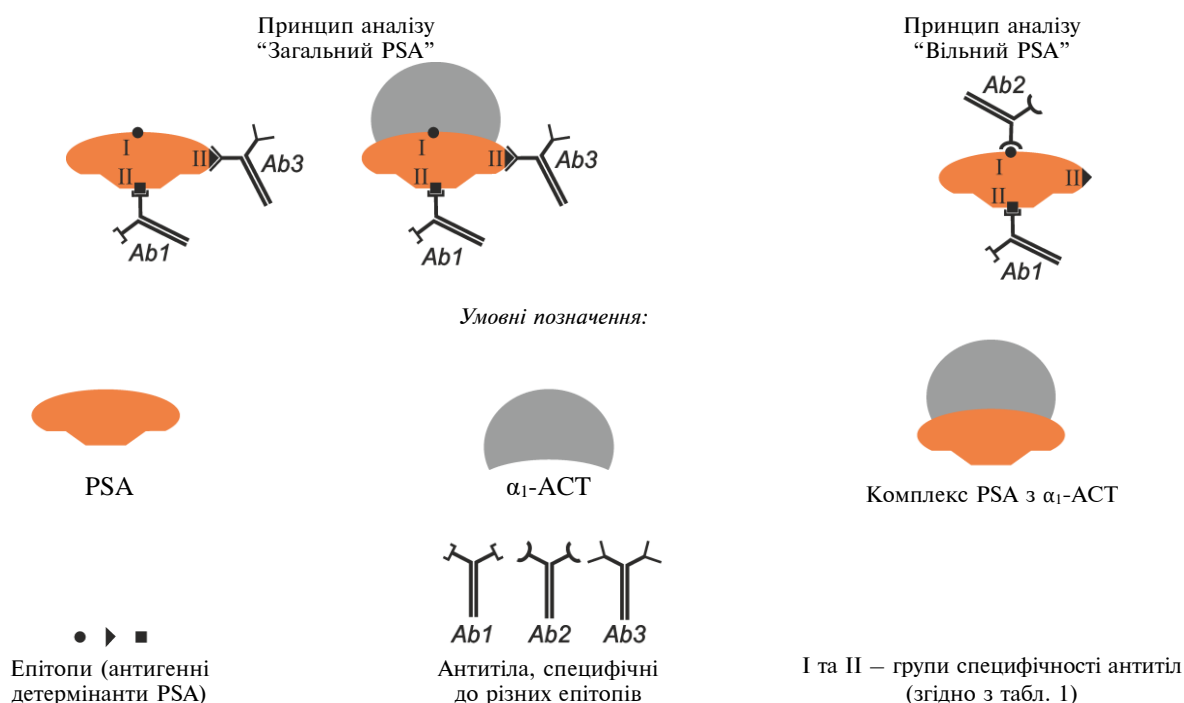


Рисунок 1: Принцип конструювання ТІФА для визначення різних форм PSA

На наступному етапі роботи проводили підбір пари мАт для "сендвіч"-ІФА для визначення загального PSA. За даними епітопного картування [12] мАт епітопів, P2–P4 і P2–P3 є найбільш віддаленими один від одного. Виходячи з характеристики мАт різних груп специфічності для розробки ІФА для визначення вільного PSA перспективними є мАт, що спрямовані до епітопів P2–P4, а саме: 11G5, 21B7, 26B9, з одного боку, та 14C8 і 21D7, з іншого. З метою попарної оцінки даних мАт нами були синтезовані пероксидазні кон'югати цих антитіл та досліджено ефективність визначення вільного PSA моноклональними антитілами, що розпізнають різні епітопи, у "сендвіч"-варіанті ТІФА.

Для встановлення оптимальної орієнтації мАт у тест-системі антитіла, що розпізнають різні епітопи молекули PSA, тестувалися як для "захоплення" у вигляді імуносорбенту, так і для детекції у вигляді пероксидазних кон'югатів (табл. 2). При використанні антитіл, що спрямовані до епітопу P2, у складі імуноферментного кон'югату, а мАт епітопу P4 – у складі імуносорбенту середній рівень сигналу у ІФА становив 0,745 о.о. При використанні кон'югату на основі мАт епітопу P4 й імуносорбенту на основі P2 середній рівень сигналу в ІФА становив 1,1192 о.о. Серед мАт епітопу P2 в імуносорбенті й мАт епітопу P4 у складі кон'югату кращий результат було отримано для пари мАт 26B9–14C8.

Отже, для конструювання неконкурентного “сендвіч”-варіанта ТІФА для визначення вільного PSA у складі імуносорбенту доцільно використовувати мАт епітопу Р2 (26В9, 21В7, 11G5), а для синтезу імуоферментного кон’югату слід використовувати мАт епітопу Р4 (14С8, 21D7).

Слід зазначити, що попередній досвід конструювання ТІФА різного призначення засвідчив можливість підвищення рівня сигналу аналізу (що не впливає на рівень фонового сигналу) при використанні суміші кон’югатів мАт аналогічної специфічності (антитіла близьких епітопів чи епітопних регіонів) [13, 14]. Виходячи з цього, нами було проведено дослідження щодо оцінки доцільності використання суміші кон’югатів мАт 14С8 і 21D7. Отримані дані (рис. 2) показали, що у випадку визначення вільного PSA використання суміші кон’югатів мАт, які відносяться до епітопу Р4, дало змогу підвищити рівень сигналу ТІФА: таке збільшення становило 8,1–15,8 % для різних концентрацій PSA (суміш кон’югатів порівняно з кон’югатом 14С8-HRP). З огляду на отриману характеристику

Таблиця 2: Ефективність визначення вільного PSA моноклональними антитілами різних епітопів у “сендвіч”-варіанті імуоферментного аналізу

Сорбція		Кон’югат					
		Епітопи і мАт					
		Р2			Р4		
Епітопи і мАт	Р2	21В7	11G5	26В9	21D7	14С8	
				–	–	–	0,855
		11G5	–	–	–	0,874	1,244
		26В9	–	–	–	1,388	1,577
	Р4	21D7	0,654	0,651	0,444	–	–
		14С8	0,877	0,857	0,988	–	–

Примітка. У таблиці наведено середні значення оптичної густини при постановці імуоферментного аналізу зі зразком PSA (10 нг/мл) у чотирьох повторностях; $p < 0,05$.

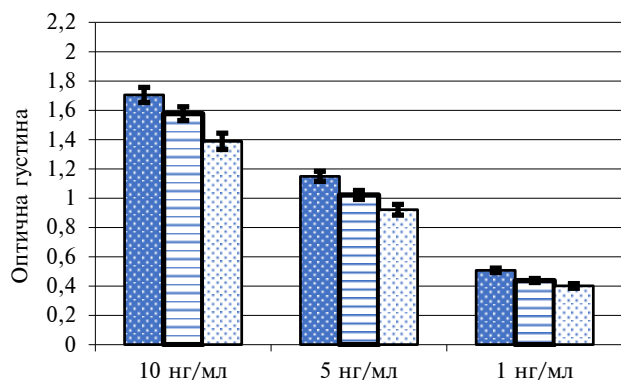


Рисунок 2: Результати твердофазового імуоферментного аналізу при визначенні різних концентрацій вільного PSA із використанням кон’югатів мАт 14С8 і 21D7: ■ – 14С8-HRP + 21D7-HRP; □ – 14С8-HRP; ▒ – 21D7-HRP

різних пар мАт найбільш перспективною для конструювання “сендвіч”-комбінації неконкурентного ІФА для визначення вільного PSA є мАт 26В9 (сорбція)–14С8/21D7 (детекція).

Розробка протоколу кількісного твердофазового імуоферментного аналізу та його валідація.

Після встановлення оптимальної конфігурації мАт у “сендвіч”-ІФА та оптимізації умов сорбції мАт проводилася оптимізація умов постановки аналізу: встановлення робочих концентрацій антитіл та імуоферментного кон’югату, часу кожного з етапів аналізу та умов його проведення (передусім – температурних), об’єму зразків, складу буферних розчинів. Фінальний протокол постановки аналізу, що наведений нижче, є результатом низки досліджень зі встановлення оптимальних характеристик, про які йшлося вище.

Протокол “сендвіч”-варіанта ТІФА для визначення вільного PSA. мАт, специфічні до PSA, сорбували протягом ночі в 0,02 М карбонат-бікарбонатному буферному розчині в концентрації 2 мкг/мл, використовуючи 96-лункові полістиролові планшети для ТІФА. Планшет інкубували за температури 4 °С, потім тричі відмивали фосфатно-сольовим буферним розчином (ФСБ) із додаванням 0,05 % твін-20 (ФСБТ), рН 7,2, і витримували у розчині БСА (10 мг/мл) 1 год за 37 °С. Лунки планшета чотири рази відмивали ФСБТ, після чого заповнювали 100 мкл реакційного буферного розчину (0,05 М трис-НСІ буфер, рН 8,0, 0,15 М NaCl, 5 мМ ЕДТА, 0,5 мг/мл БСА, 0,2 % Tween-20, 25 мкг/мл мишачих моноклональних антитіл, неспецифічних до PSA [16]), що містить 200 нг/мл кон’югованих із HRP моноклональних антитіл до PSA. На наступному етапі аналізу в лунки планшета вносили по 20 мкл стандартизованих зразків із відомою концентрацією PSA та досліджувані зразки сироватки, попередньо розведені реакційним буферним розчином у співвідношенні 1:1000. Після інкубації лунки планшета три рази відмивали (300 мкл ФСБТ), вносили розчин кон’югату моноклональних антитіл до PSA із HRP; реакційну суміш інкубували упродовж 30 хв за температури 37 °С. Після інкубації з імуоферментним кон’югатом лунки планшета чотирикратно промивали (300 мкл ФСБТ) і вносили субстратно-хромогенну суміш (3,3’,5,5’-тетраметилбензидин, 0,003 % H₂O₂, 0,15 М цитратний буферний розчин, рН 5,0). Ферментативну реакцію зупиняли розчином сірчаної кислоти. Оптичну густину розчину в лунках планшета вимірювали за довжини хвилі 450 нм.

Таблиця 4: Перехресна реактивність компонентів розробленого твердофазового імуоферментного аналізу для визначення вільного PSA

Білок (1 мкг/мл)	Виявлення PSA у зразках із різним вмістом, %	
	0 нг/мл PSA	5 нг/мл PSA
α_1 -АСТ	0	99,9
α_2 -М	0	99,8
hK2	0	100,8
Альбумін	0	100,1

Примітка. У таблиці наведено середні значення визначення концентрації PSA при постановці імуоферментного аналізу за наявності інших білків у шести повторностях; $p < 0,05$.

Визначення лінійності аналізу. Для оцінки лінійності було проведено регресійний аналіз залежності значення оптичної густини (ОГ) від концентрації PSA у діапазоні визначення 0,1–30 нг/мл: використовували калібратори, виготовлені за відповідним міжнародним стандартом: 0,1, 1, 2, 5, 10, 30 нг/мл, а також зразок сироватки із концентрацією PSA 1,1 нг/мл (див. табл. 3: серія № 0218, визначення № 1) із відповідними добавками (чотири зразки: 1,1, 1,2, 2,1, 3,1, 6,1, 11,1 та 31,1 нг/мл). Для обох рядів даних розраховували коефіцієнти кореляції та детермінації: ці коефіцієнти перевищують 0,98, що відповідає критеріям прийнятності. Для цих двох серій визначень (рядів даних) було проведено оцінку їх паралелізму (рис. 3). Отримані дані засвідчили, що коефіцієнти нахилу рівнянь лінійної регресії відрізняються на незначну величину (1,43%), що свідчить про паралельність ліній регресій, які описують залежність ОГ від концентрації PSA для стандартних зразків та досліджуваного матеріалу.

Оскільки розроблений імуоферментний аналіз забезпечує кількісне визначення вільного PSA та містить низку калібраторів із відомою концентрацією PSA, доцільно було дослідити невизначеність положення калібрувального графіка. Результати проведених розрахунків показали, що невизначеність калібрувального графіка, виражена за допомогою довірчої області лінії регресії за довірчої вірогідності 0,95, є незначною та може не враховуватися при проведенні розрахунків. Ці висновки відносяться до

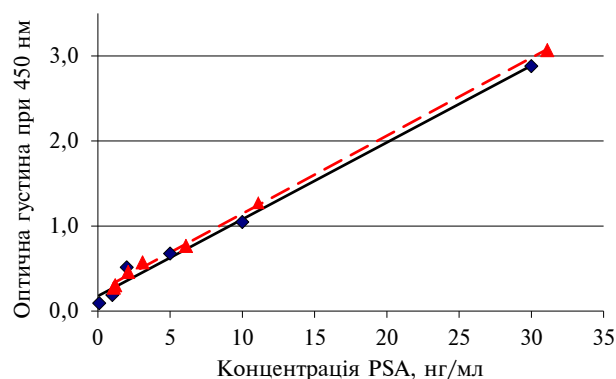


Рисунок 3: Оцінка лінійності твердофазового імуоферментного аналізу для визначення вільного PSA (лінійна регресія для калібраторів: $y = 0,09028941x + 0,17665075$; лінійна регресія для зразків: $y = 0,091598778x + 0,230318921$): \blacklozenge – оптична густина (ОГ) калібраторів; \blacksquare – лінійна регресія (ОГ від концентрації PSA у калібраторах); \blacktriangle – ОГ зразків; $---$ – лінійна регресія (ОГ від концентрації PSA у зразках)

визначень як на момент випуску, так і на момент закінчення строку придатності (1 рік зберігання за температури 4 °C). Отже, такі результати є підтвердженням задовільного рівня стабільності набору впродовж заявленого строку зберігання.

Визначення меж виявлення та кількісного визначення (аналітичної чутливості) аналізу. Розрахункове визначення цих показників проводили через попереднє визначення стандартного відхилення для нульової концентрації S_x за формулою (2). Межу виявлення розраховували як $S_x \times 3,3$, а аналітичну чутливість – як $S_x \times 10$, спираючись на відповідні рекомендації [11, 15]. Розрахунки цих параметрів проводили, використовуючи програмний комплекс MathCAD. Вихідними даними для відповідних розрахунків були калібрувальні графіки для дослідно-промислової серії набору 0318 (визначення № 1–6, табл. 3). Результати розрахунків подано в табл. 5: розрахункове значення межі виявлення становило 0,000792–0,001782 нг/мл, а межі кількісного визначення – 0,0024–0,0054 нг/мл. У такому випадку для діагностичного набору прийнято встановлювати найвище значення розрахункової аналітичної чутливості (тобто 0,0054 нг/мл).

Таблиця 5: Результати розрахунку меж виявлення та кількісного визначення твердофазового імуоферментного аналізу (визначення вільного PSA)

№ визначення	Стандартне відхилення для нульової концентрації (S_x)	Межа виявлення, нг/мл	Межа кількісного визначення (аналітична чутливість), нг/мл
1	0,00030	0,000990	0,0030
2	0,00054	0,001782	0,0054
3	0,00024	0,000792	0,0024
4	0,00035	0,001155	0,0035
5	0,00035	0,001155	0,0035
6	0,00044	0,001452	0,0044

Визначення прецизійності аналізу. Прецизійність може розглядатися на різних рівнях, зокрема на таких: збіжність (постановка аналізу за тих самих умов протягом невеликого проміжку часу), внутрішньолабораторна прецизійність (враховує внутрішньолабораторні варіації), відтворюваність (при міжлабораторному експерименті) [6]. Оскільки аналітична методика, що піддається валідації, призначена для кількісного визначення вільного PSA у широкому діапазоні значень, то, на нашу думку, більш доцільно для оцінки прецизійності методу використовувати проміжну прецизійність (різновид внутрішньолабораторної прецизійності), яка характеризує ступінь близькості результатів для низки визначень із залученням зразків із різним вмістом PSA.

Дослідження здійснювали із використанням трьох серій діагностичного набору в трьох діапазонах концентрацій PSA (0–2, 2–5, 5–10 нг/мл). Проводили трикратне визначення на момент ви-

пуску, а також на момент закінчення пропонованого строку придатності (1 рік). Оцінку проміжної прецизійності проводили за стандартним відхиленням S_R та межею проміжної прецизійності (відтворюваності) R , які були розраховані за формулою (3) для кожного досліджуваного діапазону концентрацій PSA (табл. 6, 7).

Отримані результати свідчать, що межа відтворюваності для різних концентрацій має один і той же порядок – знаходиться в діапазоні 0,19–0,29 нг/мл. Розраховані на попередньому етапі межі виявлення та кількісного визначення (аналітичної чутливості) свідчать про те, що всі значення нижче 0,001782 нг/мл статистично не відрізняються від нуля, а нижче 0,0054 нг/мл не можуть бути кількісно визначені. Таким чином, визначені валідаційні характеристики проміжної прецизійності та межі відтворюваності у всіх діапазонах концентрацій PSA можуть бути використані для характеристики розробленого аналізу.

Таблиця 6: Показники стандартного відхилення проміжної прецизійності та межі відтворюваності на момент випуску серій діагностичного набору для визначення вільного PSA (визначення № 1–3)

Діапазон концентрацій PSA, нг/мл	Серія набору	Вміст PSA, нг/мл			Дисперсія S^2	Середнє значення дисперсії $S_{сер}^2$	Стандартне відхилення S_R	Межа проміжної прецизійності R , нг/мл
		Визначення						
		№ 1	№ 2	№ 3				
0–2	0118	1,1	1,1	1,1	0,0000	0,0022	0,0471	0,19
	0218	1,1	1,2	1,2	0,0033			
	0318	1,2	1,1	1,2	0,0033			
2–5	0118	2,4	2,4	2,4	0,0000	0,0022	0,0471	0,19
	0218	2,5	2,5	2,4	0,0033			
	0318	2,4	2,5	2,5	0,0033			
5–10	0118	8,8	8,8	8,8	0,0000	0,0056	0,0745	0,29
	0218	8,9	8,8	8,9	0,0033			
	0318	8,9	8,9	8,7	0,0133			

Таблиця 7: Показники стандартного відхилення проміжної прецизійності та межі відтворюваності на момент випуску серій діагностичного набору для визначення вільного PSA (визначення № 4–6)

Діапазон концентрацій PSA, нг/мл	Серія набору	Вміст PSA, нг/мл			Дисперсія S^2	Середнє значення дисперсії $S_{сер}^2$	Стандартне відхилення S_R	Межа проміжної прецизійності R , нг/мл
		Визначення						
		№ 4	№ 5	№ 6				
0–2	0118	1,1	1,1	1,0	0,0033	0,0044	0,0667	0,26
	0218	1,1	1,2	1,0	0,0100			
	0318	1,2	1,2	1,2	0,0000			
2–5	0118	2,5	2,3	2,4	0,0100	0,0056	0,0745	0,29
	0218	2,4	2,3	2,3	0,0033			
	0318	2,4	2,4	2,3	0,0033			
5–10	0118	8,8	8,7	8,8	0,0033	0,0033	0,0577	0,23
	0218	8,8	8,8	8,9	0,0033			
	0318	8,7	8,8	8,7	0,0033			

Таблиця 8: Оцінка систематичної похибки (зсуву) імуноферментного аналізу для визначення загального PSA

№ визначення	Вміст, розрахований за калібрувальним графіком, нг/мл	Середнє значення вмісту для визначення, нг/мл	Середнє значення вмісту для всіх визначень $X_{\text{сер}}$, нг/мл	Дисперсія середніх значень вмісту S^2	Зсув θ , нг/мл	Похибка стандартного зразка $\Delta_{\text{ст}}$, нг/мл [16]	Критерій Стьюдента розрахунковий t
1	5,0; 5,0; 5,0; 5,1	5,03	5,05	0,0005	0,03	0,155	0,11
2	5,0; 5,1; 5,1; 5,1	5,08					
3	5,1; 5,0; 5,0; 5,1	5,05					
4	5,1; 5,0; 5,1; 5,1	5,08					
5	5,0; 5,0; 5,0; 5,1	5,03					
6	5,1; 5,1; 5,0; 5,0	5,05					

Визначення правильності (точності) аналізу. Правильність характеризує відхилення отриманого значення від номінального та обумовлена постійною та/або пропорційною систематичною похибкою [6]. Для досліджуваного виду аналізу, на нашу думку, найоптимальнішим методом визначення правильності є спосіб із використанням низки зразків для оцінювання (у вигляді стандартного зразка). Цей метод передбачає розрахунок систематичної похибки (зсуву) θ та перевірку останньої за критерієм Стьюдента за формулою (4). Результати проведених розрахунків щодо набору серії 0118, наведені в табл. 8, показують: розрахунковий критерій Стьюдента становить 0,11, що є нижчим за табличне значення цього критерію $t_{\text{табл}} = 2,57$ для ступенів свободи $f = n - 1 = 6 - 1 = 5$ та довірчої вірогідності 0,95. Таким чином, систематична похибка (зсув) є незначущою та може не враховуватися. Слід зазначити, що отримані дані стосуються набору як на момент його випуску, так і на момент закінчення строку придатності й свідчать про задовільний рівень стабільності розробленого ТІФА.

Обговорення

Розробку ТІФА починали з аналізу біохімічних характеристик панелі мАт [12]. З точки зору визначення оптимальної конфігурації пари мАт для “сендвіч”-варіанта ТІФА важливими були лише такі показники, як епітоп і група специфічності. Виходячи з візуалізації принципу конструювання цього різновиду аналізу (див. рис. 1), шукана пара мАт обов’язково має складатися з антитіл, що належать до різних груп специфічності. З огляду на цю передумову й було сформовано групу мАт для оцінки ефективності визначення вільного PSA за різних форм використання антитіл (сорбція чи імуно-

ферментний кон’югат): 21D7, 14C8 (група специфічності I, епітоп Р4) та 21B7, 11G5, 26B9 (група специфічності II, епітоп Р2).

Важливим елементом в оптимізації конфігурації ТІФА є оцінка доцільності використання суміші мАт. З огляду на наявні дані [11, 24] такого роду оптимізація може досягатися за рахунок використання суміші кон’югатів мАт близької епітопної специфічності. Виходячи із таких передумов, ми провели дослідження ТІФА із використанням суміші кон’югатів 14C8-HRP і 21D7-HRP (порівняно з відповідними монокон’югатами). Більш широкий експеримент із залученням більшої кількості кон’югатів не був можливим через відносно невелику панель мАт, яка використовувалася для розробки ТІФА. У будь-якому випадку було показано, що для детекції виявленого PSA доцільно використовувати суміш кон’югатів мАт 14C8 і 21D7 – такий прийом забезпечував підвищення рівня сигналу аналізу на 8,1–15,8 % (для різних концентрацій PSA).

При встановленні обов’язкових характеристик специфікації якості ТІФА керувалися як національними рекомендаціями щодо якості лікарських засобів (Державна фармакопея України [8]), так і рекомендаціями щодо якості та безпечності медичних виробів [17–20].

Оцінку діагностичної специфічності розробленого ІФА для кількісного визначення вільного PSA проводили доволі зручним і простим у реалізації методом добавок, який передбачає розрахунок відсотка визначення цільового аналіту в зразках, до яких додають заздалегідь відому кількість аналіту. У цьому випадку експеримент планувався нами в такий спосіб, щоб охопити весь динамічний діапазон доз, різні серії діагностичного набору, час визначення (на момент виготовлення дослідно-промислової серії та на момент закінчення строку придатності).

Отримані результати (середнє значення діагностичної чутливості 100,9 %) задовольняють загальноприйняті рекомендації (не менше 95 %) [21, 22]. Біокомпоненти розробленого ТІФА показали відсутність перехресної реактивності зі спорідненими білками та компонентами крові, що додатково свідчить про високий рівень специфічності розробленого аналізу. Оцінку таких показників, як лінійність, межі виявлення та кількісного визначення (аналітична чутливість), прецизійність аналізу, проводили, користуючись рекомендаціями та методами, що були описані в аналогічних працях [11, 21–23]. При цьому було доведено паралельність залежності ОГ у ТІФА від концентрації PSA як для стандартних зразків (калібраторів), так і для досліджуваних сироваток крові. Слід зазначити, що невизначеність калібрувального графіка була незначною, що свідчить про відсутність необхідності корекції відповідних розрахунків. За результатами оцінки прецизійності розробленого ТІФА було показано, що межа відтворюваності збігається з аналітичною чутливістю. Визначення правильності (точності) проводили одночасно двома способами: як із застосуванням стандартного зразка (що передбачало розрахунок систематичної похибки (зсуву) θ і перевірку останньої за критерієм Стюдента), так і з використанням регресійного аналізу експериментальних даних із визначення діагностичної специфічності аналізу. За двома методиками нами було одержано цілком прийнятні результати. Таким чином, проведені дослідження експериментально підтвердили відповідність розробленого ТІФА для кількісного визначення вільного PSA сучасним критеріям прийнятності.

Висновки

За результатами комплексної характеристики мАт до PSA було доведено, що антитіла епітопів P2 і P4 (і різних груп специфічності) являють собою найбільш оптимальну “сендвіч”-

комбінацію для конструювання неконкурентного ТІФА. Сорбційно-детекційна здатність різних пар мАт корелює з їх афінністю. Найкращими антитілами для захоплення (використання для сорбції на твердій фазі) були антитіла 26B9, 21B7 і 11G5 епітопу P2 (II група специфічності), а для детекції (використання у складі імуоферментного кон'югату) – мАт 14C8 і 21D7 епітопу P4 (I група специфічності). Найбільш виражені сорбційно-детекційні властивості мала пара високоафінних мАт 26B9–14C8. Сумісне використання імуоферментних кон'югатів мАт 14C8 і 21D7 веде до підвищення чутливості при дослідженні концентрацій PSA у діапазоні 1–10 нг/мл.

Проведено валідацію розробленого ТІФА для виявлення вільного PSA. Валідаційні характеристики визначали на момент випуску імуоферментного набору та на момент закінчення строку придатності (1 рік). Середнє значення діагностичної специфічності становить 100,6 %. Методика ІФА є лінійною в діапазоні 0,1–30 нг/мл, а невизначеність калібрувального графіка є незначущою. Розрахункова межа виявлення становить 0,001782 нг/мл, а межа кількісного визначення (аналітична чутливість) збігається з межею відтворюваності та становить 0,0054 нг/мл. Правильність (систематична похибка) становить 0,03 нг/мл і є статистично незначущою. Всі визначені характеристики ТІФА є задовільними відповідно до вимог міжнародних нормативних документів.

Фінансування

Робота виконана в рамках проекту “Розробка нових технологій створення біочутливих функціональних матеріалів для застосування у діагностичних системах медико-біологічного призначення” (№ ТД23-2/26) (цільова програма наукових досліджень НАН України “Напівпровідникові матеріали, технології і датчики для технічних систем діагностики, контролю та управління” на 2018–2020 рр.).

References

- [1] Fletcher RH. Guideline: Experts recommend against prostate cancer screening with prostate-specific antigen test. *Ann Intern Med.* 2019;170(2):JC2. DOI: 10.7326/acpjc-2019-170-2-002
- [2] Duskova K, Vesely S. Prostate specific antigen. Current clinical application and future prospects. *Biomedical Papers.* 2015;159(1):18-26. DOI: 10.5507/bp.2014.046
- [3] Haythorn MR, Ablin RJ. Prostate-specific antigen testing across the spectrum of prostate cancer. *Biomark Med.* 2011;5(4):515-26. DOI: 10.2217/bmm.11.53
- [4] Sydyakina YV, Sivakova AA, Komar AG, Galkin AY. Prostat-specific antigen: biochemical, molecular-biological, and analytical aspects. *Innov Biosyst Bioeng,* 2019;3(2):86-95. DOI: 10.20535/ibb.2019.3.2.164790

- [5] Galkin OY, Komar AG, Pys'menna MO. Specificity of manufacturing process validation for diagnostic serological devices. *Biotechnologia Acta*. 2018;11(1):25-38. DOI: 10.15407/biotech11.01.025
- [6] Galkin OY, Komar AG, Grigorenko AA. Bioanalytical standardizing for serological diagnostic medical devices. *Biotechnologia Acta*. 2015;8(2):112-9. DOI: 10.15407/biotech8.02.112
- [7] Practice and theory of enzyme immunoassays. In: Tijssen P, editor. *Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology*. 1st ed. Elsevier; 1985. 674 p.
- [8] Gryzodub OI, editor. *State pharmacopoeia of Ukraine*. 1st ed. Kharkiv: RIREG; 2008. 617 p.
- [9] Urbakh VY. *Mathematical statistics for biologists and physicians*. Moscow: AS USSR; 1963. 321 p.
- [10] Standards Russian Federation. *State system for ensuring uniformity of measurements. Indicators of accuracy, correctness, precision of methods of quantitative chemical analysis. Evaluation methods*. Moscow: Standardinform. RMG 61–2010.
- [11] Galkin OY, Besarab OB, Gorshunov YV, Dugan OM. Bioanalytical validation of immunoenzymatic test-kit for quantitative determination of total human immunoglobulin E. *Scientific Issue Ternopil Volodymyr Hnatiuk National Pedagogical University Series Biology*. 2014;4:7-18.
- [12] Galkin A, Komar A, Gorshunov Y, Besarab A, Soloviova V. New monoclonal antibodies to the prostate-specific antigen: obtaining and studying biological properties. *J Microbiol Biotechnol Food Sci*. 2019;9(3):573-7. DOI: 10.15414/jmbfs.2019/20.9.3.573-577
- [13] Galkin OY, Savchenko AA, Nikitina KI, Dugan OM. Obtaining and study of properties of new monoclonal antibodies against human IgE. *Ukr Biochem J*. 2013;85(5):81-7. DOI: 10.15407/ubj85.05.081
- [14] Galkin A, Besarab A, Gorshunov Y, Soloviova V, Dugan O. Mouse monoclonal antibodies to horseradish peroxidase isoenzyme C: obtaining and study of biological properties. *Izvestiya Vuzov Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya*. 2014;5:47-59.
- [15] International Conference on Harmonization (ICH) of technical requirements for the registration of pharmaceuticals for human use, validation of analytical procedures: methodology, ICH Q2B. Geneva; 1996. 11 p.
- [16] W.H.O. Expert Committee on Biological Standardization. *World Health Organization Technical Report Series*. 1981;658:21.
- [17] Technical regulation on medical devices for *in vitro* diagnostics, approved by the Resolution of the Cabinet of Ministers of Ukraine No. 754 of 21.10.2013. *Ukrainian Official Gazette*. 2013;82:3047.
- [18] Standards Ukraine. *Medical products. Quality management system. Regulatory requirements*. Kyiv: State Committee for Technical Regulation and Consumer Policy; 2007. ISO 13485:2005.
- [19] Directive 98/79/EC of the European Parliament and of the Council of 27 October 1998 on *in vitro* diagnostic medical devices. *Official Journal of the European Communities*. 1998;L 331(41):1.
- [20] Standards Russian Federation. *Clinical laboratory technologies. Quality requirements for clinical laboratory tests*. Moscow: Standardinform, 2009. R 53022.2-2008; Part 2. Assessment of the analytical reliability of research methods (accuracy, sensitivity, specificity).
- [21] Parreño V, Romera SA, Makek L, Rodriguez D, Malacari D, Maidana S, et al. Validation of an indirect ELISA to detect antibodies against BoHV-1 in bovine and guinea-pig serum samples using ISO/IEC 17025 standards. *J Virol Methods*, 2010;169(1):143-53. DOI: 10.1016/j.jviromet.2010.07.014
- [22] Schares G, Basso W, Majzoub M, Rostaher A, Scharr JC, Langenmayer MC, et al. Evaluation of a commercial ELISA for the specific detection of antibodies against *Besnoitia besnoiti*. *Vet Parasitol*. 2011;175(1-2):52-9. DOI: 10.1016/j.vetpar.2010.09.024
- [23] Volkova RA. *Medical immunobiological drugs quality control system using chemical and immunochemical methods [dissertation]*. Moscow: LA Tarasevich State Research Institute of Standardization and Control of Medical Biological; 2009. 276 p.
- [24] Galkin O, Myhalchuk M, Kazmirchuk V, Gurzhenko Y. Development and comparison of different versions of ELISA for detection of specific IgE-antibodies. *Bulletin of Taras Shevchenko National University of Kyiv Ser Biology*. 2014;1:15-21.

А.Г. Комар, О.И. Козерецкая, А.Б. Бесараб, А.Ю. Галкин

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ ВЫСОКОИНФОРМАТИВНОГО ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СВОБОДНОГО ПРОСТАТ-СПЕЦИФИЧЕСКОГО АНТИГЕНА

Проблематика. Простат-специфический антиген (PSA) является ключевым маркером, используемым в мониторинге пациентов с гиперплазией предстательной железы, риском развития и раком предстательной железы. Клиническая лабораторная диагностика для такого рода пациентов реализуется с использованием соответствующих серологических тестов. Средства иммуноферментной диагностики представляют собой биоаналитические продукты, на которые распространяются требования к медицинским изделиям для диагностики *in vitro*. Таким образом, актуальной задачей современной аналитической биотехнологии является улучшение биоаналитических и технико-экономических показателей диагностических наборов, а также их валидация как предпосылка допуска такого рода продукции на рынок.

Цель работы. Научное обоснование состава и технологии получения высокоинформативного иммуноферментного анализа (ИФА) для количественного определения свободного PSA в сыворотке (крови) человека, а также его биоаналитическая валидация на момент изготовления и конце срока годности.

Материалы и методы. Для конструирования ИФА использовали ранее полученный и охарактеризованный набор моноклональных антител (мАт) к различным эпитопам PSA. Peroxidазные конъюгаты мАт синтезировали методом периодатного окисления. В работе использованы 1-й международный стандарт PSA Всемирной организации здравоохранения (WHO International Standard Prostate Specific Antigen) и сыворотки крови людей с различным содержанием PSA. Валидацию разработанного ИФА проводили по общепринятой схеме, применяемой для количественных биоаналитических методик.

Результаты. На первом этапе работы было проведено определение оптимальной конфигурации мАт для разработки неконкурентного “сэндвич”-варианта ИФА. Исследуемые мАт были охарактеризованы по следующим показателям: активность в ИФА (по отношению к PSA, его комплексу с α_1 -антихимотрипсином (α_1 -АСТ) и к родственному белку калликреину-2), изотип, титр, константа аффинности, сравнительная эпитопная специфичность, степень ингибирования энзиматической активности PSA, источник происхождения (Balb/c или NZB мыши). Исходя из данных характеристик был сформирован принцип использования мАт для конструирования ИФА для определения различных форм PSA (свободная молекула и связанная с α_1 -АСТ). Для различных диапазонов концентраций PSA была оценена целесообразность совместного использования различных мАт для определения свободного PSA. На втором этапе работы была проведена разработка протокола постановки количественного ИФА (определение количества компонентов реагентов, оптимальных временных и температурных показателей для всех этапов анализа). На финальном этапе исследования проводили валидацию разработанного ИФА, определяя следующие показатели: диагностическую специфичность, линейность, пределы обнаружения и количественного определения (аналитическая чувствительность), прецизионность, правильность (точность).

Выводы. Антитела эпитопов P2 и P4 (и различных групп специфичности) представляют собой наиболее оптимальную комбинацию для “сэндвич”-варианта ИФА для определения свободного PSA. Сорбционно-детекционная способность различных пар мАт коррелирует с их аффинностью. Лучшими антителами для использования для сорбции на твердой фазе были антитела 26B9, 21B7 и 11G5 эпитопа P2 (II группа специфичности), а для детекций – 14C8 и 21D7 эпитопа P4 (I группа специфичности). Наиболее выраженные сорбционно-детектирующие свойства имела пара высокоаффинных мАт 26B9–14C8. Совместное использование иммуноферментных конъюгатов мАт 14C8 и 21D7 приводит к повышению чувствительности при исследовании концентрации PSA в диапазоне 1–10 нг/мл. Валидационные характеристики определяли на момент выпуска иммуноферментного набора и на момент окончания срока годности (1 год). Среднее значение диагностической специфичности составляет 100,6 %. Методика является линейной в диапазоне 0,1–30 нг/мл, неопределенность калибровочного графика является незначимой. Расчетный предел обнаружения составляет 0,001782 нг/мл, а предел количественного определения (аналитическая чувствительность) совпадает с пределом воспроизводимости и составляет 0,0054 нг/мл. Правильность (систематическая погрешность) составляет 0,03 нг/мл и является статистически незначимой.

Ключевые слова: свободный простат-специфический антиген; иммуноферментный анализ; валидация.

A.G. Komar, O.I. Kozerecka, O.B. Besarab, A.Yu. Galkin

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A HIGHLY INFORMATIVE IMMUNO-ENZYMATIC ANALYSIS FOR THE DETERMINATION OF FREE PROSTAT-SPECIFIC ANTIGEN

Background. Prostate-specific antigen (PSA) is a key marker used in the monitoring of patients with prostate hyperplasia, risk of development and cancer of prostate. Clinical laboratory diagnostics for such patients are implemented using appropriate serological tests. Enzyme immunoassay kits are bioanalytical products that are subject to the requirements for medical devices for *in vitro* diagnostics. Thus, the urgent task of modern analytical biotechnology is improving bioanalytical, technical, and economic indicators of diagnostic kits, as well as their validation, as a prerequisite for the admission of such products to the market.

Objective. Scientific substantiation of the composition and technology of highly informative enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) test-kit for the quantitative determination of free PSA in human serum (blood), as well as its bioanalytical validation at the time of manufacture and expiry date.

Methods. A previously prepared and characterized set of monoclonal antibodies (mAb) to different PSA epitopes was used to construct ELISA. Peroxidase conjugates of mAbs were synthesized by periodate oxidation. We used the WHO Prostate Specific Antigen International Standard and the human serum with different PSA amount. The validation of the developed ELISA was performed according to the conventional scheme used for quantitative bioanalytical methods.

Results. At the first stage of the work, the determination of the optimal mAbs configuration was carried out for the development of a non-competitive sandwich ELISA. The mAbs studied were characterized by the following indicators: activity in ELISA (relative to PSA, its complex with α_1 -antihymotrypsin (α_1 -ACT) and related protein kallikrein-2), isotype, titer, affinity constant, comparative epitope specificity, degree of PSA enzymatic activity inhibition, source of origin (Balb/c or NZB mouse). Based on these characteristics, the principle of using mAbs to construct ELISA for the determination of various forms of PSA (free molecule and one associated with α_1 -ACT) was formed. For different ranges of PSA concentrations, it was assessed the feasibility of sharing different mAbs to determine free PSA. At the second stage of the work, a protocol for the quantitative ELISA was formulated (determination of the number of reagent components, optimal time, and temperature indicators for all stages of the analysis). At the final stage of the study, we carried out validation of the developed ELISA, determining the following indicators: diagnostic specificity, linearity, limit of detection and quantification (analytical sensitivity), precision, correctness (accuracy).

Conclusions. The antibodies of the epitopes P2 and P4 (and different specificity groups) are the most optimal combination for the sandwich ELISA to determine free PSA. The sorption-detection ability of different mAb pairs correlates with their affinity. Antibodies 26B9, 21B7, and 11G5 of the P2 epitope (group II specificity) were the best antibodies for use in solid phase sorption, and antibodies 14C8 and 21D7 of the epitope P4 (group I specificity) were the best ones for detections. The pair of high-affinity mAbs 26B9 and 14C8 possessed the most pronounced sorption-detection properties. The combined use of the mAbs 14C8 and 21D7 enzyme conjugates leads to increased sensitivity in the study of PSA concentrations in the range of 1–10 ng/ml. Validation characteristics were determined at the time of kit release and at the end of the shelf life (1 year). The average value of diagnostic specificity is 100.6%. The technique is linear in the range of 0.1–30 ng/ml, the uncertainty of the calibration graph is insignificant. The estimated detection limit is 0.001782 ng/ml, and the limit of quantification (analytical sensitivity) coincides with the reproducibility limit and is 0.0054 ng/ml. The correctness (systematic error) is 0.03 ng/ml and is statistically insignificant.

Keywords: free prostate-specific antigen; enzyme immunoassay; validation.