

# НАБОР ИФА ДЛЯ ВЫСОКОЧУВСТВИТЕЛЬНОГО КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ С-РЕАКТИВНОГО БЕЛКА В ЧЕЛОВЕЧЕСКОЙ СЫВОРОТКЕ

## EIA-3954, hsCRP ELISA

Каталог. № : EIA-3954  
Количество : 96  
Производитель: DRG (Германия)

Методика от 06-06-2014  
Версия 6.0



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

### Для диагностического использования *in vitro*

#### НАЗНАЧЕНИЕ

Набор предназначен для количественного определения С-реактивного белка в сыворотке человека. Улучшенная чувствительность измерения СРБ используется для определения и оценки инфекции, повреждения тканей, воспалительных и ассоциированных заболеваний.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ И ОБЪЯСНЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

С-реактивный протеин (СРБ) был идентифицирован Тилетом и Францизом (1930) в плазме пациента с пневмонией и был назван так через его способность связывать и отделять С-полисахарид пневмококков. Это альфа глобулин с молекулярным весом около 110000-140000 дальтон, и он соединяет пять идентичных субъединиц, которые нековалентно связаны как циклический полимер. СРБ 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, СРБ также исполняет защитную функцию.

СРБ 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. СРБ также найдено в пациентов с синдромом Guilain-Barre и склерозом, центральной вирусной инфекцией, туберкулезом, острой инфекцией гепатита и другими некротическими и воспалительными болезнями, пациентов после ожогов и операций.

Определения уровня СРБ в сыворотке не специфично к каким-нибудь отдельным болезням, он используется как индикатор воспалительных болезней. Уровень СРБ 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 СРБ в сыворотке или плазме человека может держаться несколько дней до возвращения в нормальные границы.

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

#### ПРИНЦИП ИССЛЕДОВАНИЯ

Настоящий набор является твердофазный иммуносорбентным анализом с применением фиксированных ферментов. В анализе используется одно моноклональное антитело направленное против дистинктивной антигенной детерминанты на молекуле СРБ. Это мышинное моноклональное анти-СРБ антитело используется для иммобилизации на твердой фазе (на микропланшетных лунках). Козлиное анти-СРБ антитело присутствует в конъюгате раствора антитело-фермент (пероксидаза хрена). Исследуемый образец одновременно реагирует с двумя антителами, в результате молекулы СРБ оказываются в сэндвиче между твердой фазой и фермент-связанными антителами. После 45 минутной инкубации при комнатной температуре, лунки промываются для удаления несвязанных меченых антител. Добавляется ТМБ реагент и инкубируется 20 минут, в результате развивается голубой цвет. Развитие цвета останавливается добавлением стоп-раствора, что изменяет цвет на желтый. Концентрация СРБ прямо пропорциональна интенсивности цвета в образце. Абсорбция измеряется спектрофотометрически при 450 нм.

#### РЕАГЕНТЫ И ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

- Лунки, покрытые антителами (1 планшет, 96 лунок)  
Микротитрационные лунки, покрытые мышинными моноклональными антителами к СРБ.
- Набор референтных стандартов (1,0 мг/фл)  
Содержит 0, 0,005, 0,010, 0,025, 0,050 и 0,100 мг/л СРБ в растворе фосфатного буфера-БСА с консервантами; готовы к использованию.
- Разбавитель образцов в СРБ (50 мг/фл)  
Содержит раствор фосфатный буфер-БСА с консервантами.
- Реагент ферментного конъюгата (12 мг/фл)  
Содержит козлиное анти-СРБ, конъюгированное с пероксидазой хрена с консервантами
- Раствор ТМБ (11 мг/бут.)  
Содержит раствор ТМБ.
- Стоп-раствор (11 мг/бут.)  
Содержит разбавленную соляную кислоту 1N HCl.

#### НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

- Точные пипетки: 5, 10, 50, 100 мкл и 1,0 мл.
- Наконечники к пипеткам.
- Микропланшетный ридер на 450 нм.
- Вортекс или эквивалент.
- Абсорбирующая бумага.
- Графическая бумага.

#### ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- Все компоненты набора, содержащие человеческий биоматериал, прошли испытания и признаны безопасными в отношении Гепатита В, С, поверхностного антигена ВИЧ 1 и 2. Тем не менее, к ним стоит относиться как к потенциально заразным и быть предельно осторожными при работе с этими реагентами.
- Избегайте контакта со стоп-раствором. Это может вызвать ожог. При попадании на кожу, промойте водой и обратитесь за медицинской помощью.
- Не используйте реагенты после окончания срока пригодности и не смешивайте компоненты с разных лотов.
- Немедленно закрывайте крышки реагентов.
- Для внесения реагентов использовать соответствующее устройство. Не распыляйте ртом.
- Для диагностического использования *in vitro*.

#### УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ

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

#### ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

- Все реагенты следует привести к комнатной температуре (18-25 °C) перед использованием.
- Сыворотка пациента должна быть разбавлена 100кратно 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.**
- 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).

## 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 ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

1. В этом анализе используются образцы СЫВОРОТКИ.
2. Образцы необходимо собрать, используя стандартную технику венопункции. Удалите сыворотку от коагулированных клеток в течение 60 минут после забора.
3. Образцы, которые не могут быть проанализированы в течение 24 часов после забора, необходимо заморозить до  $-20^{\circ}\text{C}$  или ниже. Они остаются стабильны 6 месяцев.
4. Избегайте высоко 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 течение 3 минут.
2. Все стандарты, образцы и контроли должны тестироваться в дубликаты, что бы все условия тестирования были идентичные.
3. Рекомендуется, чтоб все лунки были считаны в течение 15 минут после добавления стоп-раствора.

## ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

1. **Сыворотка пациентов и контроли должны быть разбавлены 100-кратно перед использованием (см. Подготовка реагентов). НЕ РАЗБАВЛЯЙТЕ СТАНДАРТЫ.**
2. Закрепите необходимое количество лунок в держателе.
3. В соответствующие лунки внесите по 10 мкл стандартов СРБ, РАЗБАВЛЕННЫХ образцов и РАЗБАВЛЕННЫХ контролей.
4. Внесите по 100 мкл реагента ферментного конъюгата СРБ в каждую лунку.
5. Тщательно перемешайте 30 секунд. Очень важно добиться полного смешивания.
6. Инкубируйте при комнатной температуре ( $18-25^{\circ}\text{C}$ ) 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 ТМБ раствора в каждую лунку. Легко перемешайте 5 секунд.
10. Инкубируйте 20 минут при комнатной температуре.
11. Остановите реакцию добавлением по 100 мкл стоп-раствора в каждую лунку.
12. Легко перемешайте 30 секунд. **Важно добиться, чтобы голубой цвет полностью изменился на желтый.**
13. Считайте абсорбцию микропланшетным ридером при 450 нм в течение 15 минут.

## КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

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

## ВЫЧИСЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

1. Вычислите значение средней абсорбции ( $\text{ОП}_{450}$ ) 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 СРБ (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 СРБ в мг/л.
5. Образцы пациентов с концентрацией СРБ выше, чем 10 мг/л, должны быть разбавлены 10кратно после начального 100кратного разбавления (общее разбавление 1000кратно) и конечные значения СРБ должны быть умножены на 1000 для получения результатов СРБ в мг/л.

6. Примечание: Образцы пациентов с концентрацией меньше, чем 0,1 мг/л должны интерпретироваться как «<0,1 мг/л СРБ».

## ПРИМЕР КАЛИБРОВОЧНОЙ КРИВОЙ

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

| СРБ (мг/л) | Абсорбция (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              |

Пример типичной калибровочной кривой смотрите на стр. 5 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. Результаты могут использоваться как дополнение к другим диагностическим процедурам.
3. Образцы сыворотки сильно липемические, гемолизированные или мутные не должны использоваться в этом анализе.
4. Процедура промывания крайне важна. Недостаточное промывание может привести к неточным результатам.
5. Образцы пациентов могут содержать анти-мышинные антитела (НАМА), что могут дать фальшиво завышенные результаты при анализе, что использует моноклональные мышинные антитела. Этот анализ предназначен для минимизации влияния НАМА-содержащих образцов. Однако, полное исключение влияния этих образцов не может быть гарантировано. Тестовые результаты, противоречащие клинической картине или истории болезни пациента, должны интерпретироваться с осторожностью.

## ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

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

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

## РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗА

### 1. Точность

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

Сравнение данного набора с высокочувствительным анализом Даде-Беринга дало следующие данные (n=117):

Коэффициент корреляции = 0,9594  
Отклонение = 0,8396  
Пересечение: = 1,3948  
Среднее = 13,74 мг/л  
Среднее Даде = 14,75 мг/л

### 2. Чувствительность

Минимально определяемая концентрация СРБ при измерении при 2 СО от среднего значения нулевого стандарта равна 0,1 мг/л. Вдобавок определили функциональную чувствительность в 0,1 мг/л (как определено между анализами % КВ < 20%).

**Нижняя граница равна 0,1 мг/л, верхняя граница = 10 мг/л.**

### 3. Точность

Точность в анализе была определена тестированием пяти разных сывороток в одном анализе.

| Образец сыворотки  | 1     | 2     | 3     | 4     | 5      |
|--------------------|-------|-------|-------|-------|--------|
| Кол-во репликантов | 22    | 22    | 22    | 22    | 20     |
| Среднее СРБ (мг/л) | 0,546 | 0,894 | 2,021 | 3,492 | 17,549 |
| СО                 | 0,041 | 0,037 | 0,085 | 0,146 | 0,397  |
| КВ (%)             | 7,5   | 4,1   | 4,2   | 4,1   | 2,3    |

Точность между анализами была определена измерением пяти разных образцов сыворотки при индивидуальных калиброванных тестах.

| Образец сыворотки  | 1     | 2     | 3     | 4     | 5      |
|--------------------|-------|-------|-------|-------|--------|
| Кол-во репликантов | 20    | 20    | 20    | 20    | 20     |
| Среднее СРБ (мг/л) | 0,490 | 0,890 | 1,925 | 3,529 | 17,435 |
| СО                 | 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 СРБ были скомбинированы и проанализированы в дубликате. Среднее значение восстановления равно 100,4%.

| Номер пар | Ожидаемые СРБ (мг/л) | Полученные СРБ (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               |

##### б. Линейность

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

#### 5. Специфичность

Следующие анализы 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. Чорновола, 97  
г. Ивано-Франковск, 76005  
тел.: +38 (0342) 775 122  
факс: +38 (0342) 775 123  
e-mail: [info@diameb.ua](mailto:info@diameb.ua)  
[www.diameb.com](http://www.diameb.com)