

НАБІР РЕАГЕНТІВ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ С-РЕАКТИВНОГО БІЛКА ВИСОКОЧУТЛИВОГО МЕТОДОМ ІФА

High Sensitivity CRP (hs-CRP) Test System

Кат. №: 3125-300A

Дата випуску інструкції: 16-07-2019
Версія: 4



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

1.0 ПРИЗНАЧЕННЯ

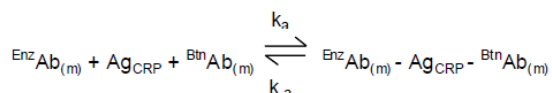
Цільове використання: Кількісне визначення концентрації С-реактивного білка (CRP) в сироватці або плазмі людини за допомогою мікропланшетного імуноферментного аналізу, колориметричного.

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 СРБ. При змішуванні біотинильованих антитіл і сироватки, що містить антиген СРБ, між СРБ 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:



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

Ag_{CRP} = Нативний антиген (змінна кількість)

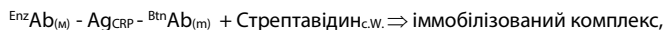
$\text{EnzAb}_{(m)}$ = ферментно-мічене антитіло (надлишкова кількість)

$\text{EnzAb}_{(m)} - \text{Ag}_{\text{CRP}} - \text{Bt}^n\text{Ab}_{(m)}$ = 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 поверхнею 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 СРБ - 1 мл (мл)/флакон

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

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

B. Ферментний реагент СРБ - 13 мл (мл)/флакон

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

D. Розчинник сироватки - 20 мл (мл)/флакон

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

E. Концентрат розчину для промивання - 20 мл (мл)/флакон

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

F. Субстрат А - 7 мл (мл)/флакон

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

G. Субстрат В - 7 мл (мл)/флакон

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

H. Стоп-розчин - 8 мл (мл)/флакон

Один флакон, що містить сильну кислоту (1N HCl). Зберігати при 2-8 °C (°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 (°C). Стабільність набору і компонентів вказана на етикетці.

Зауваження 3: Всі реагенти призначені для формату одного планшета.

4.1 Необхідні матеріали, які не постачаються з набором

1. Мікродозатори на 25 та 50 мкл (μl) з точністю не гірше 1.5%.
2. Диспенсери на 100 і 350 мкл (μl) з точністю не гірше 1.5%.
3. Мікропланшетний вошер або пляшка під тиском (опційно).
4. Мікропланшетний рідер з фільтрами 450 нм (nm) і 620 нм (nm).
5. Фільтрувальний папір для висушування мікролунок.
6. Поліетиленова 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, ВГС 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 (натщесерце). Кров слід збирати в пробірки з червоним маркуванням без добавок або антикоагулянтів (для сироватки) або вакуумні пробірки, що містять ЕДТА або гепарин. Дозвольте крові згорнутися. Для відділення сироватки використовуйте центрифугу.

У пацієнтів, які отримують терапію високими дозами біотину (тобто > 5 мг (ng)/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 (°C) до 5 днів. Якщо зразки не можуть бути проаналізовані за цей час, вони можуть бути заморожені до -20 °C (°C) на період до 30 днів. Уникайте повторних циклів заморожування/розморожування. Для аналізу в дублях вимагається 0.050 мл (ml) 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 (мл) дистильованою або деіонізованою водою в підходящому контейнері. Зберігати при 2-8 °C (°C).

2. Промивний буфер

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

4. Розведення зразків пацієнта (1/200)

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

Зауваження: КАЛІБРАТОРИ ГОТОВІ ДО ВИКОРИСТАННЯ.

9.0 ПРОТОКОЛ АНАЛІЗУ

Перед початком аналізу всі реагенти, стандарти і контролю повинні досягти кімнатної температури (20-27 °C (°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. Зберігати при 2-8 °C (°C).
- Дозуйте в призначені лунки 0.025 мл (мл) (25 мкл (μl)) референсної сироватки (калібратора), розведеного контролю або зразка (див. Підготовка зразків пацієнта вище).
- Додайте по 100 мкл (μl) Ферментного реагенту СРБ 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 декантациєю або аспірацією. Висушіть планшет на фільтрувальному папері, якщо використовувалася декантация.
- Додайте 350 мкл (μl) 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 пляшка під тиском, наповнити кожну лунку до верху (уникайте повітряних бульбашок). Видаліть вміст і повторіть ще 2 рази.
- Додайте по 100 мкл (μl) 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 (μl) стоп-розчину і перемішайте протягом 15-20 секунд.

- Виміряйте величини поглинання вмісту лунок на довжині хвилі 450 нм (nm) (вимірювання проводити при референсній довжині хвилі 620-630 нм (nm)). 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 СРБ в невідомих зразках використовується калібрувальна крива.

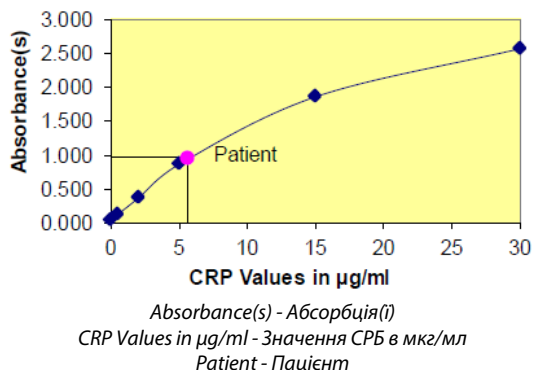
- Запишіть значення оптичної щільності для всіх лунок як показано в прикладі 1.
- Для побудови калібрувальної кривої на лінійному графічному папері використовуйте кожну з двох оптичних густин для кожного стандарту залежно від концентрації СРБ в мкг/мл (μg/ml) (не розраховуйте середнього значення до побудови).
- Проведіть оптимальну калібрувальну криву.
- Визначте концентрації СРБ 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 (μg/ml) (див. мал.1)

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

Приклад 1

| Зразок | Лунка | Абсорбція (A) | Середнє абсорбції (B) | Концентрація (мкг/мл (μg/ml)) |
|--------------|-------|---------------|-----------------------|-------------------------------|
| 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 E | 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



Absorbance(s) - Абсорбція(i)
CRP Values in μg/ml - Значення СРБ в мкг/мл
Patient - Пацієнт

***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:

1. Оптична щільність калібратора $F \geq 1.3$.
2. Оптична щільність калібратора $A \leq 0.1$.
3. 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

1. Для відтворюваності результатів важливо, щоб час реакції підтримувався постійним в кожній лунці.
2. Піпетування зразків не повинно перевищувати 10 хвилин.
3. Не використовувати високо ліпемічні, гемолізовані або забруднені зразки.
4. Якщо використовується більше, ніж один планшет, рекомендується повторювати калібрувальну криву.
5. 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.
6. Вимірювання оптичної щільності на рідері проходить вертикально. Не торкайтеся до дна мікролунок.
7. Погана промивка лунок (неповне видалення розчину під час аспірації) може призводити до невідтворюваних і недостовірних результатів.
8. Використовуйте компоненти тільки з одного лота. Не змішуйте реагенти з різних партій.
9. Зразки пацієнтів з концентраціями СРБ, вищими за 30 мкг/мл ($\mu\text{g/ml}$), повторно розвести (наприклад, 1/50) і проаналізувати. Отриманий результат помножити на коефіцієнт розведення.
10. 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.
11. Дотримуватись всіх встановлених норм роботи лабораторної практики для забезпечення нормальної роботи пристрою.
12. 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.
13. Аналіз ризиків - як того вимагає Директива 98/79/ЄС з маркування CE - для цього та інших пристроїв, виготовлених Monobind, можна отримати, надіславши запит електронною поштою на адресу Monobind@monobind.com.

12.2 Інтерпретація результатів

1. Вимірювання та інтерпретація результатів повинні проводитись досвідченими професіоналами.
2. Лабораторні результати не можуть бути єдиним критерієм для визначення лікування, особливо, якщо отримані результати не співпадають з іншими дослідженнями.
3. Для отримання дійсних результатів адекватні контролю та інші параметри повинні знаходитись в межах встановлених норм.
4. 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.
5. Якщо для обробки результатів тесту використовується комп'ютер, то розраховані значення стандартів не повинні відхилитися більш, ніж на 10% від приписаних значень концентрації.
6. Якщо для інтерпретації результатів випробувань використовується комп'ютерна контрольована обробка даних, обов'язково передбачувани 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 ($\mu\text{g/ml}$) |
| Норма | 1-3 мкг/мл ($\mu\text{g/ml}$) |
| Високий ризик | > 3.0 мкг/мл ($\mu\text{g/ml}$) |

Важливо пам'ятати, що встановлений діапазон значень, який можна очікувати у даній 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 СРБ 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 ($\mu\text{g/ml}$))

| 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 ($\mu\text{g/ml}$))

| 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 ($\mu\text{g/ml}$) плюс 2σ (σ - Стандартне відхилення) при 95% довірчому інтервалі. Чутливість методу склала 0.014 мкг/мл ($\mu\text{g/ml}$).

14.3 Достовірність

Справжній метод AccuBind™ hsCRP ІФА порівнювали з референсним автоматичним методом. Використовувалися зразки сироваток (n=167) симптоматичної та безсимптомної популяції. Значення лежали в діапазоні 0-22 мкг/мл ($\mu\text{g/ml}$). 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 СРБ з вибраними речовинами вивчали додаванням інтерферуючих речовин до сироватки в різних концентраціях. Перехресна реактивність оцінювалася розрахунком відношення дози інтерферуючої речовини до дози СРБ, необхідної для одержання тієї ж абсорбції.

| Речовина | Перехресна реактивність |
|--------------|-------------------------|
| Білірубін | Не визначається |
| Ліпіди | Не визначається |
| Тригліцериди | Не визначається |
| IgG людини | Не визначається |

14.5 Хук-ефект

Концентрації СРБ до 5000 мкг/мл ($\mu\text{g/ml}$) в сироватці або плазмі не впливають на результати тестування даними методом. Однак, якщо в зразку передбачається концентрація вище 30 мкг/мл ($\mu\text{g/ml}$), то його необхідно розвести готовим буфером для розведення зразків.



ВИРОБНИК

MONOBIND INC.
100 North Pointe Dr.
Lake Forest, CA 92630 - USA
Phone: 949.951.2665
Fax: 949.951.3539
www.monobind.com

МОНОБАЙНД ІНК
100 Норд Поінт Драйв
Лейк Форест, Каліфорнія 92630 - США
Тел.: 949.951.2665
Факс: 949.951.3539
www.monobind.com



УПОВНОВАЖЕНИЙ ПРЕДСТАВНИК

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

