## СОДЕРЖАНИЕ


1. НАЗНАЧЕНИЕ 2
2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА 3
3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ 3
4. СОСТАВ НАБОРА 4
5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ 5
6. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ 5
7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА 5
8. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА 6
9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА 7
10. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ И НОРМЫ 9
11. ЛИТЕРАТУРА 9


## CONTENT


1. INTENDED USE 10
2. SUMMARY AND EXPLANATION 10
3. PRINCIPLE OF THE TEST 10
4. WARNINGS AND PRECAUTIONS 11
5. KIT COMPONENTS 12
6. SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE 13
7. TEST PROCEDURE 13
8. QUALITY CONTROL 15
9. CALCULATION OF RESULTS 15
10. EXPECTED VALUES 15
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS 16
12. LITERATURE 16


Инструкция составлена Руководителем службы клиентского сервиса ООО «ХЕМА», к. б. н. Д. С. Кострикиным

«УТВЕРЖДЕНА»
Приказ Росздравнадзора № 10517-Пр/10 от 17 ноября 2010 г.
КРД № 61700 от 21.09.2010

# ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ С-РЕАКТИВНОГО БЕЛКА В СЫВОРОТКЕ (ПЛАЗМЕ) КРОВИ «СРБ-ИФА»

## 1. НАЗНАЧЕНИЕ

**1.1.** Набор реагентов «СРБ-ИФА» предназначен для количественного определения концентрации С-реактивного белка в сыворотке (плазме) крови методом твердофазного иммуноферментного анализа.

**1.2.** С–реактивный белок (СРБ) – пентамерный белок (пентраксин) с молекулярной массой около 100 кДа. СРБ является одним из наиболее эволюционно древних факторов врожденного гуморального иммунитета. СРБ обладает высоким сродством ко многим внутренним антигенам – фосфоэтаноламину, фосфорилхолину, гистонам, фибронектину, ламинину и поликатионным соединениям. СРБ способен связывать полисахариды клеточных стенок стрептококков и стафилококков, принимает участие в очистке плазмы от остатков апоптотически и некротически погибших клеток, усиливая их фагоцитоз. СРБ способен активировать классический каскад комплемента и стимулировать фагоцитарную активность макрофагов. Резкое (до 1000 раз) увеличение концентрации СРБ в циркуляции является высокочувствительным, но неспецифическим маркером острого воспалительного процесса, индуцированного интерлейкином 6. В последние годы выяснилось, что длительно повышенный плазменный уровень СРБ (3–10 мкг/мл) сопряжен с риском развития ишемической болезни сердца. Повышенный базальный уровень СРБ плазмы крови регистрируется у женщин в менопаузе, находящихся на заместительной гормональной терапии, а также у курильщиков.

## 2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

Определение С-реактивного белка основано на использовании «сэндвич»-варианта твердофазного иммуноферментного анализа. На внутренней поверхности лунок планшета иммобилизованы мышиные моноклональные антитела к СРБ человека. В лунках планшета, при добавлении исследуемого образца, происходит связывание СРБ, содержащегося в исследуемом образце, с антителами на твердой фазе. Образовавшийся комплекс выявляют с помощью конъюгата мышиных моноклональных антител к СРБ с пероксидазой хрена. В результате образуется связанный с пластиком «сэндвич», содержащий пероксидазу. Во время инкубации с раствором субстрата тетраметилбензидина (ТМБ) происходит окрашивание растворов в лунках. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации С-реактивного белка в исследуемом образце. Концентрацию С-реактивного белка в исследуемых образцах определяют по калибровочному графику зависимости оптической плотности от содержания С-реактивного белка в калибровочных пробах.

## 3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

**3.1. Специфичность**.

Использование мышиных моноклональных антител к СРБ позволяет достичь высокой специфичности анализа

**3.2. Воспроизводимость**.

Коэффициент вариации результатов определения содержания СРБ в одном и том же образце сыворотки (плазмы) крови с использованием Набора «СРБ-ИФА» не превышает 8,0%.

**3.3. Линейность**.

Зависимость концентрации СРБ в образцах сыворотки (плазмы) крови при разведении их сывороткой (плазмой) крови, не содержащей СРБ, имеет линейный характер в диапазоне концентраций 0.25–25 мг/л и составляет ±10,0%.

**3.4. Точность**.

Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» – соответствие измеренной концентрации СРБ предписанной, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы 1 мг/л. Процент «открытия» составляет 90–110%.

**3.5. Чувствительность**.

Минимальная достоверно определяемая Набором «СРБ-ИФА» концентрация СРБ в сыворотке (плазме) крови не превышает 0.05 мг/л.

## 4. СОСТАВ НАБОРА

| | Код компонента | Символ | Наименование | Кол-во | Ед. | Описание |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | P250Z | SORB MTP | **Планшет** 96-луночный полистироловый, стрипированный, готов к использованию | 1 | шт. | - |
| 2 | C250Z | CAL 1–6 | **Калибровочные пробы** на основе трис-буфера (pH 7.2–7.4), содержащие известные количества С-реактивного белка – **0**; **0.25**; **1**; **2.5**; **10**; **25 мг/л**, готовы к использованию (по 0.5 мл каждая) | 6 | шт. | прозрачные жидкости ярко-красного цвета (калибровочная проба 0 – прозрачная бесцветная жидкость) |
| 3 | Q250Z | CONTROL | **Контрольная сыворотка** на основе сыворотки крови человека с известным содержанием С-реактивного белка, готова к использованию (0.5 мл) | 1 | шт. | прозрачная бесцветная жидкость |
| 4 | T250Z | CONJ HRP | **Конъюгат**, готов к использованию (11 мл) | 1 | шт. | прозрачная жидкость ярко-красного цвета |
| 5 | S012Z | DIL | **Красный ИФА-Буфер**, готов к использованию (11 мл) | 1 | шт. | прозрачная жидкость красного цвета |
| 6 | S011Z3 | DIL SPE | **ИФА-Буфер**, готов к использованию (50 мл) | 1 | шт. | прозрачная жидкость синего цвета |
| 7 | R055Z | SUBS TMB | **Раствор субстрата тетраметилбензидина** (ТМБ), готов к использованию (11 мл) | 1 | шт. | прозрачная бесцветная жидкость |
| 8 | S008Z | BUF WASH 21X | **Концентрат отмывочного раствора**, 21х-кратный (22 мл) | 1 | шт. | прозрачная бесцветная жидкость |
| 9 | R050Z | STOP | **Стоп-реагент**, готов к использованию (11 мл) | 1 | шт. | прозрачная бесцветная жидкость |
| 10 | N003 | - | Бумага для заклеивания планшета | 2 | шт. | - |
| 11 | K250I | - | Инструкция по применению Набора реагентов «СРБ-ИФА» | 1 | шт. | - |
| 12 | K250Q | - | Паспорт контроля качества Набора реагентов «СРБ-ИФА» | 1 | шт. | - |

## 5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

**5.1.** Потенциальный риск применения Набора – класс 1 (ГОСТ Р 51609-2000).

**5.2.** Все компоненты Набора, за исключением стоп-реагента (5,0% раствор серной кислоты), в используемых концентрациях являются нетоксичными.

Раствор серной кислоты обладает раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. При попадании на кожу и слизистые пораженный участок следует промыть большим количеством проточной воды.

**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.** При работе с Набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированный материал, способный длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

## 6. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

- фотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность содержимого лунок планшета при длине волны 450 нм;
- термостат, поддерживающий температуру +37 °С ±0,1 °С;
- дозаторы со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы в диапазоне 5–250 мкл;
- цилиндр мерный вместимостью 500 мл;
- вода дистиллированная;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- бумага фильтровальная.

## 7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

**7.1.** Перед проведением анализа компоненты Набора и исследуемые образцы сыворотки (плазмы) крови следует выдержать при комнатной температуре (+18...+25 °С) не менее 30 мин.

**7.2. Приготовление планшета**.

Вскрыть пакет с планшетом и установить на рамку необходимое количество стрипов. Оставшиеся неиспользованными стрипы, чтобы предотвратить воздействие на них влаги, тщательно заклеить бумагой для заклеивания планшета и хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора.

**7.3. Приготовление отмывочного раствора**.

В случае дробного использования Набора следует отобрать необходимое количество концентрата отмывочного раствора и развести дистиллированной водой в 21 раз (1 мл концентрата отмывочного раствора + 20 мл дистиллированной воды).

## 8. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

**8.1.** Набор реагентов «СРБ-ИФА» должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности, указанного на упаковке Набора.

Допускается хранение (транспортировка) Набора при температуре до +25 °С не более 5 суток. Не допускается замораживание целого набора.

**8.2.** Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 41 исследуемых образцов, 6 калибровочных проб и 1 пробы контрольной сыворотки (всего 96 определений).

**8.3.** В случае дробного использования Набора компоненты следует хранить следующим образом:

- оставшиеся неиспользованными стрипы необходимо тщательно заклеить бумагой для заклеивания планшета и хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора;
- ИФА-Буфер, конъюгат, субстрат, стоп-реагент после вскрытия флаконов следует хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора;
- калибровочные пробы и контрольную сыворотку после вскрытия флаконов следует хранить при температуре +2...+8 °С не более 2 месяцев;
- оставшийся неиспользованным концентрат отмывочного раствора следует хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора;
- приготовленный отмывочный раствор следует хранить при комнатной температуре (+18...+25 °С) не более 5 суток или при температуре +2...+8 °С не более 30 суток;

Примечание. После использования реагента немедленно закрывайте крышку флакона. Закрывайте каждый флакон своей крышкой.

**8.4.** Для проведения анализа не следует использовать гемолизированную, мутную сыворотку (плазму) крови, а также сыворотку (плазму) крови, содержащую азид натрия. Если анализ производится не в день взятия крови, сыворотку (плазму) следует хранить при температуре -20 °С. Повторное замораживание-оттаивание образцов сыворотки (плазмы) крови не допускается.

**8.5.** Исключается использование для анализа образцов сыворотки (плазмы) крови людей, получавших в целях диагностики или терапии препараты, в состав которых входят мышиные антитела.

**8.6.** При использовании Набора для проведения нескольких независимых серий анализов следует иметь в виду, что для каждого независимого определения необходимо построение нового калибровочного графика; кроме этого, рекомендуется определение концентрации С-реактивного белка в контрольной сыворотке.

**8.7.** Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение Инструкции по применению Набора.

## 9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

| | |
|---|---|
| 1 | Поместите в рамку необходимое количество стрипов – исследуемые образцы в 2 повторах и 14 лунок для калибровочных проб и контрольной сыворотки. |
| 2 | **Разбавьте образцы сыворотки (плазмы) крови в 101 раз, используя ИФА-Буфер** (S011Z3). Пример: 5 мкл образца + 500 мкл ИФА-Буфера. Не разбавляйте калибровочные пробы и контрольную сыворотку. |
| 3 | Если предполагаемая концентрация СРБ в исследуемом образце превышает 25 мг/л, его следует дополнительно развести, используя ИФА-Буфер (S011Z3). Использование других буферов и реагентов для разбавления образцов может искажать результаты определения!<br>Примечание. Для получения надежных результатов рекомендуется использовать несколько последовательных разведений исследуемого образца сыворотки (плазмы) крови. |
| 4 | **Внесите во все лунки планшета по 100 мкл красного ИФА-Буфера.** |
| 5 | **Внесите в соответствующие лунки в дубликатах по 25 мкл калибровочной пробы и контрольной сыворотки. В остальные лунки внесите в дубликатах по 25 мкл разбавленных исследуемых образцов сыворотки (плазмы) крови**. Внесение калибровочных проб, контрольной сыворотки и исследуемых образцов необходимо произвести в течение 5–10 минут. |
| 6 | Аккуратно перемешайте содержимое планшета круговыми движениями по горизонтальной поверхности, заклейте планшет бумагой для заклеивания планшета. **Инкубируйте планшет в течение 30 минут при температуре +37 °C**. |
| 7 | По окончании инкубации удалите содержимое лунок аспирацией (например, с помощью водоструйного насоса) или декантированием и **отмойте лунки 3 раза**. При каждой отмывке добавьте во все лунки по 250 мкл отмывочного раствора (см. п. 7.3), встряхните планшет круговыми движениями по горизонтальной поверхности с последующей аспирацией или декантированием. Задержка при отмывке (замачивание лунок) не требуется. При каждом декантировании необходимо тщательно удалять остатки жидкости из лунок. |
| 8 | **Внесите во все лунки по 100 мкл конъюгата**. |
| 9 | Заклейте планшет бумагой для заклеивания планшета и **инкубируйте** его **в течение 30 минут при температуре +37 °C**. |
| 10 | По окончании инкубации удалите содержимое лунок и **отмойте лунки 5 раз**. |
| 11 | **Внесите во все лунки по 100 мкл раствора субстрата тетраметилбензидина**. Внесение раствора субстрата тетраметилбензидина в лунки необходимо произвести в течение 2–3 мин. Инкубируйте планшет в темноте при комнатной температуре (+18...+25 °C) в течение 10–20 минут в зависимости от степени развития синего окрашивания. |

продолжение таблицы на стр. 8

| | |
|---|---|
| 12 | **Внесите во все лунки** с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор субстрата тетраметилбензидина, **по 100 мкл стоп-реагента**, при этом содержимое лунок окрашивается в ярко-желтый цвет. |
| 13 | **Измерьте величину оптической плотности (ОП) содержимого лунок планшета на фотометре** вертикального сканирования **при длине волны 450 нм**. Измерение ОП содержимого лунок планшета необходимо произвести в течение 15 мин после внесения стоп-реагента. Бланк фотометра выставляйте по калибровочной пробе С1. |
| 14 | Постройте в линейных координатах калибровочный график: ось абсцисс (x) – концентрация СРБ в калибровочных пробах (мг/л), ось ординат (y) – оптическая плотность калибровочных проб (ОП 450 нм). Для алгоритма обсчета (аппроксимации) калибровочного графика используйте интервальный (кусочно-линейный, «от точки к точке») метод. |
| 15 | Определите по калибровочному графику содержание СРБ в исследуемых образцах.Если исследуемый образец предразводили (см. п. 2), умножьте полученный результат на фактор разведения. |

**Таблица М**

| Вид материала | Сбор, хранение и обработка материала | Пример разведения | красный ИФА-Буфер в лунку, мкл | Образец в лунку, мкл | Фактор пересчета |
|---|---|---|---|---|---|
| сыворотка (плазма) крови | Исследуемые образцы должны быть тщательно отцентрифугированы. Анализ мутных, хилезных и гемолитических образцов может привести к искажению результатов. | 5 мкл образца + 500 мкл ИФА-Буфера | 100 | 25 | 1 |

## 10. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ И НОРМЫ

**10.1.** Основываясь на результатах исследований, проведенных ООО «ХЕМА», рекомендуем пользоваться нормами, приведенными ниже. Вместе с тем, в соответствии с правилами *GLP* (Хорошей лабораторной практики), каждая лаборатория должна сама определить параметры нормы, характерные для обследуемой популяции.

**Примечание**. Значения концентраций СРБ в исследуемых образцах, находящиеся ниже границы чувствительности Набора (0.05 мг/л), а также превышающие значение верхней калибровочной пробы (25 мг/л) следует приводить в следующей форме: в исследуемом образце Х концентрация СРБ ниже 0.05 мг/л или выше 25 мг/л.

| Исследуемая группа | Единицы, мг/л | |
|---|---|---|
| | Нижний предел | Верхний предел |
| Здоровые доноры | - | 5.0 |

## 11. ЛИТЕРАТУРА

1. Steven Black, Irving Kushner, and David Samols – C-reactive Protein. J. Biol. Chem., Nov 2004; 279: 48487 – 48490.
2. V B Patel, M A Robbins, and E J Topol – C-reactive protein: a 'golden marker' for inflammation and coronary artery disease. Cleveland Clinic Journal of Medicine, Jun 2001; 68: 521 – 524.
3. Nader Rifai and Paul M. Ridker – High-Sensitivity C-Reactive Protein: A Novel and Promising Marker of Coronary Heart Disease. Clin. Chem., Mar 2001; 47: 403 – 411.

По вопросам, касающимся качества Набора **«СРБ-ИФА»**,
следует обращаться в ООО «ХЕМА» по адресу:
105043, Москва, а/я 58,
тел./факс: (495) 737-39-36, 737-00-40, 510-57-07 (многоканальный)

электронная почта: info@xema.ru; rqc@xema.ru
интернет: www.xema.ru; www.xema-medica.com

Руководитель службы клиентского сервиса ООО «ХЕМА»,
к. б. н. Д. С. Кострикин

*Instruction for use*

# A SOLID-PHASE ENZYME IMMUNOASSAY FOR THE QUANTITATIVE DETERMINATION OF C-REACTIVE PROTEIN IN HUMAN BLOOD SERUM OR PLASMA

## 1. INTENDED USE

A solid-phase enzyme immunoassay for the quantitative determination of C-reactive protein in blood serum or plasma.

This kit is designed for measurement of C-reactive protein in blood serum or plasma. For possibility of use with other sample types, please, refer to Application Notes (on request). The kit contains reagents sufficient for 96 determinations and allows to analyze 41 unknown samples in duplicates.

## 2. SUMMARY AND EXPLANATION

C-reactive protein (CRP) is a member of penthraxin family with the MW ca. 100 kDa. In evolution of vertebrates, CRP was one of the first developed factors of inborn humoral immunity. CRP efficiently binds both endogenous (phosphoethanolamine, phosphorylcholine, histones, fibronectin, laminin) and exogenous (cell walls of Gram positive bacteria) ligands. The binding of these ligands as well as the debris of apoptotic and necrotic cells by CRP facilitates the phagocytosis. CRP is capable to activate classic pathway of complement activation and phagocytic activity of macrophages. Dramatic (up to 1000 fold) elevation of serum CRP level is highly sensitive but nonspecific marker of inflammation induced by interleukin 6.

Recently, there was observed a correlation between moderately elevated serum CRP (3-10 mg/l) and risk of ischemic heart disease. Elevated serum CRP is also observed in smokers and post-menopausal women receiving substitution hormonal therapy.

## 3. PRINCIPLE OF THE TEST

This test is based on two-site sandwich enzyme immunoassay principle. Tested specimen is placed into the microwells coated by specific murine monoclonal to human CRP-antibodies. Antigen from the specimen is captured by the antibodies coated onto the microwell surface. Unbound material is removed by washing procedure. Second antibodies – murine monocnoclonal to human CRP, labelled with peroxidase enzyme, are then added into the microwells. After subsequent washing procedure, the remaining enzymatic activity bound to the microwell surface is detected and quantified by addition of chromogen-substrate mixture, stop solution and photometry at 450 nm. Optical density in the microwell is directly related to the quantity of the measured analyte in the specimen.

## 4. WARNINGS AND PRECAUTIONS

**4.1.** For professional use only.

**4.2.** This kit is intended for in vitro diagnostic use only.

**4.3.** INFECTION HAZARD: There is no available test methods that can absolutely assure that Hepatitis B and C viruses, HIV-1/2, or other infectious agents are not present in the reagents of this kit. All human products, including patient samples, should be considered potentially infectious. Handling and disposal should be in accordance with the procedures defined by an appropriate national biohazard safety guidelines or regulations.

**4.4.** Avoid contact with stop solution containing 5,0% $H_2SO_4$. It may cause skin irritation and burns.

**4.5.** Wear disposable latex gloves when handling specimens and reagents. Microbial contamination of reagents may give false results.

**4.6.** Do not use the kit beyond the expiration date.

**4.7.** All indicated volumes have to be performed according to the protocol. Optimal test results are only obtained when using calibrated pipettes and microplate readers.

**4.8.** Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics in areas where specimens or kit reagents are handled.

**4.9.** Chemicals and prepared or used reagents have to be treated as hazardous waste according to the national biohazard safety guidelines or regulations.

**4.10.** Do not mix reagents from different lots.

**4.11.** Replace caps on reagents immediately. Do not swap caps.

**4.12.** Do not pipette reagents by mouth.

**4.13.** Specimens must not contain any AZIDE compounds – they inhibit activity of peroxidase.

**4.14.** Safety Data Sheet for this product is available upon request directly from XEMA Co., Ltd.

**4.15.** The Safety Data Sheet fit the requirements of EU Guideline 91/155 EC.

## 5. KIT COMPONENTS

**5.1.** Contents of the Kit

| | Symbol | Description | | Qty | Units | Colour code | Stability of opened/diluted components |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | SORB MTP | CRP EIA strips, 8x12 wells | polystyrene microwells coated with murine monoclonal to human CRP | 1 | pcs | | until exp.date |
| 2 | CAL 1-6 | Calibrator set, 0.5 ml each. The set contains 6 calibrators: 0; 0.25; 1; 2.5; 10, 25 mg/l | human C-reactive protein diluted in tris buffered BSA solution, preservative – 0,01% Bronidox L, 0,01% 2-Methyl-4-isothiazolin-3-one-hydrochloride; also contains bright red dye | 6 | pcs | bright red (C1 – colourless) | 2 months |
| 3 | CONTROL | Control serum (0.5 ml) | dilution of preselected human serum, with high content of C-reactive protein with BSA solution; preservative – 0,01% Bronidox L, 0,01% 2-Methyl-4-isothiazolin-3-one-hydrochloride, colourless | 1 | pcs | colourless | 2 months |
| 4 | CONJ HRP | Conjugate, 11 ml | aqueous solution of murine monocnoclonal to human CRP coupled with horseradish peroxidase diluted on phosphate buffered solution with casein from bovine milk and detergent (Tween-20), contains 0,1% phenol as preservative and bright red dye | 1 | pcs | bright red | until exp.date |
| 5 | DIL | red EIA buffer 11 ml | phosphate buffered saline with casein from bovine milk and detergent (Tween-20), contains 0,1% phenol as preservative; contains red dye | 1 | pcs | red | until exp.date |
| 6 | DIL SPE | EIA buffer 50 ml | phosphate buffered saline with casein from bovine milk and detergent (Tween-20), contains 0,1% phenol as preservative and blue dye | 1 | pcs | blue | until exp.date |
| 7 | SUBS TMB | Substrate solution, 11 ml | ready-to-use single-component tetramethylbenzidine (TMB) solution. | 1 | pcs | colourless | until exp.date |
| 8 | BUF WASH 21X | Washing solution concentrate 21x, 22 ml | aqueous solution of sodium chloride and detergent (Tween 20), contains proClin300 as a preservative | 1 | pcs | colourless | Concentrate – until exp.date Diluted washing solution – 1 month at 2...+8 °C or 5 days at RT |
| 9 | STOP | Stop solution, 11 ml | 5,0% vol/vol solution of sulphuric acid | 1 | pcs | colourless | until exp.date |
| 10 | N003 | Plate sealing tape | | 2 | pcs | | N/A |
| 11 | K250I | Instruction CRP EIA | | 1 | pcs | | N/A |
| 12 | K250Q | QC data sheet CRP EIA | | 1 | pcs | | N/A |

**5.2.** Equipment and material required but not provided

- Distilled or deionized water;
- Automatic or semiautomatic multichannel micropipettes, 100–250 µl, is useful but not essential;
- Calibrated micropipettes with variable volume, range volume 5–250 µl;
- Dry thermostat for 37 °C ±0.1 °C
- Calibrated microplate photometer with 450 nm wavelength and OD measuring range 0–3.0

**5.3.** Storage and stability of the Kit

Store the whole kit at +2…+8 °C upon receipt until the expiration date.

After opening the pouch keep unused microtiter wells TIGHTLY SEALED BY ADHESIVE TAPE (INCLUDED) to minimize exposure to moisture.

## 6. SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE

This kit is intended for use with serum or plasma (ACD- or heparinized). Grossly hemolytic, lipemic, or turbid samples should be avoided.

Specimens may be stored for up to 48 hours at +2...+8 °C before testing. For a longer storage, the specimens should be frozen at -20 °C or lower. Repeated freezing/thawing should be avoided.

## 7. TEST PROCEDURE

**7.1.** Reagent Preparation

- All reagents (including unsealed microstrips) should be allowed to reach room temperature (+18…+25 °C) before use.
- All reagents should be mixed by gentle inversion or vortexing prior to use. Avoid foam formation.
- It is recommended to spin down shortly the tubes with calibrators on low speed centrifuge.
- Prepare washing solution from the concentrate BUF WASH 21X by 21 dilutions in distilled water.

**7.2.** Procedural Note:

It is recommended that pipetting of all calibrators and samples should be completed within 3 minutes.

**7.3.** Assay flowchart

See the example of calibration graphic in Quality Control data sheet.

**7.4.** Assay procedure

| | |
|---|---|
| 1 | Put the desired number of microstrips into the frame; allocate 14 wells for the calibrators CAL 1–6 and control samples CONTROL and two wells for each unknown sample. DO NOT REMOVE ADHESIVE SEALING TAPE FROM UNUSED STRIPS. |
| 2 | Dilute all samples using buffer DIL SPE (EIA buffer) 101 fold. Do not dilute control sample and calibrators. |
| 3 | If suggested analyte concentration in the sample exceeds the highest calibrator, additionally dilute this sample accordingly, using DIL SPE (EIA buffer). Use of other buffers or reagents for sample dilution may lead to incorrect measurement. |
| 4 | Pipet 100 µl of red EIA buffer into each well. |
| 5 | Pipet 25 µl of calibrators CAL 1–6, control samples CONTROL and unknown samples into the wells.<br>Cover the wells by plate adhesive tape (included into the kit). |
| 6 | Incubate 30 minutes at 37 °C . |
| 7 | Prepare washing solution by 21x dilution of washing solution concentrate BUF WASH 21X by distilled water. Minimal quantity of washing solution should be 250 µl per well. Wash strips 3 times |
| 8 | Dispense 100 µl of CONJ HRP into the wells. Cover the wells by plate adhesive tape. |
| 9 | Incubate 30 minutes at 37 °C . |
| 10 | Wash the strips 5 times. |
| 11 | Dispense 100 µl of SUBS TMB into the wells |
| 12 | Incubate 10–20 minutes at +18...+25 °C |
| 13 | Dispense 100 µl of STOP into the wells. |
| 14 | Measure OD (optical density) at 450 nm. |
| 15 | Set photometer blank on first calibrator |
| 16 | Apply point-by-point method for data reduction. |

**7.5.** Sample processing

| Material type | Notes on material collection, storage and handling | Sample dilution example | red EIA buffer into the well, µl | Sample into the well, µl | Calculation factor |
|---|---|---|---|---|---|
| blood serum or plasma | Grossly hemolytic, lipemic, or turbid samples should be avoided and should be treated by centrifugation before testing. | 5 µl of sample + 500 µl of diluent | 100 | 25 | 1 |

## 8. QUALITY CONTROL

It is recommended to use control samples according to state and federal regulations. The use of control samples is advised to assure the day to day validity of results.

The test must be performed exactly as per the manufacturer's instructions for use. Moreover the user must strictly adhere to the rules of GLP (Good Laboratory Practice) or other applicable federal, state, and local standards and/or laws. This is especially relevant for the use of control reagents. It is important to always include, within the test procedure, a sufficient number of controls for validating the accuracy and precision of the test.

The test results are valid only if all controls are within the specified ranges and if all other test parameters are also within the given assay specifications.

## 9. CALCULATION OF RESULTS

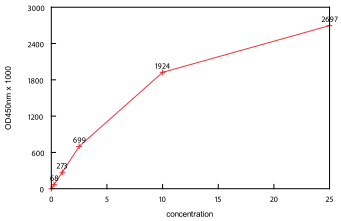
**9.1.** Calculate the mean absorbance values (OD450) for each pair of calibrators and samples.

**9.2.** Plot a calibration curve on graph paper: OD versus C-reactive protein concentration.

**9.3.** Determine the corresponding concentration of C-reactive protein in unknown samples from the calibration curve. Manual or computerized data reduction is applicable on this stage. Point-by-point or linear data reduction is recommended due to non-linear shape of curve.

**9.4.** Below is presented a typical example of a standard curve with the XEMA Co. Not for calculations!

| Calibrators | Value | Absorbance Units (450 nm) |
|---|---|---|
| CAL 1 | 0 mg/l | 0.05 |
| CAL 2 | 0.25 mg/l | 0.11 |
| CAL 3 | 1 mg/l | 0.32 |
| CAL 4 | 2.5 mg/l | 0.74 |
| CAL 5 | 10 mg/l | 1.97 |
| CAL 6 | 25 mg/l | 2.74 |




## 10. EXPECTED VALUES

Therapeutical consequences should not be based on results of IVD methods alone – all available clinical and laboratory findings should be used by a physician to elaborate therapeutically measures. Each laboratory should establish its own normal range for CRP. Based on data obtained by XEMA, the following normal range is recommended (see below). NOTE: the patients that have received murine monoclonal antibodies for radioimaging or immunotherapy develop high titered anti-mouse antibodies (HAMA). The presence of these antibodies may cause false results in the present assay. Sera from HAMA positive patients should be treated with depleting adsorbents before assaying.

| Sex, age | Units, mg/l | |
|---|---|---|
| | Lower limit | Upper limit |
| Healthy donors | - | 5.0 |

## 11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

**11.1.** Analytical sensitivity

Sensitivity of the assay was assessed as being 0.05 mg/l.

**11.2.** Linearity

Linearity was checked by assaying dilution series of 5 samples with different C-reactive protein concentrations. Linearity percentages obtained ranged within 90 to 110%.

**11.3.** Recovery

Recovery was estimated by assaying 5 mixed samples with known C-reactive protein concentrations. The recovery percentages ranged from 90 to 110%.

## 12. LITERATURE

1. Steven Black, Irving Kushner, and David Samols – C-reactive Protein. J. Biol. Chem., Nov 2004; 279: 48487 – 48490.

2. V B Patel, M A Robbins, and E J Topol – C-reactive protein: a 'golden marker' for inflammation and coronary artery disease. Cleveland Clinic Journal of Medicine, Jun 2001; 68: 521 – 524.

3. Nader Rifai and Paul M. Ridker – High-Sensitivity C-Reactive Protein: A Novel and Promising Marker of Coronary Heart Disease. Clin. Chem., Mar 2001; 47: 403–411.