

НАБІР РЕАГЕНТІВ

СРБ (С-РЕАКТИВНИЙ БІЛОК) ВИСОКОЧУТЛИВИЙ ELISA

CRP HS ELISA

Каталог. №: **EIA-3954**

Дата випуску інструкції: **2019/04**
Версія **7.0**



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

Для діагностичного використання in vitro

Зберігати при температурі 2-8 °С.

1 ПРИЗНАЧЕННЯ

Набір призначений для кількісного визначення С-реактивного білка (СРБ) в сироватці людини.

Покрашена чутливість вимірювання СРБ використовується для визначення та оцінки інфекції, пошкодження тканин, запальних і асоційованих захворювань.

2 КОРОТКИЙ ОПИС І ПОЯСНЕННЯ ТЕСТУ

С-реактивний білок (СРБ) був ідентифікований Тилетом і Францизом (1930) в плазмі пацієнта з пневмонією і був названий так через його здатність зв'язувати і відокремлювати С-полісахарид пневмокока. Це альфа глобулін з молекулярною вагою близько 110000-140000 дальтон, який складається з п'яти ідентичних субодиниць, які нековалентно пов'язані як циклічний полімер. СРБ синтезується в печінці і зазвичай присутній як трейсер сироватки або плазми з рівнями менше, ніж 0,3 мг/дл. Його фізіологічні ролі чисельні і різноманітні, але деякі його функції такі ж, що і у імуноглобулінів, СРБ також виконує захисну функцію.

СРБ є одним з протеїнів гострої фази, рівні якого в сироватці або плазмі зростають під час загальної, неспецифічної реакції на різні хвороби. Сюди входять інфекції грам-позитивних і грам-негативних організмів, гостра фаза ревматоїдних артритів, абдомінальні абсцеси і запалення жовчної протоки. СРБ також знайдено у пацієнтів з синдромом Guillain-Barre і склерозом, деякими вірусними інфекціями, туберкульозом, гострим інфекційним гепатитом та іншими некротичними і запальними хворобами, пацієнтів після опіків і операцій.

Хоча визначення рівня СРБ в сироватці не є специфічним для яких-небудь окремих хвороб, це визначення використовується як індикатор запальних захворювань. Рівні СРБ зростають в сироватці або плазмі протягом 24-48 годин після гострого пошкодження тканин, досягаючи свого піку (приблизно 1000х початкового рівня) і зменшуються з припиненням запалення або травми. Ріст концентрації СРБ в сироватці або плазмі людини може тривати кілька днів до повернення на нормальні рівні.

Визначення СРБ є більш надійним і чутливим показником запальних процесів, ніж ступінь осадження еритроцитів, що може підпадати під вплив фізіологічних змін, незв'язаних з запальними процесами. Сучасні методи тестування, включаючи латексну аглютинацію, нефелометрію і радіальну імунодифузію (RID), мають основні недоліки, такі як низька чутливість, тоді як тест ELISA показує високу чутливість і специфічність.

Так як підвищені рівні СРБ асоціюються з патологічними змінами, аналіз СРБ дає інформацію для діагнозу, терапії та моніторингу запальних процесів і пов'язаних хвороб. Крім того, вимірювання СРБ за допомогою аналізів з високою чутливістю може додати до прогностичного значення інших серцевих маркерів (міоглобін, креатинкінази-МВ, тропоніну I і T), які використовуються для оцінки ризику розвитку серцево-судинних хвороб і хвороб периферичних судин. Оскільки збільшення значень СРБ є неспецифічними, вони не повинні бути інтерпретовані без повної оцінки історії хвороби пацієнта, а також вимірювання CRP повинні бути порівняні з попередніми значеннями.

3 ПРИНЦИП АНАЛІЗУ

Справжній набір є твердофазним імуносорбентним аналізом із застосуванням фіксованих ферментів. В аналізі використовується унікальне моноклональне антитіло спрямоване проти окремої антигенної детермінанти на молекулі СРБ. Це мишаче моноклональне анти-СРБ антитіло використовується для іммобілізації на твердій фазі (на мікропланшетних лунках). Козяче анти-СРБ антитіло присутнє в кон'югаті розчину антитіло-фермент (пероксидаза хрому). Досліджуваний зразок одночасно реагує з двома антитілами, в результаті молекули СРБ виявляються в «сандвічі» між твердою фазою і фермент-пов'язаними антитілами. Після 45 хвилинної інкубації при кімнатній температурі лунки

промиваються для видалення незв'язаних мічених антитіл. Додається ТМБ реагент і проводиться інкубація протягом 20 хвилин, в результаті утворюється блакитний колір. Розвиток кольору зупиняється додаванням стоп-розчину, що змінює колір на жовтий.

Концентрація СРБ прямо пропорційна інтенсивності кольору в зразку. Абсорбція вимірюється спектрофотометрично при 450 нм.

4 РЕАГЕНТИ І МАТЕРІАЛИ, ЩО ПОСТАЧАЮТЬСЯ

1. **Лунки, покриті антитілами** (1 планшет, 96 лунок)
Мікротитрові лунки, покриті мишачими моноклональними антитілами до СРБ.
2. **Набір референтних стандартів** (1.0 мл/фл)
Містить 0-0.005-0.010-0.025-0.050 і 0.100 мг/л СРБ в розчині фосфатного буфера з консервантами; готові до використання.
3. **Розчинник зразків в СРБ** (50 мл/фл)
Містить розчин фосфатний буфер-BSA з консервантами.
4. Реагент **Ферментного Кон'югату СРБ** (12 мл/фл)
Містить козячий анти-СРБ, кон'югований з пероксидазою хрому з консервантами
5. **Реагент ТМБ** (11 мл/пляшка)
Містить одно-кроковий розчин ТМБ.
6. **Стоп-розчин** (1 пляшка, 11 мл/пляшка)
Містить розбавлену соляну кислоту 1N HCl.

5 НЕОБХІДНІ МАТЕРІАЛИ, ЯКІ НЕ ПОСТАЧАЮТЬСЯ З НАБОРОМ

1. Точні піпетки: 5 мкл, 10мкл, 50 мкл, 100 мкл і 1,0 мл
2. Одноразові наконечники до піпетки
3. Мікропланшетний рідер на 450 нм.
4. Вортекс або еквівалент
5. Абсорбуючий папір
6. Графічний папір

6 ПОПЕРЕДЖЕННЯ І ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

1. **ОБЕРЕЖНО:** Цей набір містить матеріал людського походження. Вихідний матеріал, використаний для виробництва цього компонента, дав негативні результати на HBsAg, ВІЛ 1/2 та HCV методами, затвердженими FDA. Однак жоден метод не може повністю забезпечити відсутність цих агентів. Тому всі препарати крові людини, включаючи зразки сироватки, слід вважати потенційно інфекційними. З ними слід поводитися так, як визначено відповідним національним керівництвом з безпеки біологічної небезпеки.
2. Уникайте контакту зі 1N HCl. Це може викликати подразнення шкіри та опік. При попаданні на шкіру, промийте водою і зверніться за медичною допомогою.
3. Не використовуйте реагенти після закінчення терміну придатності і не змішуйте компоненти з різними номерами лотів.
4. Негайно закрийте кришки реагентів. Не міняти кришечки місцями.
5. Не піпетувати ротом.
6. Для діагностики in vitro.

7 УМОВИ ЗБЕРІГАННЯ

1. Зберігайте нерозкриті набори при температурі 2-8 °С до закінчення терміну придатності, зазначеного на ярлику. Дивитися етикетку на упаковці щодо дати закінчення терміну дії.
2. Зберігайте мікротитровий планшет в герметично закритому пакеті з осушувачем для мінімізації попадання повітря.

8 ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ

1. Всі реагенти слід привести до кімнатної температури (18-25 °С) перед використанням.
2. **Сироватка пацієнта повинна бути розбавлена 100-кратно перед використанням. Приготуйте серію маленьких пробірок (напр. 1.5 мл мікроцентрифужних пробірок) і змішайте 5 мкл сироватки з 495 мкл (0,495 мл) Розчинника Зразка. НЕ РОЗБАВЛЯТИ СТАНДАРТИ.**
3. Зразки з очікуваними СРБ концентраціями вище, ніж 10 мг/л, можуть бути оцінені кількісно подальшим розведенням (10-кратно) 100-кратно розведеного розчину Розчинником Зразків (наприклад, 10 мкл 100-кратно розведеного зразка з 90 мкл Розчинника Зразка).

9 ІНСТРУМЕНТАРІЙ

Для вимірювання абсорбції необхідний мікропланшетний рідер з шириною смуги 10 нм або менше і оптичною щільністю в межах від 0 до 3 ОЩ або вище при довжині хвилі 450 нм.

10ЗБІР І ПРИГОТУВАННЯ ЗРАЗКІВ

1. У цьому аналізі використовуються зразки СИРОВАТКИ.
2. Зразки необхідно зібрати, використовуючи стандартну техніку венепункції. Видаліть сироватку від коагульованих клітин *протягом 60 хвилин* після забору.

- Зразки, які не можуть бути проаналізовані протягом 24 годин після забору, необхідно заморозити до -20°C або нижче. Вони залишаються стабільними 6 місяців.
- Уникайте високо гемолізованих (яскраво червоні), ліпемічних (молочних) або каламутних зразків (після центрифугування).
- Заоб'ягайте повторним циклом заморожування/відтавання зразків. НЕ зберігайте в холодильнику з системою само розморожування. Зразки, які після заморожування є мутними або містять частинки, повинні бути центрифуговані.

11 ПРОЦЕДУРНІ ЗАУВАЖЕННЯ

- Рекомендоване піпетування (одно- або багатоканальне): Піпетування всіх зразків, стандартів і контролів повинно проводитися протягом 3 хвилин.
- Всі стандарти, зразки і контролі повинні тестуватися в дублікаті, щоб всі умови тестування були ідентичні.
- Рекомендується, щоб всі лунки були зчитані протягом 15 хвилин після додавання стоп-розчину.

12 ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

- Сироватка пацієнтів і контролі повинні бути розведені 100-кратно перед використанням. Див. Підготовка реагентів. НЕ РОЗБАВЛЯТИ СТАНДАРТИ.**
- Закріпіть необхідну кількість лунок в тримачі.
- У відповідні лунки внесіть по **10 мкл** стандартів СРБ, РОЗБАВЛЕНИХ зразків і РОЗБАВЛЕНИХ контролів.
- Внесіть по **100 мкл** Реагенту Ферментного Кон'югату СРБ в кожен лунку.
- Ретельно перемішайте 30 секунд. Дуже важливо домогтися повного змішування.
- Інкубуйте при кімнатній температурі ($18-25^{\circ}\text{C}$) 45 хвилин.
- Видаліть інкубаційний розчин в контейнер для відходів. Промийте лунки 5 разів деіонізованою або дистильованою водою. **НЕ ВИКОРИСТОВУЙТЕ ВОДУ З-ПІД КРАНА.**
- Різно переверніть лунки на абсорбуючий папір для видалення залишків води.
- Внесіть **100 мкл** ТМБ Розчину в кожен лунку. Обережно перемішайте 10 секунд.
- Інкубуйте 20 хвилин при кімнатній температурі.
- Зупиніть реакцію додаванням по **100 мкл** стоп-розчину в кожен лунку.
- Обережно перемішайте 30 секунд. **Важливо домогтися, щоб блакитний колір повністю змінився на жовтий.**
- Зчитайте абсорбцію мікропланшетним рідером при 450 нм протягом 15 хвилин.

13 КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Необхідно, щоб контрольні зразки аналізувались для кожної калібрувальної кривої для оцінки характеристик тесту. Контрольні матеріали повинні тестуватися повторно, щоб встановити середні значення і діапазони.

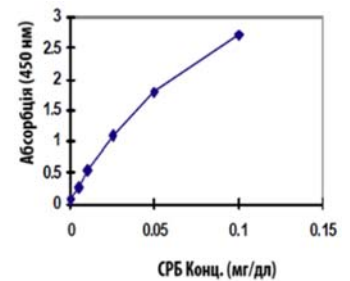
14 ОБЧИСЛЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

- Обчисліть значення середньої абсорбції ($ОШ_{450}$) для кожного набору референтних стандартів, контролів і зразків.
- Побудуйте стандартну криву, відкладаючи середню абсорбцію, отриману для кожного стандарту, проти його концентрації в мг/л на графічному папері, з абсорбцією на вертикальній осі Y і концентрацією на горизонтальній осі X.
- Використовуючи значення середньої абсорбції для кожного зразка, визначте відповідну концентрацію СРБ (мг/л) зі стандартної кривої. Залежно від досвіду і/або комп'ютерних можливостей, можуть використовуватися інші методи обробки даних.
- Отримані значення зразків пацієнтів та контрольної сироватки необхідно помножити на фактор розведення 100 для отримання результатів СРБ в мг/л.
- Зразки пацієнтів з концентрацією СРБ вище, ніж 10 мг/л, повинні бути розведені 10-кратно після початкового 100-кратного розведення (загальне розведення 1000-кратно) і кінцеві значення СРБ повинні бути помножені на 1000 для отримання результатів СРБ в мг/л.
- ПРИМІТКА:** Зразки пацієнтів з концентрацією менше, ніж 0.1 мг/л повинні інтерпретуватися як « <0.1 мг/л СРБ».

14.1 Приклад калібрувальної кривої

Результати типового стандартного тесту з абсорбцією, зчитаною при 450 нм, зазначені на осі Y проти концентрації СРБ на осі X. **ПРИМІТКА:** Ця калібрувальна крива тільки для ілюстрації і не повинна використовуватися для обчислення результатів. Кожна лабораторія повинна встановлювати власні дані і калібровану криву в кожному експерименті.

СРБ (мг/дл)	Абсорбція (450 нм)
0	0.066
0.005	0.264
0.010	0.457
0.025	1.092
0.050	1.788
0.100	2.710



15 ОБМЕЖЕННЯ ПРОЦЕДУРИ

- Надійні і відповідні результати будуть отримані при проведенні аналізу відповідно до інструкції і належної лабораторної практики.
- Тільки для професійного використання. Результати можуть використовуватися як доповнення до інших діагностичних процедур.
- Зразки сироватки сильно ліпемічні, гемолізовані або каламутні не повинні використовуватися в цьому аналізі.
- Процедура промивання вкрай важлива. Недостатнє промивання може привести до неточних результатів.
- Зразки пацієнтів можуть містити анти-мишачі антитіла (НАМА), що можуть дати фальшиво завищені результати при аналізі, що використовує моноклональні мишачі антитіла. Цей аналіз призначений для мінімізації впливу зразків, що містять НАМА. Однак, повне виключення впливу цих зразків не може бути гарантовано. Тестові результати, що суперечать клінічній картині або історії хвороби пацієнта, повинні інтерпретуватися з обережністю.
- Якщо пристрій не працює, скористайтеся альтернативною діагностичною процедурою або проконсультуйтеся з виробником.

16 ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ

Рекомендується, щоб кожна лабораторія встановлювала власні діапазони, що базуються на популяції пацієнтів. Нижче подані значення СРБ для здорових людей:

Сироватка новонароджених: 0.01 – 0.35 мг/л
Сироватка дорослих: 0.068 – 8.2 мг/л

17 РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛІЗУ

17.1 Точність

Статистичне вивчення 117 зразків сироватки людини при концентрації СРБ від 0.62 мг/л до 119.3 мг/л демонструє кореляцію з комерційним набором, що показано нижче:

Порівняння даного набору з *високочутливим* СРБ тестом Dade-Behring N дало наступні дані (n = 117):

Коефіцієнт кореляції	= 0.9594
Відхилення	= 0.8396
Перетин:	= 1.3948
Середнє	= 13.74 мг/л
Середнє по Dade	= 14.75 мг/л

17.2 Чутливість

Мінімально обумовлена концентрація СРБ при вимірюванні при 2 СВ від середнього значення нульового стандарту дорівнює 0.1 мг/л. До того ж визначили функціональну чутливість в 0.1 мг/л (як визначено між аналізами % KB < 20%).

Нижня межа C-реактивного білка високочутливого ІФА ≤ 0.1 мг/л, верхня межа = 10 мг/л СРБ.

17.3 Точність

17.3.1 Точність в аналізі

Точність в аналізі була визначена тестуванням п'яти різних сироваток в одному аналізі.

Варіативність в аналізі показана нижче у таблиці:

Зразок сироватки	1	2	3	4	5
#Повтори	22	22	22	22	20
Середнє СРБ (мг/л)	0.546	0.894	2.021	3.492	17.549
СВ	0.041	0.037	0.085	0.146	0.397
KB (%)	7.5%	4.1%	4.2%	4.1%	2.3%

17.3.2 Точність між аналізами

Точність між аналізами була визначена шляхом вимірювання п'яти різних зразків сироватки при індивідуальних калібруваннях тестів.

Варіативність між аналізами показана нижче:

Зразок сироватки	1	2	3	4	5
#Повтори	20	20	20	20	20
Середнє СРБ (мг/л)	0.490	0.890	1.925	3.529	17.435
СВ	0.020	0.023	0.078	0.114	0.438
КВ (%)	4.1%	2.5%	4.1%	3.2%	2.5%

17.4 Дослідження лінійності і відновлення

17.4.1 Відновлення

Різні зразки сироватки з відомим рівнем СРБ порівняли і проаналізували в дублікаті. Середнє значення відновлення становить 100.4%.

Номер пари	Очікувані СРБ (мг/л)	Отримані СРБ (мг/л)	% Відновлення
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%

17.4.2 Лінійність

Зразки п'яти пацієнтів серійно були розбавлені для визначення лінійності. Середнє відновлення було 99.4%.

#	Розведення	Очік. Конц. (мг/дл)	Спост. Конц. (мг/дл)	% очікуваних
1.	Нерозведені	-----	-----	-----
	1:2	-----	-----	-----
	1:4	5.150	4.900	95.1%
	1:8	2.575	2.632	102.2%
	1:16	1.288	1.303	101.1%
	1:32	0.644	0.594	92.2%
	1:64	0.320	0.340	106.3%
	1:128	0.160	0.170	106.2%
	1:256	0.080	0.073	91.3%
Середнє значення = 99.2%				
2.	Нерозведені	-----	-----	-----
	1:2	-----	-----	-----
	1:4	-----	-----	-----
	1:8	6.691	6.625	93.4%
	1:16	3.346	3.338	99.8%
	1:32	1.672	1.600	95.7%
	1:64	0.836	0.818	97.8%
	1:128	0.418	0.441	105.5%
	1:256	0.209	0.224	107.2%
1:512	0.105	0.109	103.8%	
Середнє значення = 100.5%				
3.	Нерозведені	-----	-----	-----
	1:2	-----	-----	-----
	1:4	6.484	6.578	101.4%
	1:8	3.242	3.325	102.5%
	1:16	1.621	1.613	99.5%
	1:32	0.811	0.788	97.0%
	1:64	0.405	0.372	91.9%
	1:128	0.203	0.210	103.4%
	Середнє значення = 99.3%			
4.	Нерозведені	-----	-----	-----
	1:2	-----	-----	-----
	1:4	-----	-----	-----
	1:8	6.080	6.498	106.9%
	1:16	3.040	3.336	109.7%
	1:32	1.520	1.610	105.9%
	1:64	0.760	0.761	100.1%
	1:128	0.380	0.345	90.8%
	1:256	0.190	0.176	92.6%
1:512	0.094	0.090	95.7%	
Середнє значення = 100.2%				
5.	Нерозведені	-----	-----	-----
	1:2	-----	-----	-----
	1:4	6.055	5.995	99.0%
	1:8	3.028	2.877	95.0%
	1:16	1.514	1.413	93.3%
	1:32	0.757	0.695	91.8%
	1:64	0.378	0.394	104.2%
	1:128	0.189	0.178	94.2%
	1:256	0.094	0.102	108.5%
1:512	0.047	0.045	95.7%	
Середнє значення = 97.7%				

17.5 Специфічність

Наступні аналіти були тестовані на перехресну реактивність:

Тестований матеріал	Тестова концентрація
Білірубін	50 мг/л
	100 мг/л
	230 мг/л
Гемоглобін	12 г/л
	24 г/л
	36 г/л
Тригліцериди	2.5 г/л
	5.0 г/л
	7.5 г/л
IgG людини	5 г/л
	10 г/л
	25 г/л

ВИКОРИСТАНІ СИМВОЛИ

Символ	Означення
	Європейська відповідність*
	Дивитися інструкцію з використання*
	Медичний пристрій для діагностики in vitro*
	Каталоговий номер*
	Номер партії*
	Достатньо для <n> тестів*
	Температурна межа*
	Використати до*
	Виробник*
	Застереження*
	Тільки для дослідження
Distributed by	Поширено
Content	Вміст
Volume/No.	Об'єм/ номер



ВИРОБНИК

ДРГ Інструментс ГмБХ
вул. Фраунберг 18, 35039
м. Марбург, Німеччина
Тел: +49(0)64 21/170 00
Факс: +49(0)64 21/170 050
www.drq-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

