

ІНСТРУКЦІЯ З ВИКОРИСТАННЯ

Набір реагентів для кількісного імуноферментного визначення загального простат-специфічного антигену
(ПСА–БЕСТ)

1. ПРИЗНАЧЕННЯ.

Набір реагентів «ПСА вільний–БЕСТ» призначений для кількісного *in vitro* визначення концентрації загального простат-специфічного антигену у сироватці крові людини методом твердофазного імуноферментного аналізу. Набір «ПСА–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 з антитілами до ПСА у фольгованому пакеті - 1 шт.;

Калібрувальні проби (КП)

- **КП 1** (калібрувальна проба №1) – 1 флакон, 0,5 мл, містить 0 нг/мл ПСА;
- **КП 2** (калібрувальна проба №2) – 1 флакон, 0,5 мл, містить 1 нг/мл ПСА;
- **КП 3** (калібрувальна проба №3) – 1 флакон, 0,5 мл, містить 2,5 нг/мл ПСА;
- **КП 4** (калібрувальна проба №4) – 1 флакон, 0,5 мл, містить 5 нг/мл ПСА;
- **КП 5** (калібрувальна проба №5) – 1 флакон, 0,5 мл, містить 10 нг/мл ПСА;
- **КП 6** (калібрувальна проба №6) – 1 флакон, 0,5 мл, містить 40 нг/мл ПСА.
- **кон'югат** моноклональних антитіл до ПСА з пероксидазою хрому – 1 фл.;
- **КС** (контрольна сироватка), діапазон концентрацій **зазначений на етикетці** флакону – 1 флакон;
- **Промиваючий розчин** – 1 фл.;
- **РРС** (Розчин для розведення сироватки крові) – 1 фл.;
- **СР** (стоп-реагент) – 1 фл.;
- **ТМБ** (розчин тетраметилбензидину) – 1 фл.,

3. АНАЛІТИЧНІ Й ДІАГНОСТИЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРУ.

3.1. Чутливість. Мінімальна не перевищує 0,1 нг/мл.

3.2. Специфічність. 100%.

3.3. Діапазон очікуваних значень. ПСА нормі до 4 нг/мл. Значення від 4 до 10 нг/мл при доброякісних пухлинах. Вище 10 нг/мл при злоякісних пухлинах, якщо це не механічне пошкодження простати.

4. ЗАПОБІЖНІ ЗАХОДИ.

При роботі з досліджувальними сироватками і контрольними зразками слід дотримуватись заходів безпеки, прийняті при роботі з потенційно інфекційним матеріалом: працювати в гумових рукавичках; не пікетувати 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.

6.1. 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.

6.2. Слід уникати використання в аналізі плазми крові, гемолізованої, мутної або гіперліпемічної сироватки. Не допускається використання як консервант азиду натрію.

6.3. Зразки сироватки крові слід використати протягом 24 годин з моменту отримання за умови їх зберігання при +2...8°C. Для більш тривалого зберігання зразки необхідно заморозити при температурі нижче -20°C. Уникати повторного заморожування зразків.

7. ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗУ.

7.1 . Підготовка реагентів

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

упакувати у фольгований пакет та зберігати до кінця терміну придатності при +2...8°C.

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 прилипили до стінок флаконів або до кришок. Відкрити флакони і покласти кришки перевернутими на суху поверхню. У кожний флакон з калібрувальною пробію та контрольної сироваткою внести по 0,5 мл дистильованої води і закрити кришками. Витримати флакони протягом 10 хвилин при кімнатній температурі (+18 ... 25 ° C) 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 тетраметилбензидину (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 перемішані і доведені до кімнатної температури.

7.1.9. Розведення досліджуваних зразків сироваток крові. Якщо за попередніми даними або за результатами аналізу (див. п. 9.3.) Значення концентрації ПСА в досліджуваних зразках вище КП № 6, зразки слід розвести РРС в 5 та 25 разів:

Зразок № 1 (розведення в 5 разів):

120 мкл РРС + 30 мкл досліджуваного зразка.

Зразок № 2 (розведення в 25 разів):

120 мкл РРС + 30 мкл зразка № 1.

При кожному розведенні необхідно ретельне перемішування. Розводити зразки сироватки крові тільки в день проведення аналізу.

Якщо після вимірюванні оптичної густини Зразка №2 залишається вище ОГ КП №6, то необхідно продовжити розведення та приготувати наступні зразки:

Зразок № 3 (розведення в 50 разів):

50 мкл РРС + 50 мкл зразка №2.

Зразок № 4 (розведення в 100 разів):

50 мкл РРС + 50 мкл зразка №3.

Примітка: при розведенні зразків необхідно ставити в аналіз обидва розведених зразка (в 5 та 25 разів або в 50 та 100 разів відповідно).

Дозволяється використовувати інші розведення. Якщо концентрація в зразку визначається по розведенням, то спочатку необхідно вибрати ті зразки, для яких отримана величина ОГ попадає в діапазон ОГ КП №2–ОП КП №6. Потім помножити концентрацію вибраного зразка, отриманого в аналізі, на фактор розведення. Якщо розведень, відповідних цій вимогі, кілька, необхідно взяти середнє арифметичне від отриманих після помноження на відповідні фактори розведення концентрацій.

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. У всі лунки, крім лунок A1 і A2, внести по 100 мкл кон'югату.

7.2.3. Внести у відповідні лунки по 20 мкл калібрувальних проб та контрольної сироватки, усі інші лунки – по 20 мкл досліджувані сироватки крові в дублях.

Примітка: 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.

7.2.4. Інкубувати стрипи протягом 60 хвилин при струшуванні в термостатуемому шейкері при температурі +37 ° C зі швидкістю 500-800 об / хв. Або 90 хвилин при кімнатній температурі.

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 декантіруванням. Після останнього декантірування 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°C) протягом 15 хвилин в залежності від ступеня розвитку забарвлення або 10 хвилин у термостатуємому шейкері при температурі +37 ° С зі швидкістю 500-800 об / хв .

7.2.7 . Додати в усі лунки з тією ж 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 (+18 ... 25°C)

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.

8.1 Виміряти на фотометрі вертикального сканування ОГ розчину в лунках при довжині хвилі 450 нм.

8.2 При реєстрації результату необхідно відняти значення ОГ у лунках А1 і А2 від ОГ усіх останніх лунок.

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

9 ОБЛІК РЕЗУЛЬТАТІВ.

9.1 Побудувати калібровочний графік залежності ОГ від концентрації ПСА (нг/мл) в калібровочних пробах (Малюнок). Зовнішній вигляд графіка залежить від способу перетворення вісей.

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 :

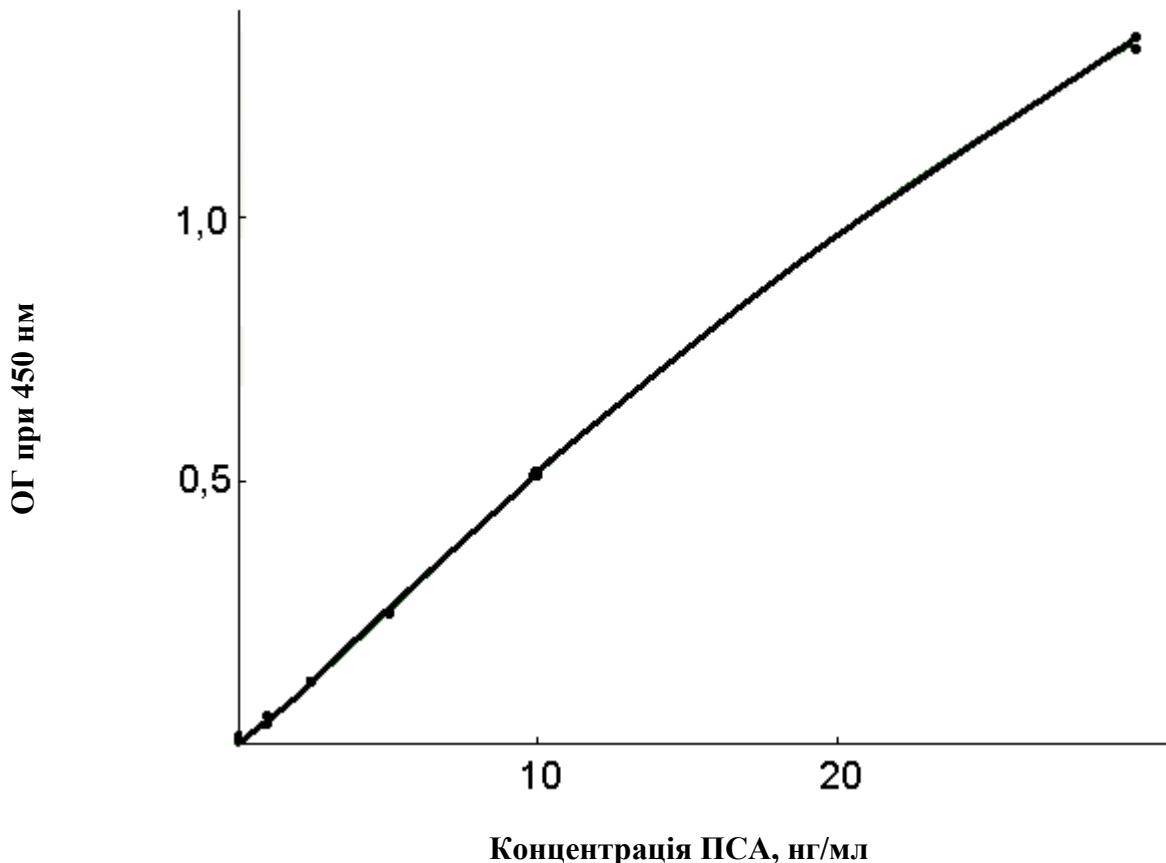
$$B - B_T ,$$

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

B_T - середнє арифметичне значення оптичної густини лунок А1 і А2

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

9.3 Екстраполяція калібрувального графіка для значень концентрації ПСА, що перевищують номінал КП №6, не допускається. Для точного визначення концентрації ПСА 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.

Промиваючий розчин підготовлений до використання зберігати не більш 30 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.