

НАБОР ИФА

ВЫСОКОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ В СЫВОРОТКЕ ЧЕЛОВЕКА КОНЦЕНТРАЦИИ С-РЕАКТИВНОГО ПРОТЕИНА

1668-18, CRP High Sensitivity

Каталог. № : 1668-18
Количество : 96
Производитель: DAI (США)

Методика от 10-10-2009



Основой при проведении анализа является оригинал инструкции на английском языке, вложенной в набор. Номер и дата версии оригинала и перевода инструкции должны совпадать.

Анализ	C-Reactive Protein High Sensitivity
Метод	Иммунорентный анализ с применением фиксированных ферментов
Принцип	Конъюгированный пероксидазой ИФА
Диапазон обнаружения	0-0.1 мг/л
Образец	5 мкл сыворотки
Специфичность	96 %
Чувствительность	0,01 мг/мл
Общее время	~ 65 мин.
Срок годности	18 мес.

НАЗНАЧЕНИЕ

Настоящий набор предназначен для количественного определения человеческого С-реактивного протеина в сыворотке. Улучшенная чувствительность измерения CRP может использоваться для определения и оценки инфекций, повреждения тканей, воспалительных заболеваний.

Только для диагностики *in vitro*.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ И ОБЪЯСНЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

С-реактивный протеин (CRP) был идентифицирован Тилетом и Францизом (1930) в плазме пациента с пневмонией и был назван так через его способность связывать и отделять С-полисахарид пневмококка. Это альфа глобулин с молекулярным весом около 110000-140000 дальтон, и он соединяет пять идентичных субъединиц, которые нековалентно связаны как циклический полимер. CRP синтезируется в печени и в норме присутствует составляющий трейсер сыворотки или плазмы при уровне меньше, чем 0,3 мг/дл. Его физиологическая роль числительная и разная, но некоторые его функции такие же, что и иммуноглобулинов, CRP также выполняет защитную функцию.

CRP есть один из остро фазовых протеинов, уровень которого в сыворотке или плазме растет во время основного, не специфического ответа на различные болезни. Сюда входят инфекции грам-положительных и грам-отрицательных организмов, острой фазы ревматоидных артритов, абдоминальных абсцессов и воспаления желчного протока. CRP также найдено в пациентов с синдромом Guillain-Barre и склерозом, центральной вирусной инфекцией, туберкулезом, острой инфекцией гепатита и другими некротическими и воспалительными болезнями, пациентов после ожогов и операций.

Определения уровня CRP в сыворотке не специфично к каким-нибудь отдельным болезням, он используется как индикатор воспалительных болезней. Уровень CRP растет в сыворотке или плазме в течении 24-48 часов после острого повреждения тканей, достигая своего пика (приблизительно 100х начального уровня) и уменьшается с прекращением воспаления или травмы. Повышенная концентрация CRP в сыворотке или плазме человека может держаться несколько дней до возвращения в нормальные границы.

Определение CRP более надежный и чувствительный показатель воспалительных процессов, чем степень осаждения эритроцитов, что может подвергаться влиянию физиологических изменений, несвязанных с воспалительными процессами. Современные методы тестирования, включая латексную агглютинацию, нефелометрию и радиальную иммунодиффузию (RID), имеют основное неудобство низкой чувствительности, тогда как ELISA тест показывает высокую чувствительность и специфичность.

Поскольку, повышенный уровень CRP ассоциируется с патологическими изменениями, анализ CRP дает информацию для диагноза, терапии и мониторинга воспалительных процессов и связанных болезней. К тому же, измерения CRP данным методом, может выступать кардиомаркером (как и миоглобин, креатин-киназа-MB, тропонин I и T), что используются для оценки риска сердечно-сосудистых и сосудистых болезней. Увеличение значения CRP не специфическое и не может интерпретироваться без полной истории болезни пациента, а также измерения CRP необходимо сравнивать с предыдущими значениями.

ПРИНЦИП АНАЛИЗА

CRP ELISA есть твердо-фазовый ферментно-связанный иммунорентный анализ. В анализе используются одно моноклональное антитело направленное против дестинктивной антигенной детерминанты на молекулы CRP. Это мышиное моноклональное анти-CRP антитело используется для иммобилизации на солидной фазе (на микропланшетных лунках). Козлиное анти-CRP антитело есть в растворе антитело-энзим (пероксидаза хрена) конъюгате. Образец теста одновременно реагирует с двумя антителами, в результате молекулы CRP оказываются в сэндвиче между солидной фазой и энзимно-связанными антителами. После 45 минутной инкубации при комнатной температуре, лунки промываются для удаления несвязанных меченых антител. Добавляется TMB реагент и инкубируется 20 минут, в результате развивается голубой цвет. Развитие цвета останавливается добавлением стоп раствора, что изменяет цвет на желтый. Концентрация CRP прямо пропорциональна интенсивности цвета в образце. Абсорбция измеряется спектрофотометрически при 450 нм.

РЕАГЕНТЫ И ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

1. Планшет с привитыми мышиными моноклональными анти-CRP антителами, 1 на 96 лунок.
2. Набор референтных стандартов: 1,0 мл/фл, содержащий 0, 0,005, 0,010, 0,025, 0,050 и 0,100 мг/л CRP в растворе фосфатного буфера-BSA с консервантами, лиофилизированные.
3. hsCRP Разбавитель образцов, 50 мл/фл, содержащий раствор фосфатный буфер-BSA с консервантами.
4. Ферментный конъюгат, 12 мл/фл, содержащий козлиное анти-CRP конъюгированное к пероксидазе хрена с консервантами
5. Раствор TMB, 11 мл/бут., содержащий раствор TMB.
6. Стоп раствор, 1 бут., 11 мл/бут., содержащий разбавленный 1N HCl.

НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

1. Дистиллированная или деионизированная вода.
2. Точные пипетки: 5, 10, 50, 100 мкл и 1,0 мл.
3. Наконечники к пипеткам.
4. Микропланшетный ридер, способный считывать абсорбцию при 450 нм.
5. Вихревой смеситель или аналог.
6. Промокательная бумага.
7. Графопостроительная бумага.

ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Обращайтесь с реагентами и образцами как с потенциально инфицированными.
2. Избегайте контакта со стоп раствором. Это может вызывать ожог. При попадании на кожу, промойте водой и обратитесь за медицинской помощью.
3. Не используйте реагенты после окончания срока пригодности и не смешивайте компоненты с разных лотов.
4. Немедленно закрывайте крышки реагентов.
5. Не пипетируйте реагенты ртом.
6. Для диагностики *in vitro*.

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ

1. Храните невскрытые наборы при 2-8°C до окончания срока пригодности, указанного на ярлыке.
2. Храните планшет в запечатанном пакете с осушителем для минимизации попадания воздуха.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

1. Все реагенты следует привести к комнатной температуре (18-25°C) перед использованием.
2. Сыворотка пациента должна быть разбавлена 100 кратно перед использованием. Приготовьте серию маленьких пробирок (напр. 1,5 мл микроцентрифужных пробирок) и смешайте 5 мкл сыворотки с 495 мкл (0,495 мл) разбавителя образца. Не разбавляйте стандарты.

3. Образцы с ожидаемой концентрацией выше, чем 10 мг/л может быть оценено количественно дальнейшим разбавлением (10кратно) 100кратно разбавленного раствора разбавителем образцов (напр. 10 мкл 100кратно разбавленного образца к 90 мкл разбавителя образца).
4. разведите каждый лиофилизированный стандарт 1,0 мл дистиллированной водой. Для разбавления выдержите образцы 20 минут и легко смешайте. Разбавленные стандарты должны храниться при 2-8°C и они стабильны 30 дней.

ИНСТРУМЕНТАРИЙ

Для измерения абсорбции необходим микропланшетный ридер с шириной размаха 10 нм или меньше и оптической плотностью в границах 0-3 ОП или выше при длине волны 450 нм.

СБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

1. В этом тесте используются образцы сыворотки.
2. Образцы необходимо собрать, используя стандартную технику венопунктуры. Удалите сыворотку от коагулированных клеток в течении 60 минут после забора.
3. Образцы, которые не могут быть проанализированы в течении 24 часов после забора, необходимо заморозить до -20°C или ниже. Они остаются стабильны 6 месяцев.
4. Избегайте сильно гемолизированных (ярко красные), липемических (молочных) или мутных образцов (после центрифугирования).
5. Избегайте повторных циклов замораживания/оттаивания образцов. Не храните в холодильнике с системой саморазмораживания. Образцы, которые после замораживания являются мутными или содержат частицы, должны быть центрифугированы.

ПРОЦЕДУРНЫЕ ЗАМЕЧАНИЯ

1. Рекомендуемое пипетирование (одно- или многоканальное): Пипетирование образцов, стандартов и контролей должно проводиться в течении 3 минут.
2. Все стандарты, образцы и контроли должны тестироваться в дубликаты, что б все условия тестирования были идентичные.
3. Рекомендуется, чтобы все лунки были считаны в течении 15 минут после добавления стоп раствора.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

1. **Сыворотка пациентов и контроли должны быть разбавлены 100кратно перед использованием (смотри. Приготовление реагентов). Не разбавляйте стандарты.**
2. Поместите необходимое количество ячеек в держатель.
3. Внесите 10 мкл НЕРАЗБАВЛЕННЫХ CRP стандартов, РАЗБАВЛЕННЫХ образцов и РАЗБАВЛЕННЫХ контролей в соответствующие лунки.
4. Внесите 100 мкл реагента CRP энзимного конъюгата в каждую лунку.
5. Тщательно перемешайте 30 секунд. Очень важно добиться полного смешивания.
6. Инкубируйте при комнатной температуре (18-25 °C) 45 минут.
7. Удалите инкубационный раствор в контейнер для отходов. Промойте лунки 5 раз неионизированной или дистиллированной водой. **НЕ ИСПОЛЬЗУЙТЕ ВОДУ ИЗ-ПОД КРАНА.**
8. Резко переверните лунки на абсорбирующую бумагу. Для удаления остатков воды.
9. Внесите 100 мкл ТМВ раствора в каждую лунку. Легко перемешайте 5 секунд.
10. Инкубируйте 20 минут при комнатной температуре.
11. Остановите реакцию добавлением 100 мкл стоп раствора в каждую лунку.
12. Легко перемешайте 30 секунд. **Важно добиться, чтобы голубой цвет полностью изменился на желтый.**
13. Считайте абсорбцию при 450 нм микропланшетным ридером при 450 нм в течении 15 минут.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

1. Необходимо, что б контрольные образцы использовались при каждой калибровочной кривой, для оценки характеристик теста. Контрольные материалы должны тестироваться повторно, что б установить средние значения и границы.

ВЫЧИСЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

1. Вычислите значение средней абсорбции (ОП₄₅₀) для каждого набора стандартов, контролей и образцов.
2. Постройте стандартную кривую, откладывая среднюю абсорбцию, полученную для каждого стандарта против его концентрации в мг/л на графической бумаге, с абсорбцией на оси у и концентрацией на оси х.

3. Используя среднюю абсорбцию для каждого образца, определите соответствующую концентрацию CRP (мг/л) со стандартной кривой. Зависимо от опыта и/или компьютерных возможностей, могут использоваться другие методы обработки данных.
4. Полученные значения образцов пациентов и контрольной сыворотки необходимо умножить на фактор разбавления 100 для получения результатов CRP в мг/л.
5. Образцы пациентов с концентрацией CRP выше, чем 10 мг/л, должны быть разбавлены 10кратно после начального 100кратного разбавления (общее разбавление 1000кратно) и конечные значения CRP должны быть умножены на 1000 для получения результатов CRP в мг/л.
6. Примечание: Образцы пациентов с концентрацией меньше, чем 0,1 мг/л должны интерпретироваться как «<0,1 мг/л CRP».

ПРИМЕР СТАНДАРТНОЙ КРИВОЙ

Результаты типичного стандартного теста с абсорбцией, считанной при 450 нм, показанной на оси у против концентрации CRP на оси х. Эта стандартная кривая только для иллюстрации и не должна использоваться для вычисления результатов. Каждая лаборатория должна устанавливать собственные данные и стандартную кривую в каждом эксперименте.

CRP (мг/л)	Абсорбция (450 нм)
0	0,073
0,005	0,358
0,010	0,624
0,025	1,305
0,050	2,093
0,100	2,962

Пример типичной стандартной кривой смотрите в оригинале инструкции на англ. языке.

ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

1. Надежные и соответствующие результаты будут получены при проведении анализа в соответствии с инструкцией и хорошей лабораторной практикой.
2. Процедура промывания – критична. Недостаточное промывание может привести к неточным результатам.
3. Образцы сыворотки сильно липемические, гемолизированные или мутные не должны использоваться в этом тесте.
4. Результаты могут использоваться как дополнение к другим диагностическим процедурам.
5. Образцы пациентов могут содержать человеческие анти-мышинные антитела (НАМА), что могут давать фальшиво завышенные или заниженные результаты с анализом, что использует мышинное моноклональное антитело. Этот анализ устроен таким образом, что б минимизировать влияние НАМА-содержащих образцов. Однако, полное исключение не может быть гарантировано. Тестовые результаты, что не соответствуют клинической картине и истории пациента должны интерпретироваться с осторожностью.

ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Рекомендуется, что б каждая лаборатория устанавливала собственные границы, что базируются на популяции пациентов. Ниже поданы значения CRP для здоровых индивидов, указанные в литературе:

Сыворотка новорожденных: 0,01-0,35 мг/л
Сыворотка взрослых: 0,068-8,2 мг/л

ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗА

1. Точность:

Статистическое изучение 117 образцов сыворотки человека, при концентрации CRP от 0,62 мг/л до 119,3 мг/л, демонстрирует соотношение с коммерческим набором, что показано ниже.

Сравнение данного набора с высокочувствительным Dade-Behring N CRP тестом дало следующие данные (n=117):

Коэффициент корреляции = 0,954
Отклонение = 0,8396
Пересечение = 1,3948
Среднее = 13,74 мг/л
Среднее Dade = 14,75 мг/л

2. Чувствительность

Минимально определяемая концентрация CRP при измерении при 2 СО от среднего значения нулевого стандарта равна 0,1 мг/л. **Нижняя граница равна 0,1 мг/л, верхняя граница = 10 мг/л**

3. Точность

Внутри тестовая точность была определена тестированием пяти разных сывороток в одном анализе.

Образец сыворотки	1	2	3	4	5
№ репликантов	22	22	22	22	20
Среднее CRP (мг/л)	0,546	0,894	2,021	3,492	17,549
CO	0,041	0,037	0,085	0,146	0,397
КВ (%)	7,5	4,1	4,2	4,1	2,3

Между тестовая точность была определена измерением пяти разных образцов сыворотки при индивидуальных калиброванных тестах.

Образец сыворотки	1	2	3	4	5
№ репликантов	20	20	20	20	20
Среднее CRP (мг/л)	0,490	0,890	1,925	3,529	17,435
CO	0,020	0,023	0,078	0,114	0,438
КВ (%)	4,1	2,5	4,1	3,2	2,5

4. Изучение линейности и восстановления

А. Восстановление

Разные образцы сыворотки с известным уровнем CRP были скомбинированы и проанализированы в дубликаты. Среднее значение восстановления равно 100,4%

Номер пар	Ожидаемые CRP (мг/л)	Полученные CRP (мг/л)	% восстановления
1	0,600	0,606	101
2	1,218	1,269	104
3	2,724	2,528	93
4	3,635	3,408	94
5	4,633	4,787	103
6	5,740	6,319	110
7	8,721	8,587	98

В. Линейность

Образцы пяти пациентов серийно были разбавлены для определения линейности. Среднее восстановление было 99,4%. См. в оригинале инструкции.

5. Специфичность

Следующие аналиты были тестированы на перекрестную реактивность:

Тестируемый материал	Тестовая концентрация
Билирубин	50 мг/л 100 мг/л 230 мг/л
Гемоглобин	12 г/л 24 г/л 36 г/л
Триглицериды	2,5 г/л 5,0 г/л 7,5 г/л
Человеческий IgG	5 г/л 10 г/л 25 г/л



ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

ООО «ДИАМЕБ»
ул.Черновола, 97
г. Ивано-Франковск, 76005
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com