

НАБІР ІФА

ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ КОНЦЕНТРАЦІЇ С-РЕАКТИВНОГО БІЛКА (CRP) ВИСОКОЧУТЛИВИЙ

3125-300, High Sensitivity CRP (hs-CRP) Test System

Каталог. №: 3125-300

Методика від 16-07-2019

Кількість : 96

Версія 4

Виробник : Monobind Inc., (США)



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

1.0 ПРИЗНАЧЕННЯ

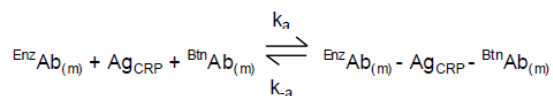
Цільове використання: Кількісне визначення концентрації С-реактивного білка (CRP) в сироватці або плазмі людини за допомогою мікропланшетного імуноферментного аналізу, колориметричного.

2.0 ВСТУП (Див. оригінал інструкції).

3.0 ПРИНЦИП МЕТОДУ

Імуноферментний аналіз (ТИП 3)

Реагенти, необхідні для імуноферментного визначення, включають в надлишку високоафінні і специфічні антитіла (фермент-мічені і біотинильовані) для специфічного розпізнавання різних епітопів, і природний антиген. У процесі аналізу на поверхні мікролунок взаємодіють сорбовані в осередках стрептавідин і додані біотинильовані антитіла до CRP. При змішуванні біотинильованих антитіл і сироватки, що містить антиген CRP, між CRP антигеном і антитілами відбувається реакція з утворенням комплексу антитіло-антиген. Послідовно біотин, зв'язаний з антитілом, взаємодіє зі Стрептавідином, нанесеним в лунки, що призводить до іммобілізації комплексу. Взаємодія ілюструється наступним рівнянням:



$\text{B}^{\text{tn}}\text{Ab}_{(m)}$ = Біотинильовані моноклональні антитіла (надлишкова кількість)

Ag_{CRP} = Нативний антиген (змінна кількість)

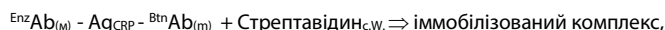
$\text{EnzAb}_{(m)}$ = ферментно-мічене антитіло (надлишкова кількість)

$\text{EnzAb}_{(m)} - \text{Ag}_{\text{CRP}} - \text{B}^{\text{tn}}\text{Ab}_{(m)}$ = Сендвіч-комплекс антиген-антитіло (змінна кількість)

k_a = Константа швидкості асоціації

k_a = Константа швидкості дисоціації

Одночасно утворюється комплекс в лунках при реакції стрептавідину і біотинильованих антитіл. Ця взаємодія ілюструється так:



Стрептавідин_{с.в.} = Стрептавідин, нанесений в лунки

Іммобілізований комплекс = Імунний комплекс, зв'язаний з поверхню лунок.

Після досягнення рівноваги фракція, пов'язана з антитілами, відділяється від не зв'язаних антигенів декантацією або промиванням. Активність ферменту у фракції пов'язаних антитіл прямо пропорційна концентрації нативного антигену. При використанні декількох стандартів з відомим значенням концентрації антигену будується калібрувальна крива, по якій обчислюється концентрація невідомих зразків.

4.0 РЕАГЕНТИ

Матеріали, що постачаються:

A. Калібратори CRP – 1 мл/флакон

6 флаконів референсного антигена CRP з концентраціями 0 (A), 0.5 (B), 2.0 (C), 5.0 (D), 15 (E) і 30 (F) мкг/мл. Зберігати при 2-8 °C. В зразки додані консерванти.

Зауваження: Калібратори на основі людської сироватки прокалібровані по Міжнародному стандарту CRM 470.

B. Ферментний реагент CRP – 13 мл/флакон

Один флакон, що містить мічені Біотином моноклональні мишачі IgG та анти-CRP HRP в буфері, барвник і консервант. Зберігати при 2-8 °C.

C. Планшет, покритий стрептавідином – 96 лунок

Один 96-лунковий мікропланшет, покритий стрептавідином і запакований в алюмінієву фольгу з осушувачем. Зберігати при 2-8 °C.

D. Розчинник сироватки – 20 мл/флакон

Один флакон, містить солі буфера і барвник. Зберігати при 2-8 °C.

E. Концентрат розчину для промивання – 20 мл/флакон

Один флакон, що містить ПАВ в фосфатному сольовому буфері. Містить консервант. Зберігати при 2-8 °C.

F. Субстрат А – 7 мл/флакон

Один флакон, що містить ТМБ в буфері. Зберігати при 2-8 °C.

G. Субстрат В – 7 мл/флакон

Один флакон, що містить перекис водню в буфері. Зберігати при 2-8 °C.

H. Стоп-розчин – 8 мл/флакон

Один флакон, що містить сильну кислоту (1N HCl). Зберігати при 2-8 °C.

I. Інструкція

Зауваження 1: Не використовуйте реагенти після закінчення терміну придатності.

Зауваження 2: Уникати впливу тепла і світла. Відкриті реагенти стабільні 60 днів при зберіганні від 2 до 8 °C. Стабільність набору і компонентів вказана на етикетці.

Зауваження 3: Всі реагенти призначені для формату одного планшета.

4.1 Необхідні матеріали, які не поставляються з набором

1. Мікродозатори на 25 та 50 мкл з точністю не гірше 1.5%.
2. Диспенсери на 100 і 350 мкл з точністю не гірше 1.5%.
3. Мікропланшетний вошер або гнучка пляшка (опційно).
4. Мікропланшетний рідер з фільтрами 450 нм і 620 нм.
5. Фільтрувальний папір для висушування мікролунок.
6. Пластикова плівка або кришка для інкубування мікропланшетів.
7. Вакуумний аспіратор для промивання (опційно).
8. Таймер.
9. Контрольні матеріали.

5.0 ЗАУВАЖЕННЯ ТА ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

**Набір призначений тільки для діагностики in-vitro
Не для внутрішнього або зовнішнього використання
на людях або тваринах**

Використовувана для виготовлення компонентів набору людська сироватка протестована методами, схваленими FDA, в яких отримані негативні результати на наявність антитіл до ВІЛ 1 та 2, HCV і поверхневого антигену гепатиту В. Однак, оскільки не існує методів, що дають повну гарантію відсутності інфекційних агентів, з реагентами слід поводитися з обережністю, як з потенційно небезпечним біоматеріалом, що рекомендується для будь-яких зразків крові згідно правил кваліфікованої лабораторної практики. Рекомендації дивіться в національних посібниках з біобезпеки або, наприклад, в "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, "2nd Edition, 1988, NHS.

Безпечна утилізація компонентів набору повинна відповідати місцевим нормативним та законодавчим вимогам.

6.0 ЗБІР І ЗБЕРІГАННЯ ЗРАЗКІВ

Зразками мають бути кров, сироватка чи плазма за типом, а також слід дотримуватися звичайних запобіжних заходів для збору зразків венепункцією. Для порівняння нормальних значень повинна бути отримана ранкова сироватка (натще). Кров слід збирати в пробірці з червоним маркуванням без добавок або антикоагулянтів (для сироватки) або вакуумні пробірки, що містять EDTA або гепарин. Дозвольте крові згорнутися. Для відділення сироватки використовуйте центрифугу.

У пацієнтів, які отримують терапію високими дозами біотину (тобто > 5 мг/добу), не слід брати зразок до принаймні 8 годин після останнього введення біотину, переважно протягом ночі, щоб забезпечити пробу натще. Зразки можуть зберігатися при 2-8 °C до 5 днів. Якщо зразки не можуть бути проаналізовані за цей час, вони можуть бути заморожені до -20 °C на період до 30 днів. Уникайте повторних циклів заморожування - відтавання. Для аналізу в дублях вимагається 0.050 мл зразка.

7.0 КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Кожна лабораторія повинна проводити аналіз контролю на рівні в низькому, нормальному та підвищеному діапазоні для моніторингу ефективності аналізу. Ці контролю повинні досліджуватися як невідомі зразки в кожній постановці аналізу. Повинні будуватися карти контролю якості для відстеження характеристик реагентів, що поставляються. Слід застосовувати прийнятні статистичні методи для встановлення відхилень. Значні відхилення від встановлених характеристик можуть свідчити про зміни в умовах експерименту або зниження якості реагентів набору. Для визначення причини змін повинні бути використані свіжі реагенти.

8.0 ПРИГОТУВАННЯ РЕАГЕНТІВ

1. Розчинник для сироватки

Розведіть розчинник для сироватки до 200 мл дистильованою або деіонізованою водою в підходящому контейнері. Зберігати при 2-8 °C.

2. Промивний буфер

Розбавте концентрат розчину для промивання до 1000 мл дистильованою або деіонізованою водою. Зберігайте при кімнатній температурі (2-30 °C) до 60 днів.

3. Робочий Субстратний розчин – стабільний протягом року

Вилийте вміст з бурштинового флакона Розчину А у прозорий флакон з написом Розчин В. Закрийте жовтим ковпачком прозорий флакон для легкої ідентифікації. Змішайте та позначте відповідно. Зберігати при температурі 2 - 8 °C.

4. Розведення зразків пацієнта (1/200)

Внесіть по 0.010 мл (10 мкл) кожного зразка в 2 мл буфера для розведення зразків. Закрийте і ретельно перемішайте на вортексі або акуратно перевертаючи пробірку. Зберігати при 2-8 °C протягом 48 годин.

Зауваження 1: Не використовуйте субстрат, якщо він придбав блакитне забарвлення.

Зауваження 2: Не використовувати забруднені реагенти, або реагенти, де спостерігається ріст бактерії.

Зауваження: КАЛІБРАТОРИ ГОТОВІ ДО ВИКОРИСТАННЯ.

9.0 ПРОТОКОЛ АНАЛІЗУ

Перед початком аналізу всі реагенти, стандарти і контролю повинні досягти кімнатної температури (20-27 °C).

****Процедуру тестування повинна виконувати кваліфікована особа або навчений фахівець****

- Відформатуйте лунки мікропланшета для кожної референсної сироватки, контролю та зразка пацієнта для аналізу в двох примірниках. Поверніть невикористані смужки в алюмінієвий пакет і закрийте його. Зберігайте при 2-8 °C.
- Додайте піпеткою в призначені лунки 0,025 мл (25 мкл) відповідної сироватки, розведеного контролю або зразка (див. Підготовка зразків пацієнта вище).
- Додайте по 100 мкл Ферментного реагенту CRP у кожну лунку. Дуже важливо додавати всі реагенти на дно лунок.
Зауваження: Якщо піпетування займає більше кількох хвилин, для швидкого внесення ферментного реагенту використовуйте багатоканальну піпетку, щоб уникнути зсуву в часі.
- Струшуйте мікропланшет обережно протягом 20-30 секунд для перемішування і накрийте його.
- Інкубуйте 15 хвилин при кімнатній температурі.
- Видаліть вміст лунок декантацією або аспірацією. Висушіть планшет на фільтрувальному папері, якщо використовувалася декантація.
- Додайте 350 мкл промивного буфера (див. розділ "Приготування реагентів") і видаліть його. Повторіть процедуру ще два рази (загальна кількість циклів промивки - 3). Для цієї процедури краще використовувати автоматичний або ручний вошер відповідно до інструкцій виробника приладів. Якщо використовується гнучка пляшка, наповнити кожну лунку до верху (уникайте повітряних бульбашок). Видаліть вміст і повторіть ще 2 рази.
- Додайте по 100 мкл розчину Робочого субстрату в кожну лунку (див. "Приготування реагентів"). Завжди додавайте реагенти в одній і тій же послідовності і з однаковою швидкістю, щоб уникнути відмінностей у часі реакції в різних лунках.

НЕ СТРУШУЙТЕ ПЛАНШЕТ ПІСЛЯ ДОДАВАННЯ СУБСТРАТУ

- Інкубуйте 15 хвилин при кімнатній температурі.
- Зупиніть розвиток забарвлення додаванням в кожну лунку 50 мкл стоп-розчину і перемішайте протягом 15-20 секунд.

- Виміряйте величини поглинання вмісту лунок на довжині хвилі 450 нм (вимірювання проводити при референсній довжині хвилі 620-630 нм). Виміри повинні бути проведені протягом 30 хвилин після додавання стоп-розчину.

Примітка: Завжди додайте реагенти в тому ж порядку, щоб мінімізувати різницю часу реакції між лунками.

10.0 РЕЗУЛЬТАТИ

Для визначення концентрації CRP в невідомих зразках використовується калібрувальна крива.

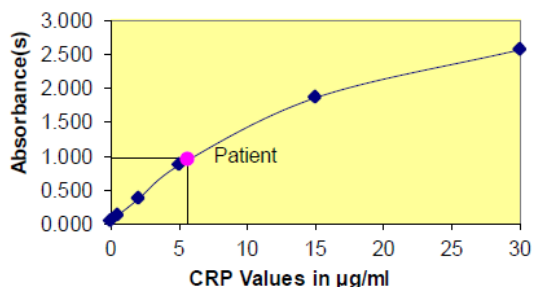
- Запишіть значення оптичної щільності для всіх лунок як показано в прикладі 1.
- Для побудови калібрувальної кривої на лінійному графічному папері використовуйте кожну з двох оптичних густин для кожного стандарту залежно від концентрації CRP в мкг/мл (не розраховуйте середнього значення до побудови).
- Проведіть оптимальну калібрувальну криву.
- Визначте концентрації CRP в контролях і зразках, використовуючи калібрувальну криву і середні значення оптичної щільності для кожного зразка. У наведеному нижче прикладі середня абсорбція 0.959 перетинає стандартну криву при 5.63 мкг/мл (див. мал.1)

Зауваження: Якщо значення повинні бути представлені в мг%, розділіть отримані значення (в кроці № 4) на 10, для перетворення значень в мг/дл (або мг%). (Наприклад, значення, отримане для пацієнта 2 (див. Нижче) відповідатиме $21.9/10 = 2.19$ мг/дл)

Приклад 1

Зразок	Лунка	Абсорбція (A)	Середнє абсорбції (B)	Концентрація (мкг/мл)
Калібратор А	A1	0.045	0.045	0
	B1	0.046		
Калібратор В	C1	0.129	0.126	0.5
	D1	0.124		
Калібратор С	E1	0.359	0.366	2.0
	F1	0.373		
Калібратор D	G1	0.863	0.863	5.0
	H1	0.864		
Калібратор Е	A2	1.900	1.856	15.0
	B2	1.812		
Калібратор F	C2	2.611	2.564	30.0
	D2	2.517		
Контроль	E2	0.966	0.959	5.63
	F2	0.952		
Зразок 1	G2	2.162	2.115	19.8
	H2	2.068		
Зразок 2	A3	2.218	2.201	21.9
	B3	2.206		

Малюнок 1



*Дані наведені в прикладі 1 тільки для ілюстрації і не повинні використовуватися для побудови стандартної кривої.

11.0 ПАРАМЕТРИ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ

Результати аналізу можна вважати достовірними, якщо дотримуються наступні умови:

- Оптична щільність калібратора F ≥ 1.3 .
- Оптична щільність калібратора A ≤ 0.1 .
- Чотири з шести пулів контролю якості повинні знаходитись у встановлених межах.

12.0 АНАЛІЗ РИЗИКІВ

Форма MSDS та аналіз ризику для цього продукту доступні за запитом від Monobind Inc.

12.1. Якість роботи набору

- Для відтворюваності результатів важливо, щоб час реакції підтримувався постійним в кожній лунці.
- Піпетування зразків не повинно перевищувати 10 хвилин.
- Не використовувати високо ліпемічні, гемолізовані або забруднені зразки.
- Якщо використовується більше, ніж один планшет, рекомендується повторювати калібрувальну криву.
- Додавання субстратного розчину ініціює кінетичну реакцію, яка зупиняється при додаванні стоп-розчину. Отже, додавання субстрату і стоп-розчину повинно проводитися в однаковій послідовності для усунення відмінностей у часі реакції в різних лунках.
- Вимірювання оптичної щільності на рідері проходить вертикально. Не торкайтеся до дна мікролунок.
- Погана промивка лунок (неповне видалення розчину під час аспірації) може призводити до невідтворюваних і недостовірних результатів.
- Використовуйте компоненти тільки з одного лота. Не змішуйте реагенти з різних партій.
- Зразки пацієнтів з концентраціями CRP, вищими за 30 мкг/мл, повторно розвести (наприклад, 1/50) і проаналізувати. Отриманий результат помножити на коефіцієнт розведення.
- Правильне і точне піпетування, а також дотримання точного часу і температурних вимог є необхідними умовами. Будь-які відхилення від встановлених Monobind можуть давати невірні результати.
- Дотримуватись всіх встановлених норм роботи лабораторної практики для забезпечення нормальної роботи пристрою.
- Важливим є калібрування всього обладнання, тобто, піпеток, рідера, вошера та/або автоматизованих інструментів, які використовуються з даним пристроєм. Також обов'язковим є належний догляд і обслуговування пристрою.
- Аналіз ризиків для даного пристрою може бути наданий Monobind.

12.2 Інтерпретація результатів

- Вимірювання та інтерпретація результатів повинні проводитися досвідченими професіоналами.
- Лабораторні результати не можуть бути єдиним критерієм для визначення лікування, особливо, якщо отримані результати не співпадають з іншими дослідженнями.
- Для отримання дійсних результатів адекватні контролю та інші параметри повинні знаходитися в межах встановлених норм.
- Monobind не несе відповідальності за результати тесту в разі, якщо складові набору були замінені іншими складовими з інших наборів, або якщо результати були інтерпретовані невірно.
- Якщо для обробки результатів тесту використовується комп'ютер, то розраховані значення стандартів не повинні відхилятися більш, ніж на 10% від приписаних значень концентрації.
- Якщо для інтерпретації результатів випробувань використовується комп'ютерна контрольована обробка даних, обов'язково передбачувані значення для калібраторів потрапляють у межах 10% від призначених концентрацій.

13.0 ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ

Відповідно до встановлених референсних інтервалів для "нормальної" дорослої популяції, очікувані значення при використанні даного методу наведено в таблиці 1:

ТАБЛИЦЯ 1

Низький ризик	< 1.0 мкг/мл
Норма	1-3 мкг/мл
Високий ризик	> 3.0 мкг/мл

Важливо пам'ятати, що встановлений діапазон значень, який можна очікувати у даної популяції "нормальних" людей з використанням даного методу, залежить від безлічі факторів: специфічності методу, популяції, яка тестується, і точності методу в руках лаборанта. З цих причин кожна лабораторія повинна встановити свій власний діапазон нормальних значень.

14.0 ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРУ

14.1 Точність

Точність набору CRP всередині серії і між серіями визначалася в аналізі пулів сироваток трьох різних рівнів. Кількість (N), середнє значення (x), стандартне

відхилення (δ) і коефіцієнт варіації (C.V.) для цих сироваток наведені в таблицях 2 і 3.

ТАБЛИЦЯ 2
Точність в аналізі (мкг/мл)

Зразок	N	x	δ	C.V., %
Рівень 1	20	1.3	0.09	6.9%
Рівень 2	20	5.9	0.52	8.8%
Рівень 3	20	13.6	1.06	7.8%

ТАБЛИЦЯ 3
Точність між аналізами* (мкг/мл)

Зразок	N	x	δ	C.V., %
Рівень 1	10	1.6	0.13	8.2%
Рівень 2	10	6.4	0.43	6.7%
Рівень 3	10	12.1	1.09	9.0%

*вимірювання проводились в 10 експериментах в дублях.

14.2 Чутливість

Чутливість (межа визначення) визначений статистично як концентрація, відповідна значенню оптичної щільності нульового стандарту 0 мкг/мл плюс 2σ (σ - Стандартне відхилення) при 95% довірчому інтервалі. Чутливість методу складала 0.014 мкг/мл.

14.3 Достовірність

Справжній метод AccuBind™ hsCRP Elisa порівнювали з референсним автоматичним методом. Використовувалися зразки сироваток (n=167) симптоматичної та безсимптомної популяції. Значення лежали в діапазоні 0-22 мкг/мл. Отримані дані наведені в таблиці 4.

ТАБЛИЦЯ 4

Метод	Середнє (x)	Рівняння регресії	Коефіцієнт кореляції
Даний метод	3.70	Y= 0.0410 + 1.052 (x)	0.976
Метод порівняння	3.94		

14.4 Специфічність

Перехресна реактивність даного методу визначення CRP з вибраними речовинами вивчали додаванням інтерферуючих речовин до сироватки в різних концентраціях. Перехресна реактивність оцінювалася розрахунком відношення дози впливаючої речовини до дози CRP, необхідного для одержання тієї ж абсорбції.

Речовина	Перехресна реактивність
Білірубін	Не визначається
Ліпіди	Не визначається
Тригліцериди	Не визначається
Людський IgG	Не визначається

14.5 Хук-ефект

Концентрації CRP до 5000 мкг/мл в сироватці або плазмі не впливають на результати тестування даними методом. Однак, якщо в зразку передбачається концентрація вище 30 мкг/мл, то його необхідно розвести готувим буфером для розведення зразків.



Monobind, Inc.
100 North Pointe Drive
Lake Forest, CA 92630

Tel: 949.951.2665 Fax: 949.951.3539 www.monobind.com



УПОВНОВАЖЕНИЙ ПРЕДСТАВНИК

ТОВ «ДІАМЕБ»
вул. Чорновола, 97
м. Івано-Франківськ, 76005
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com

