

НАБІР РЕАГЕНТІВ

С-РЕАКТИВНИЙ БІЛОК ELISA

CRP ELISA

Каталог. №: **EIA-1952**

Кількість : **96**

Дата випуску інструкції: **04-2019**

Версія **12.0**



Основою при проведенні аналізу є оригінал інструкції англійською мовою, вкладеної в набір. Номер і дата версії оригіналу та перекладу інструкції повинні співпадати.

1. ПРИЗНАЧЕННЯ

С-реактивний білок (СРБ) є білком гострої фази, який виробляється виключно в печінці. Інтерлейкін-6 є медіатором для синтезу гепатоцитами СРБ, пентаметра приблизно 120.000 Дальтон. СРБ присутній у сироватці нормальних осіб у концентраціях до 5 мг/л. Білок продукується плодом і новонародженим і не проходить через плацентарний бар'єр, тому його можна використовувати для раннього виявлення неонатального сепсису. Через явище лихоманки, кількість лейкоцитів і швидкість осідання еритроцитів (ШОЕ) часто вводять в оману, дослідники і клініцисти віддають перевагу кількісному визначенню СРБ як маркера гострого запалення і некрозу тканин. Протягом 6 годин після гострої запальної проблеми рівень СРБ починає підвищуватися.

Концентрація СРБ у сироватці значно зростає у випадках як інфекційного, так і неінфекційного запалення, пошкодження тканин і некрозу, а також при наявності злоякісних пухлин. СРБ присутній в активних стадіях запальних розладів, таких як ревматоїдний артрит, анкілозуючий спондиліт, синдром Рейтера, псоріатична артропатія, системний червоний вовчак, поліартрит, виразковий коліт і хвороба Крона.

Травми, що викликають розпад тканин і некроз, пов'язані з підвищенням СРБ у сироватці, який спостерігається при термічних опіках, великих операціях і інфаркті міокарда.

Широко поширені злоякісні захворювання з карциномою легенів, шлунку, товстої кишки, молочної залози, передміхурової залози та підшлункової залози, хвороба Ходжкіна, неходжкінська лімфома і лімфосаркома призведуть до високих рівнів СРБ, що виникають в результаті пошкодження тканин внаслідок пухлинних клітин.

Рівень СРБ різко зростає після мікробних інфекцій, і це може бути особливо корисним для діагностики та моніторингу бактеріальної септицемії у новонароджених та інших пацієнтів з ослабленим імунітетом. У дітей СРБ корисний для диференціальної діагностики бактеріального та вірусного менінгіту.

Оскільки, біологічний період півжиття цього білка становить всього 24 години, СРП точно паралельно активує процес запалення і концентрація СРБ знижується набагато швидше, ніж ШОЕ або будь-який інший параметр гострої фази, що особливо корисно для моніторингу відповідного лікування бактеріальних захворювань.

Вимірювання С-реактивного білка протягом раннього і пізнього після трансплантаційного періоду трансплантації кісткового мозку та органів, особливо корисно при лікуванні інфекцій, що заважають цим імунодепресивним пацієнтам.

CRP ELISA - це імуноферментний аналіз для кількісного визначення С-реактивного білка в сироватці людини і плазмі.

2. ПРИНЦИП ТЕСТУ

Мікротитрові стрипи покриті анти-СРБ антитілом, інкубують з розведеними стандартними сироватки і зразками пацієнтів. Під час цієї стадії інкубації СРБ спеціально зв'язується з лунками. Після видалення незв'язаних білків сироватки методом промивання, комплекс антиген-антитіло в кожній лунці виявляють за допомогою специфічних кон'югованих з пероксидазою антитіл.

Після видалення незв'язаного кон'югату смужки інкубують з розчином хромогену, що містить тетраметилбензидин і пероксид водню: синій колір розвивається пропорційно кількості імунокомплексу, пов'язаного з лунками смужок. Ферментативну реакцію зупиняють додаванням 0,5 М H₂SO₄ і визначають значення поглинання при 450 нм.

Стандартну криву отримують нанесенням значень поглинання проти відповідних стандартних значень. Концентрація СРБ у зразках пацієнтів визначається інтерполяцією зі стандартної кривої.

3. РЕАГЕНТИ

1. **Покриті мікротитрові смужки – МТР-** 12 x 8 – лункові смужки покриті моноклональними антитілами до людського СРБ.
2. **Стандартна сироватка - CAL N – 5 флаконів,**

кожна містить 1/10 попередньо розведені стандартні розчини СРБ (0.2 мл):

N має наступні значення:

N=0: мкг/мл; N=5: 5 мкг/мл; N=25: 25мкг/мл; N=50: 50 мкг/мл; N=100: 100мкг/мл.

Відкалібрована відповідно до NIBSC 1-ий Міжнародний Стандарт, 85/506.

Містить 0.09% NaN₃.

3. **Кон'югат – CONJ** – 1 флакон,
Містить пероксидазу кон'югованих моноклональних антитіл до антилюдського СРБ (12 мл).
Містить анти-мікробні агенти та інертний червоний барвник.
4. **Буфер для розведення зразків DIL 5x** - 1 флакон,
містить 40 мл розведеного буферу 5x концентрованого.
Містить 0.09% NaN₃ та інертний зелений барвник.
5. **Промивний розчин - WASH 20x** - 1 флакон
Містить 50 мл 20x концентрованого фосфатно-буферного промивного розчину.
6. **Розчин хромогену - CHROM** 1 флакон,
Містить 15 мл розчину, який містить H₂O₂ та тетраметилбензидин.
7. **Стоп-розчин – STOP** -1 флакон,
Містить 12 мл 0.5 М H₂SO₄.

Контролі можна замовляти окремо:

REF EIA-1952-CTRL

Рівень 1 та 2; 0.5 мл на рівень (ліофілізований)

4. НЕОБХІДНІ МАТЕРІАЛИ, ЯКІ НЕ ПОСТАЧАЮТЬСЯ

1. Мікротитрові прецизійні та стандартні лабораторні піпетки.
2. Чистий стандартний лабораторний об'ємний посуд.
3. Чисті скляні та пластикові трубки для розбавлення зразків.
4. мікропланшетний зчитувач здатний вимірювати поглинання при 450 нм.

5. ПОПЕРЕДЖЕННЯ ТА ЗАСТЕРЕЖЕННЯ ДЛЯ КОРИСТУВАЧІВ

1. Тільки для діагностики in vitro.
2. Компоненти людської крові, використані у приготуванні стандартних сироваток, були випробувані і виявлені, що вони не реагують на поверхневий антиген гепатиту В і ВІЛ І. Оскільки, жоден відомий спосіб ніколи не може забезпечити повну гарантію того, що продукти, отримані з крові людини, не передають гепатит або інші вірусні інфекції, рекомендується обробляти ці стандартні сироватки так само, як і потенційно інфекційний матеріал. Утилізуйте зразки пацієнтів і всі матеріали, які використовуються для проведення цього випробування, так ніби вони містять інфекційні агенти.
3. Не змішуйте реагенти або покриті мікротитрові стрипи з наборів з різними номерами лотів.
4. Розчин хромогену містить небезпечний інгредієнт N-Метил-2-пірролідон при концентрації >0.3%.

Вона класифікується як репродуктивна токсична категорія 1В.

Застосовуються наступні інструкції щодо безпеки:

N360D: може завдати шкоди ще ненародженій дитині.

Застосовуються наступні запобіжні заходи:

P280:Одягайте захисні рукавички/захисний одяг/захист для очей/захист для обличчя.

P308+P313: Якщо перебували під впливом або занепокоєні з приводу перебування: зверніться до лікаря.

5. Деякі компоненти набору містять азид натрію в якості консерванту. Для того, щоб запобігти утворенню потенційно вибухових азидів металу, ретельно промийте водопровід лабораторії після утилізації цих розчинів.

6. УМОВИ ЗБЕРІГАННЯ

2 °C - 8°C

1. Зберігайте мікротитрові смужки в оригінальній упаковці з осушувачем доки всі смужки не будуть використані.
2. Ніколи не використовуйте компоненти набору після закінчення терміну придатності.

7. ЗАБІР І ПІДГОТОВКА ЗРАЗКА

В цьому аналізі можна використовувати людську сироватку і плазму.

Щоб уникнути гемолізу, не дозволяйте сироватці згорнутися. Ліпемічні та / або гемолізовані зразки можуть привести до помилкових результатів. Перенесіть сироватку в чисту трубку для зберігання.

Зразки можна зберігати при температурі 2°C -8°C протягом кількох днів, або їх можна зберігати замороженими довший період часу. Уникайте повторного заморожування і розморожування зразків.

8. ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

8.1 Загальні зауваження

- Щоб уникнути перехресного забруднення під час внесення зразка, використовуйте окремий одноразовий наконечник.
- Перед використанням всі реагенти повинні бути кімнатної температури. Всі реагенти потрібно перемішати без утворення піни.
- Після початку аналізу, всі етапи повинні бути завершені без перерви.
- Якщо використовується Промивач ІФА, для отримання оптимальних результатів може знадобитися адаптація етапу промивання.

8.2 Ресуспендування реагентів

Промивний розчин

Розведіть 50 мл концентрованого Промивного розчину (5) до 1000 мл дистильованою водою.

Ресуспендований осад можна зберігати принаймні 1 місяць або до тих пір, поки розчин залишається прозорим.

Зберігати при температурі 2 °С - 8 °С.

При вищій температурі, концентрований Промивний розчин (5) може бути мутним, але це не впливає на його продуктивність. Після розведення розчин буде прозорим.

Буфер для розведення зразків

Розведіть 40 мл концентрованого Буфера для розбавлення зразків (4) до 200 мл з дистильованою водою.

Розбавлений розчин можна зберігати протягом 3 місяців або довше, якщо розчин залишається прозорим.

Зберігати при температурі 2 °С - 8 °С.

8.3 Процедура аналізу

- Стандартні попередньо розбавлені сироватки з розрахунком 10x (2) розбавляють 1: 100 наступним чином: піпетуйте 10 мкл кожного калібратора у окрему скляну або пластикову трубку для розведень. Додайте 990 мкл розведеного буфера для розведення зразків (4) та обережно перемішайте.
- Зразки пацієнтів розводять 1:1000 двома послідовними етапами: піпетуйте по 10 мкл кожного зразка пацієнта в окремі скляні або пластикові пробірки для розведення і додайте 990 мкл розведеного буфера для розведення зразків (4). Ретельно перемішайте. Додайте 450 мкл розведеного буфера для розведення зразків до 50 мкл цих 100x попередньо розбавлених зразків. Ретельно перемішайте.
Попередження: Не зберігайте розведені зразки більше 8 годин.
- Піпетуйте 100 мкл розведених калібраторів та зразків у кожну пару суміжних лунок (1).
- Інкубуйте покриті мікротитрові смужки протягом 30±2 хв при кімнатній температурі.
- Промийте мікротитрові смужки три рази Промивним Розчином. Це можна зробити за допомогою відповідного мікротитрового планшетного промивача або витрусити вміст смужок, зануривши їх у миючий розчин. Під час третього етапу, промивний розчин залишають у смужках протягом 2 - 3 хв. Змініуйте промивний розчин для кожного циклу промивання. Нарешті спорожніть мікротитрові смужки і видаліть зайву рідину, промокаючи інвертовані смужки на папері адсорбенту.
- Додайте 100 мкл розчину кон'югату (3) та інкубуйте покриті мікротитрові смужки протягом 30±2 хв при кімнатній температурі.
- Повторіть процедуру промивання як описано у пункті 5.
- Додайте 100 мкл розчину хромогену (6) у кожну лунку.
- Інкубуйте протягом 10±2 хв при кімнатній температурі. Уникайте впливу світла на цьому етапі.
- Додайте 50 мкл Стоп розчину (7) у кожну лунку.
- Визначіть абсорбцію кожної лунки при 450 нм протягом 30 хв після додавання кислоти.

9. РЕЗУЛЬТАТИ

Середнє значення абсорбції кожного калібратора наносять на графік з відповідним значенням СРБ і конструюють найкращу калібрувальну криву (наприклад, log / linear).

Використовуйте середнє значення абсорбції кожного зразка пацієнта, отриманого у СРБ-ІФА для визначення відповідного значення шляхом простої інтерполяції з кривої.

Залежно від досвіду та / або наявності комп'ютерних можливостей можуть бути використані інші методи зменшення даних.

Типовий приклад значень ОГ :

КАЛІБРАТОР мкг/мл	Значення ОГ
0	0.019
5	0.240
25	0.821
50	1.301
100	2.018

10. ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ

Нормальні значення

Зразки сироватки та плазми від 360 здорових бельгійських донорів крові були протестовані з СРБ ІФА (EIA-1952), і знайдено наступний розподіл рівнів СРБ:

Діапазон концентрації СРБ мкг/мл	Число донорів
≤5	328
6 - 25	31
26 - 50	1
> 50	0

Всі особи мали невелику кількість СРБ у крові. Верхня межа нормального діапазону знаходиться між 5 та 8 мкг/мл (у 343 донорів з 360 рівні СРБ становили 8 мкг/мл).

11. ХАРАКТЕРИСТИКИ ТЕСТУВАННЯ

11.1 Точність

В аналізі (n=10)	Рівень 1	Рівень 2	
Середнє (мкг/мл)	5.2	48.3	
СВ (мкг/мл)	0.27	3.3	
% КВ	5.12	6.84	
В аналізі (n=7)	Рівень 1	Рівень 2	Рівень 3
	4.3	31.0	67.2
	0.6	3.6	8.5
	14.3	11.6	12.7

11.2 Специфічність

Перехресна-реактивність

СРБ ІФА розпізнає природний і рекомбінантний людський СРБ.

Не було виявлено перехресної реактивності з наступними факторами, приготовленими при концентрації 1 мкг / мл у розбавленому зразку: людський пентраксин 2; людський пентраксин 3; людський мономерний СРБ; шурячий СРБ.

11.3 Аналітична чутливість

Мінімальна концентрація виявлення становить <1 мкг/мл.

12. ВАЛІДНІСТЬ ТЕСТУ

Для виконання кожного запуску необхідно виконати наведені нижче специфікації:

ОГ значення для нульового калібратора: <0.080

ОГ значення для вищого значення калібратора: >1.000

Якщо не дотримано хоча б однієї специфікації, потрібно повторити запуск тесту.

13. ВИЯВЛЕННЯ ТА УСУНЕННЯ НЕСПРАВНОСТЕЙ

У разі високого фонового сигналу, промивання було недостатнім. Повторіть випробування з більш енергійним промиванням (збільшене число циклів, час витримки).



ВИРОБНИК

ДРГ Інструментс ГмбХ
вул. Фраунберг 18, 35039
м. Марбург, Німеччина
Тел: +49(0)64 21/170 00
Факс: +49(0)64 21/17 00 50
www.drg-diagnostics.de
e-mail: drq@drq-diagnostics.de



УПОВНОВАЖЕНИЙ ПРЕДСТАВНИК

ТОВ «ДІАМЕБ ТРЕЙД»
вул. Симона Петлюри, 25
м. Івано-Франківськ, 76014
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.ua

