

ІНСТРУКЦІЯ З ВИКОРИСТАННЯ

Набір реагентів для кількісного імуноферментного визначення антигену СА 125

(СА 125–БЕСТ)

1. ПРИЗНАЧЕННЯ

Набір реагентів «СА 125–БЕСТ» призначений для кількісного *in vitro* визначення концентрації антигену СА 125 у сироватці крові людини методом твердофазного імуноферментного аналізу. Набір «СА 125–БЕСТ» рекомендований для проведення аналізу в дублікатах 40 невідомих, 6 калібрувальних проб, однієї проби контрольної сироватки й однієї проби для визначення оптичної густини розчину тетраметилбензидину (ТМБ) при використанні всіх стрипів одночасно. У випадку дробового застосування необхідна обов'язкова постановка всіх каліброваних проб для кожного окремого аналізу.

2. СКЛАД НАБОРУ

- **планшет** полістирольний - 1 шт.;
- **кон'югат** анти - СА 125 з пероксидазою хрому – 1 фл.;

Калібрувальні проби (КП)

- **КП 1** (калібрувальна проба №1) – 1 флакон, 0,5 мл, містить 0 Од/мл СА 125;
- **КП 2** (калібрувальна проба №2) – 1 флакон, 0,5 мл, містить 23,5 Од /мл СА 125;
- **КП 3** (калібрувальна проба №3) – 1 флакон, 0,5 мл, містить 94 Од мл СА 125;
- **КП 4** (калібрувальна проба №4) – 1 флакон, 0,5 мл, містить 235 Од /мл СА 125;
- **КП 5** (калібрувальна проба №5) – 1 флакон, 0,5 мл, містить 470 Од /мл СА 125;
- **КП 6** (калібрувальна проба №6) – 1 флакон, 0,5 мл, містить 940 Од /мл СА 125

Увага! точні номінали калібрувальних проб зазначені на етикетках флаконів і в паспорті до набору реагентів.

- **КС** (контрольна сироватка) містить відому кількість СА 125, діапазон концентрацій зазначений на етикетці флакону – 1 флакон, 1,0 мл;
- **Промиваючий розчин** – 1 фл.;
- **РРС** (Розчин для розведення) – 1 фл.;
- **СР** (стоп-реагент) – 1 фл.;
- **ТМБ** (розчин тетраметилбензидину) – 1 фл.,

3. АНАЛІТИЧНІ Й ДІАГНОСТИЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРУ.

3.1. Чутливість. Мінімальна не перевищує 1,6 Од/мл.

3.2. Специфічність. Не виявлено перехресної реакції обох моноклональних антитіл (іммобілізованого й кон'югованого з пероксидазою) з антигенами: РЕА, СА 19-9, СА 15-3, СА 72-4.

3.3. Діапазон очікуваних значень. В нормі до 35 Од/мл, на 50% підвищена у жінок з первинним раком яєчників, у 80% з метастатичним раком яєчників.

4. ЗАПОБІЖНІ ЗАХОДИ.

При роботі з досліджувальними сироватками і контрольними зразками слід дотримуватись заходів безпеки, прийнятні при роботі з потенційно інфекційним матеріалом: працювати в гумових рукавичках; не піпетувати розчини ротом; всі використані матеріали дезінфікувати відповідно до вимог чинного законодавства.

5. ОБЛАДНАННЯ Й МАТЕРІАЛИ, НЕОБХІДНІ ПРИ РОБОТІ З НАБОРОМ:

Фотометр вертикального сканування, шейкер – інкубатор, вошер, центрифуга лабораторна на 2,5- 3,0 тис. об / хв., холодильник побутовий, піпетки напівавтоматичні одно каналні і багатоканальні рукавички гумові хірургічні, колба мірна, папір фільтрувальний, вода дистильована.

6. АНАЛІЗОВАНІ ЗРАЗКИ.

Узяття крові для аналізу слід проводити з використанням стандартних процедур для венозної крові, а зразки сироватки повинні бути звільнені від клітин крові центрифугуванням. Після центрифугування сироватка крові повинна бути перенесена в окрему пробірку. Слід уникати використання в аналізі плазми крові, гемолізованої, мутної або гіперліпемічної сироватки. Не допускається використання як консервант азиду натрію.

7. ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗУ.

7.1 . Підготовка реагентів

7.1.1 . Стрипи . Перед розкриттям пакет зі стрипами необхідно витримати при кімнатній температурі (+18 ... 25°C) не менше 30 хвилин. Розкрити пакет і переставити на вільну рамку необхідну кількість стрипів .

7.1.2 . Рідкі калібрувальні проби і контрольна сироватка готові до використання.

Для відновлення ліофілізованих калібрувальних проб та контрольної сироватки перед розкриттям флаконів легким постукуванням струсити частинки, які прилипли до стінок флаконів або до кришок. Відкрити флакони і покласти кришки перевернутими на суху поверхню. У кожний флакон з калібрувальної проб і контрольної сироваткою внести по 0,5 мл дистильованої води і закрити кришками. Витримати флакони протягом 10 хвилин при кімнатній температурі без перемішування. Потім, акуратно нахилиючи і обертаючи флакони, перемішати їх вміст до повного розчинення, уникаючи піноутворення. Протягом наступних 10 хвилин витримати флакони при кімнатній температурі, періодично перемішуючи.

7.1.3. Кон'югат готовий до використання. Витрата кон'югату на один стрип становить 1,5 мл.

7.1.4. РРС готовий до використання.

7.1.5. Розчин для промивання. Необхідна кількість промивочного розчину розвести дистильованою водою в 20 разів.
Наприклад: 5 мл промивочного розчину + 95 мл дистильованої води.

Ретельно перемішати, уникаючи піноутворення.

7.1.6. Розчин тетраметілбензідина (ТМБ) готовий до використання. Витрата ТМБ на один стрип становить 1,15 мл

7.1.7. Стоп-реагент готовий до використання. Витрата стоп-реагенту на один стрип становить 1,15 мл.

7.1.8. Всі реагенти перед проведенням аналізу повинні бути ретельно перемішані і доведені до кімнатної температури (+18 ... 25 °С).

7.1.9. Розведення досліджуваних зразків сироваток крові. Якщо за попередніми даними або за результатами аналізу (див. п. 9.3.) Значення концентрації СА 125 в досліджуваних зразках вище КП № 6, зразки слід послідовно розвести РРС в 20 і 400 разів:

Зразок № 1 (розведення в 20 разів):

190 мкл РРС + 10 мкл досліджуваного зразка.

Зразок № 2 (розведення в 400 разів):

190 мкл РРС + 10 мкл Зразка № 1.

При кожному розведенні необхідно ретельне перемішування. Розводити зразки сироватки крові тільки в день проведення аналізу. Якщо після вимірювання оптична густина Зразка №2 залишається вище ОГ КП №6, то необхідно продовжити розведення та приготувати наступні зразки:

Зразок № 3 (розведення в 800 разів):

190 мкл РРС + 10 мкл Зразка № 2.

7.2 Постановка аналізу

7.2.1. Скласти протокол маркування лунок. Лунки промаркувати наступним чином:

A1, A2 - № 1 - для вимірювання величини оптичної густини розчину ТМБ;

B1, B2 - № 2 - для вимірювання величини оптичної густини КП № 1;

C1, C2 - № 3 - для вимірювання величини оптичної густини КП № 2;

D1, D2 - № 4 - для вимірювання величини оптичної густини КП № 3;

E1, E2 - № 5 - для вимірювання величини оптичної густини КП № 4;

F1, F2 - № 6 - для вимірювання величини оптичної густини КП № 5;

G1, G2 - № 7 - для вимірювання величини оптичної густини КП № 6;

H1, H2 - № 8 - для вимірювання величини оптичної густини контрольної сироватки.

7.2.2. Внести у відповідні лунки по 50 мкл калібрувальних проб та контрольної сироватки, в що залишилися лунки - по 50 мкл досліджуваної сироватки крові в дублікатах.

Примітка 1: загальний час внесення калібрувальних проб, контрольної сироватки і досліджуваних сироваток крові не повинен перевищувати 15 хвилин, інакше час інкубації різних зразків буде значно відрізнятися, що призведе до хибних результатів

7.2.3. У всі лунки, крім лунок A1 і A2, внести по 150 мкл кон'югату.

7.2.4. Інкубувати стрипи протягом 120 хвилин без струшування, або 60 хвилин при струшуванні в термостатіруемого шейкері при температурі +37 °С зі швидкістю 500-800 об / хв.

7.2.5. По закінченні інкубації видалити вміст лунок в контейнер з дезінфікуючим розчином (1% розчином гіпохлориту натрію або 6% розчином перекису водню) і промити лунки п'ять разів. При кожній промивці в усі лунки додавати по 300 мкл розчину для промивання, приготованого за п. 7.1.5, струснути рамку на шейкері протягом 5-10 секунд з наступним Декантірованіє. Після останнього Декантірованіє ретельно видалити залишки рідини з лунок постукуванням рамки зі стрипами в перевернутому положенні по фільтрувальному паперу.

Допускається промивка лунок за допомогою автоматичного промивання пристрою.

7.2.6. Негайно внести в усі лунки по 100 мкл розчину ТМБ. Інкубувати стрипи в темноті при кімнатній температурі (+18 ... 25 °С) протягом 15-30 хвилин в залежності від ступеня розвитку забарвлення або 10 хвилин у термостатіруемого шейкері при температурі +37 °С зі швидкістю 500-800 об / хв.

7.2.7. Додати в усі лунки з тією же швидкістю і в тій же послідовності, як і розчин ТМБ, по 100 мкл стоп-реагенту для зупинки ферментної реакції, перемішати на шейкері протягом 1-2 хвилин при кімнатній температурі.

7.2.8. Якщо неможливо виміряти оптичну густина у лунках планшета безпосередньо після виконання п. 7.2.7., То слід мати на увазі, що забарвлення в лунках планшета стабільна не більше 20 хвилин при кімнатній температурі.

Примітка: максимальна оптична густина не повинна перевищувати меж лінійного виміру спектрофотометра. Робочий діапазон спектрофотометра необхідно уточнювати в паспорті приладу. Рекомендована максимальна оптична густина не більше 2,5 од.ОГ

8. РЕЄСТРАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Виміряти на фотометрі вертикального сканування оптичну густина у лунках при довжині хвилі 450 нм

При реєстрації результатів необхідно віднімати величину оптичної густини в лунках A1 і A2 з значень оптичної густини всіх інших лунок.

Примітка: середнє арифметичне значення оптичної густини в лунках А1 і А2 не повинно перевищувати 0,09 од.ОГ.

9 . ОБЛІК РЕЗУЛЬТАТІВ

9.1 . Побудувати калібрувальний графік залежності оптичної густини від концентрації Са 125 (Од/мл) в калібрувальних пробах (Малюнок). Зовнішній вигляд графіка залежить від способу перетворення осей .

Примітка: для побудови калібрувального графіка на масштабній папері необхідно використовувати дані оптичної густини після вирахування з них середньої величини оптичної густини лунок з ТМБ .

Якщо програма фотометра не дозволяє віднімати величину оптичної густини лунок А1 і А2 , то необхідно користуватися формулою :

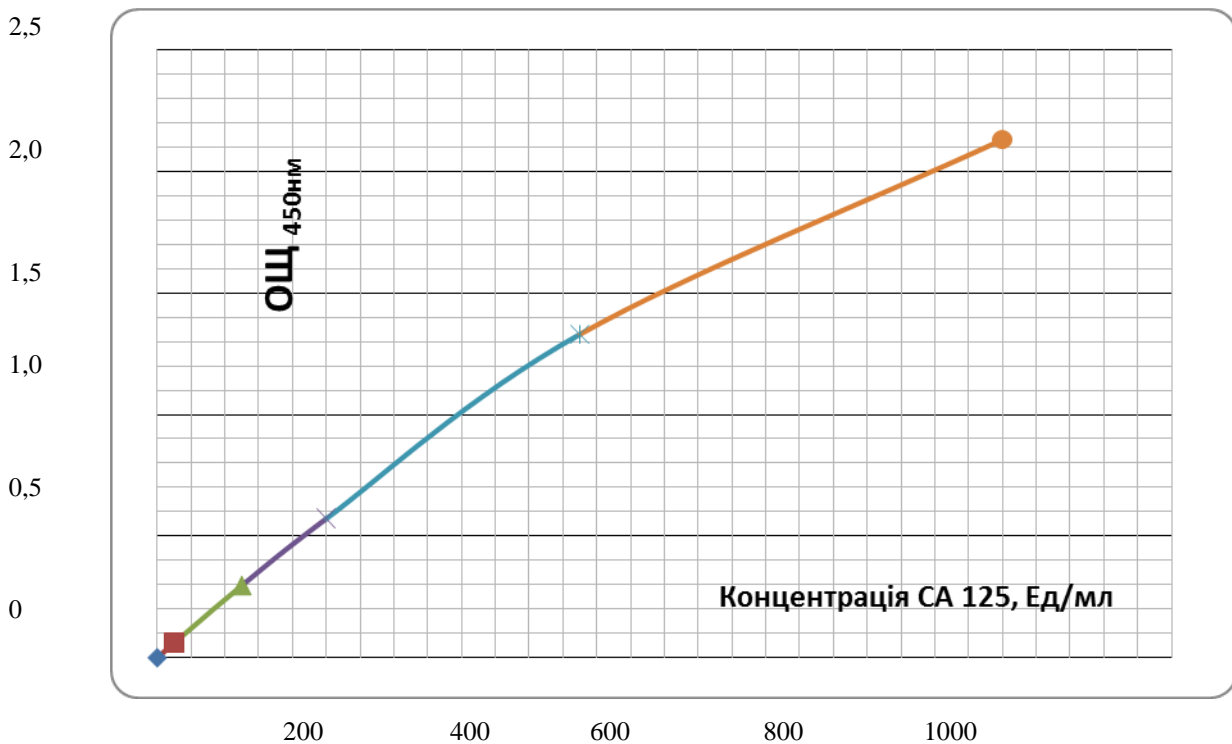
В- ВТ ,

де В - середнє арифметичне значення оптичної густини в лунках , що містять калібрувальні або досліджувані проби ,

ВТ - середнє арифметичне значення оптичної густини лунок А1 і А2.

9.2 . Визначити зміст Са 125 в пробах за калібрувальним графіком. У разі додаткового розведення зразків необхідно виміряну концентрацію Са 125 помножити на коефіцієнт розведення

9.3 . Екстраполяція калібрувального графіка для значень концентрації Са 125, що перевищують номінал КП № 6 , не допускається. Для точного визначення концентрації АФП в таких зразках необхідно виконати їх розведення у відповідності з п. 7.1.9:



10 . УМОВИ ЗБЕРІГАННЯ ТА ЕКСПЛУАТАЦІЇ НАБОРУ

Набір зберігати і транспортувати при (2-8)°С.

Промивочний розчин підготовлений до використання зберігати не більш 5 діб.

Допускається транспортування при температурі до 25°С не більше 5 діб. Не допускати заморожування!

Термін придатності набору реагентів – 14 місяців з дня випуску.

З питань, що стосуються якості набору, звертатися: в **ТОВ «Бест Діагностик»** за адресою:

04074, м. Київ-74, вул.Лугова, 9, тел./факс: (044) 500-57-11 E-mail: info@bestdiagnostic.com.ua

Виробник залишає за собою право вразі вдосконалення набору вносити зміни до інструкції.

СХЕМА ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗУ

№	Стадія	Реагенти	Температура	Час	Примітка
1	Внесення реагентів	50 мкл КП і КС	КТ		В лунки для виявлення ОГ ТМБ нічого не вносити
2		50 мкл досліджуваних зразків			
3		150 мкл кон'югату			
4	Інкубація	-	КТ	120	В темряві без струшування
			+37°C	60	Термостатируемый шейкер , 500-800 об/хв.
5	Промивка	300 мкл в лунку 1*промивного розчину (5 разів)			1*промивного розчину==14 мл промивочного розчину+266 мл H ₂ O
6	Внесення хромогена	100 мкл ТМБ			
7	Інкубація з ТМБ	-	КТ	15-30	В темноті
			+37°C	10	Термостатируемый шейкер , 500-800 об/хв
8	Зупинка ферментної реакції	100 мкл стоп-реагент			
9	Змішування	-	КТ	1-2	Шейкер
10	Реєстрація результатів	-		В перебігу 20 після зупинки ферментної реакції	Фотометр, 450 нм
11	Обробка результатів	-			Калькулятор і масштабний папір /відповідно ПЗ

Примітка до таблиці:

КП - калібрувальна проба;
КС - контрольна сироватка;
ОГ - оптична густина;
КТ - кімнатна температура (+18 ... 25 ° C);
ПЗ - програмне забезпечення.