



Набор для определения С-реактивного протеина

Кат. № : 3954
Количество : 96
Производитель : DRG (США)

Методика от 27-05-2005

Внимание: основой при проведении анализа есть оригинал инструкции на англ. языке.

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор предназначен для количественного определения С-реактивного протеина в сыворотке. Улучшенная чувствительность определения CRP используется для определения и оценки инфекции, повреждения тканей, воспалительных и ассоциированных заболеваний. Данный анализ предназначен для измерения *in vitro*.

КЛИНИЧЕСКОЕ НАЗНАЧЕНИЕ

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

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

Определения уровня CRP в сыворотке не специфично к каким-нибудь отдельным болезням, он используется как индикатор воспалительных болезней. Уровень CRP растет в сыворотке или плазме в течении 24-48 часов после острого повреждения тканей, достигая своего пика (приблизительно 1000x начального уровня) и уменьшается с прекращением воспаления или травмы. Повышенная концентрация CRP в сыворотке или плазме человека может держаться несколько дней до возвращения в нормальные границы.

Определение CRP 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 CRP ассоциируется с патологическими изменениями, анализ CRP дает информацию для диагноза, терапии и мониторинга воспалительных процессов и повязанных болезней. К тому же, измерения CRP данным методом, может выступать кардио маркером (как и миоглобин, креатин-киназа-MB, тропони I и T), что используются для оценки риска сердечно-сосудистых и сосудистых болезней. Увеличение значения CRP не

специфическое и не может интерпретироваться без полной истории болезни пациента, а также измерения CRP необходимо сравнивать с предыдущими значениями.

ПРИНЦИП МЕТОДА

CRP ELISA есть твердо-фазовый ферментно-связанный иммуносорбентный анализ. В анализе используются одно моноклональное антитело направленное против дистинктивной антигенной детерминанты на молекулы CRP. Это мышинное моноклональное анти- CRP антитело используется для иммобилизации на солидной фазе (на микропланшетных ячейках). Козлиное анти-CRP антитело есть в растворе антитело-энзим (пероксидаза хрена) конъюгате. Образец теста одновременно реагирует с двумя антителами, в результате молекулы CRP оказываются в сэндвиче между солидной фазой и энзимно-связанными антителами. После 45 минутной инкубации при комнатной температуре, ячейки промываются для удаления несвязанных меченых антител. Добавляется ТМВ реагент и инкубируется 20 минут, в результате развивается голубой цвет. Развитие цвета останавливается добавлением стоп раствора, что изменяет цвет на желтый. Концентрация CRP прямо пропорциональна интенсивности цвета в образце. Абсорбция измеряется спектрофотометрически при 450 нм.

РЕАГЕНТЫ И ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

1. **Планшетка** с привитыми мышинными моноклональными анти-CRP антителами на 96 лунок.
2. **Набор стандартов: 1,0 мл/фл**, содержащий 0, 0,005, 0,010, 0,025, 0,050 и 0,100 мг/л CRP в растворе фосфатного буфера-BSA с консервантами, жидкие, готовые к использованию.
3. **hsCRP Разбавитель образцов, 50 мл/фл**, содержащий раствор фосфатный буфер-BSA с консервантами.
4. **Ферментный конъюгат, 12 мл/фл**, содержащий козлиное анти-CRP конъюгированное к пероксидазе хрена с консервантами
5. **Раствор ТМВ, 11 мл/бут.**, содержащий раствор ТМВ.
6. **Стоп раствор, 1 бут., 11 мл/бут.**, содержащий разбавленную 1N HCl.

НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

1. Дистиллированная или деионизированная вода.
2. Точные пипетки: 5, 10, 50, 100 мкл и 1,0 мл.
3. Наконечники к пипеткам.
4. Микропланшетный ридер на 450 нм.
5. Вортекс или эквивалент.
6. Абсорбирующая бумага.
7. Графическая бумага.

ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

1. Обращайтесь с реагентами и образцами как с потенциально инфицированными.
2. Избегайте контакта со стоп раствором. Это может вызывать ожег. При попадании на кожу, промойте водой и обратитесь за медицинской помощью.
3. Не используйте реагенты после окончания срока пригодности и не смешивайте компоненты с разных лотов.
4. Немедленно закрывайте крышки реагентов.
5. Не пипетируйте реагенты ртом.
6. Для диагностики *in vitro*.

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ

1. Храните невскрытые наборы при 2-8⁰С до окончания срока пригодности, указанного на ярлыке.
2. Храните планшет в запечатанном пакете с осушителем для минимизации попадания воздуха.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

1. Все реагенты следует привести к комнатной температуре (18-25⁰С) перед использованием.
2. **Сыворотка пациента должна быть разбавлена 100 кратно 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 (10 кратно) 100 кратно разбавленного раствора разбавителем образцов (напр. 10 мкл 100 кратно разбавленного образца к 90 мкл разбавителя образца).
- Растворите лиофилизированный стандарт 1,0 мл dH₂O. Оставьте растворенный материал на 20 минут и легко перемешайте. Растворенные стандарты должны храниться при 2-8°C, оставаясь при этом стабильными до 30 дней.

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

- В этом тесте используются образцы сыворотки.
- Образцы необходимо собрать, используя стандартную технику венопунктуры. Удалите сыворотку от коагулированных клеток в течении 60 минут после забора.
- Образцы, которые не могут быть проанализированы в течении 24 часов после забора, необходимо заморозить до -20°C или ниже. Они остаются стабильны 6 месяцев.
- Избегайте сильно гемолизированных (ярко красные), липемических (молочных) или мутных образцов (после центрифугирования).
- 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

- Рекомендуемое пипетирование (одно- или многоканальное): Пипетирование образцов, стандартов и контролей должно проводиться в течении 3 минут.
- Все стандарты, образцы и контроли должны тестироваться в дубликате, что б все условия тестирования были идентичные.
- Рекомендуется, что б все ячейки были считаны в течении 15 минут после добавления стоп раствора.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

- Сыворотка пациентов и контроли должны быть разбавлены 100 кратно перед использованием (смотрите **Приготовление реагентов**). **НЕ РАЗБАВЛЯЙТЕ СТАНДАРТЫ.**
- Поместите необходимое количество ячеек в держатель.
- Внесите 10 мкл **НЕРАЗБАВЛЕННЫХ** CRP стандартов, **РАЗБАВЛЕННЫХ** образцов и **РАЗБАВЛЕННЫХ** контролей в соответствующие ячейки.
- Внесите 100 мкл реагента CRP ферментного конъюгата в каждую ячейку.
- Тщательно перемешайте 30 секунд. Очень важно добиться полного смешивания.
- Инкубируйте при комнатной температуре (18-25°C) 45 минут.
- Удалите инкубационный раствор в контейнер для отходов. Промойте ячейки 5 раз неионизированной или дистиллированной водой. **НЕ ИСПОЛЬЗУЙТЕ ВОДУ ИЗ-ПОД КРАНА.**
- Резко переверните ячейки на абсорбирующую бумагу. Для удаления остатков воды.
- Внесите 100 мкл ТМВ раствора в каждую ячейку. Легко перемешайте 5 секунд.
- Инкубируйте 20 минут при комнатной температуре.
- Остановите реакцию добавлением 100 мкл стоп раствора в каждую ячейку.
- Легко перемешайте 30 секунд. **Важно добиться, что б голубой цвет полностью изменился на желтый.**
- Считайте абсорбцию при 450 нм микропланшетным ридером при 450 нм **в течении 15 минут.**

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

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

ВЫЧИСЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

- Вычислите значение средней абсорбции (ОП₄₅₀) для каждого набора стандартов, контролей и образцов.
- 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.
- Используя среднюю абсорбцию для каждого образца, определите соответствующую концентрацию CRP (мг/л) со стандартной кривой. Зависимо от опыта и/или компьютерных возможностей, могут использоваться другие методы обработки данных.
- Полученные значения образцов пациентов и контрольной сыворотки необходимо умножить на фактор разбавления 100 для получения результатов CRP в мг/л.
- Образцы пациентов с концентрацией CRP выше, чем 10 мг/л, должны быть разбавлены 10 кратно после начального 100 кратного разбавления (общее разбавление 1000 кратно) и конечные значения CRP должны быть умножены на 1000 для получения результатов CRP в мг/л.
- Примечание: Образцы пациентов с концентрацией меньше, чем 0,1 мг/л должны интерпретироваться как «<0,1 мг/л CRP».

ПРИМЕР КАЛИБРОВОЧНОЙ КРИВОЙ

Результаты типичного стандартного теста с абсорбцией, считанной при 450 нм, показанной на оси у против концентрации CRP 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.

CRP (мг/л)	Абсорбция (450 нм)
0	0,073
0,005	0,358
0,010	0,624
0,025	1,305
0,050	1,093
0,100	2,962

Пример типичной калибровочной кривой смотрите на стр. 5 в оригинале инструкции на англ. языке.

ОГРАНИЧЕНИЕ ПРОЦЕДУРЫ

- Надежные и соответствующие результаты будут получены при проведении анализа в соответствии с инструкцией и хорошей лабораторной практикой.
- Результаты могут использоваться как дополнение к другим диагностическим процедурам.
- Образцы сыворотки сильно липемические, гемолизированные или мутные не должны использоваться в этом тесте.
- Процедура промывания – критична. Недостаточное промывание может привести к неточным результатам.
- 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, что не соотносятся с клинической картиной или историей болезни пациента, должны интерпретироваться с осторожностью.

ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

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

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

ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗА

1. Точность:

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

Сравнение данного набора с высокочувствительным Dade-Behring N CRP тестом дало следующие данные (n=117):

Коэффициент корреляции = 0,9594

Отклонение = 0,8396

Пересечение: = 1,3948

Среднее = 13,74 мг/л

Среднее Dade = 14,75 мг/л

2. Чувствительность

Минимально определяемая концентрация CRP при измерении при 2 СО от среднего значения нулевого стандарта равна 0,1 мг/л. **Нижняя граница равна 0,1 мг/л, верхняя граница = 10 мг/л.**

3. Точность

Внутри тестовая точность была определена тестированием пяти разных сывороток в одном анализе.

Образец сыворотки	1	2	3	4	5
№ репликантов	22	22	22	22	20
Среднее CRP (мг/л)	0,54 6	0,89 4	2,02 1	3,49 2	17,54 9
СО	0,04 1	0,03 7	0,08 5	0,14 6	0,397
КВ (%)	7,5	4,1	4,2	4,1	2,3

Между тестовая точность была определена измерением пяти разных образцов сыворотки при индивидуальных калиброванных тестах.

Образец сыворотки	1	2	3	4	5
№ репликантов	20	20	20	20	20
Среднее CRP (мг/л)	0,49 0	0,89 0	1,92 5	3,52 9	17,43 5
СО	0,020 0	0,023 3	0,078 8	0,114 4	0,438
КВ (%)	4,1	2,5	4,1	3,2	2,5

4. Изучение линейности и восстановления

Восстановление

Разные образцы сыворотки с известным уровнем CRP были скомбинированы и проанализированы в дубликате. Среднее значение восстановления равно 100,4%.

Номер пар	Ожидаемые CRP (мг/л)	Полученные CRP (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

Линейность

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

5. Специфичность

Следующие аналиты 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

Информация для заказа:

ЧМП «ДИАМЕБ»
ул. Чорновола, 97, г. Ивано-Франковск, 76005
Тел.: (0342) 775122
Факс: (0342) 775612
E-mail: info@diameb.com
www.diameb.com