

Інструкція із застосування

С-реактивний білок високочутливий ІФА



Уповноважений представник: ТОВ «НОВАМЕДЛАЙН», 01010, м. Київ, вул. Омеляновича-Павленка, буд. 19 А, оф. 1, тел. (044) 223-83-18, info@novamedline.com, www.novamedline.com

ПРИЗНАЧЕНЕ ВИКОРИСТАННЯ

Для кількісного визначення С-реактивного білка методом імуноферментного аналізу в сироватці крові людини. Тільки для діагностичного використання *in vitro*.

ПРИНЦИП ТЕСТУ

Принцип наступного імуноферментного аналізу полягає в типовому двоетапному аналізі захоплення або «сендвіч-аналізі». В аналізі використовуються два високоспецифічних моноклональних антитіла: моноклональне антитіло, специфічне до CRP, іммобілізується на мікропланшеті, а інше моноклональне антитіло, специфічне до іншої ділянки CRP, кон'югується з пероксидазою хрому (HRP). CRP зі зразка та стандарти зв'язуються з планшетом, промиваються та потім інкубуються з кон'югатом HRP. Після другого етапу промивання додається ферментний субстрат. Ферментативну реакцію зупиняють додаванням стоп-розчину. Абсорбцію вимірюють на рідері мікропланшетів. Інтенсивність кольору, що утворюється в результаті ферментативної реакції, прямо пропорційна концентрації CRP у зразку.

Для побудови стандартної кривої, з якої можна безпосередньо зчитати кількість С-реактивного білка (СРБ) у зразках пацієнтів та контрольних групах, використовується набір стандартів.

КЛІНІЧНЕ ЗАСТОСУВАННЯ

С-реактивний білок (СРБ) – це пентамерний реагент гострої фази, який синтезується печінкою. Його вироблення контролюється головним чином інтерлейкіном-6. Концентрація СРБ у сироватці крові може зростати до 1000 разів при інфекції, травмі, хірургічному втручанні та інших гострих запальних явищах. Хронічні запальні захворювання, такі як аутоімунні захворювання та злоякісні новоутворення, можуть призводити до стійкого високого рівня СРБ у сироватці крові. Традиційно, СРБ використовувався клінічно для діагностики та моніторингу аутоімунних та інфекційних захворювань. Недавні дослідження показали, що хронічне запалення є важливим компонентом у розвитку та прогресуванні атеросклерозу. Як наслідок, підвищена концентрація СРБ у сироватці крові позитивно пов'язана з ризиком майбутніх коронарних подій.

ПРОЦЕДУРНІ ЗАСТЕРЕЖЕННЯ ТА ПОПЕРЕДЖЕННЯ

1. Для успішного використання цього набору користувачі повинні добре розуміти цей протокол. Надійна робота буде досягнута лише за умови суворого та ретельного дотримання наданих інструкцій.
2. Контрольні матеріали або пули сироваток слід включати до кожного аналізу на високому та низькому рівнях для оцінки достовірності результатів.
3. Якщо для розведення або відновлення вказано використання води, використовуйте дейонізовану або дистильовану воду.
4. Щоб зменшити вплив потенційно шкідливих речовин, під час роботи з реагентами набору та зразками від людини слід носити рукавички.
5. Усі реагенти та зразки з набору слід довести до кімнатної температури та обережно, але ретельно перемішати перед використанням. Уникайте повторного заморожування та розморожування реагентів та зразків.
6. Для кожного запуску необхідно встановити стандартну криву.
7. Контрольні елементи повинні бути включені до кожного прогону та знаходитися в межах встановлених довірчих інтервалів.
8. Неправильні методики процедури, неточне піпетування, неповне промивання, а також неправильне зберігання реагентів можуть бути ознакою того, що значення аналізу для контролів не відображають встановлених діапазонів.
9. Під час зчитування мікропланшета наявність бульбашок у мікролунках впливатиме на оптичну густину (ОГ). Обережно видаліть будь-які бульбашки перед виконанням кроку зчитування.
10. Розчин субстрату (ТМБ) чутливий до світла і повинен залишатися безбарвним за умови правильного зберігання. Нестабільність або забруднення може свідчити про появу синього забарвлення, і в такому разі його не слід використовувати.
11. Під час дозування субстрату та стоп-розчину не використовуйте піпетки, в яких ці рідини контактуватимуть з будь-якими металевими деталями.
12. Щоб запобігти забрудненню реагентів, використовуйте новий одноразовий наконечник піпетки для дозування кожного реагенту, зразка, стандарту та контролю.
13. Не змішуйте різні номери партій компонентів набору в одному тесті та не використовуйте жодного компонента після закінчення терміну придатності, зазначеного на етикетці.
14. Реагенти з набору слід вважати небезпечними відходами та утилізувати відповідно до національних правил.

ОБМЕЖЕННЯ

1. Усі реагенти в наборі калібровані для прямого визначення СРБ у сироватці крові людини. Набір не калібрований для визначення СРБ у слині, плазмі чи інших зразках людського чи тваринного походження.
2. Не використовуйте сироватку з вираженою гемолізацією, вираженою ліпемічною, жовтяничною або неправильно зберіганою сироваткою.
3. Будь-які зразки або контрольні сироватки, що містять азид або тімеросал, несумісні з цим набором, оскільки вони можуть призвести до хибних результатів.
4. Для розведення зразків сироватки з високим вмістом можна використовувати лише Стандарт А. Використання будь-якого іншого реагенту може призвести до хибних результатів.
5. Результати, отримані за допомогою цього набору, ніколи не слід використовувати як єдину основу для клінічного діагнозу. Наприклад, наявність гетерофільних антитіл у пацієнтів, які регулярно контактують з тваринами або продуктами тваринного походження, може спричинити вплив на імунологічні тести. Отже, клінічний діагноз повинен

враховувати всі аспекти історії пацієнта, зокрема частоту контакту з тваринами/продуктами, якщо є підозра на хибні результати.

6. Деякі люди можуть мати антитіла до білка миші, які можуть впливати на цей аналіз. Тому результати будь-яких пацієнтів, які отримали препарат антитіл миші для діагностики або терапії, слід інтерпретувати з обережністю.

ЗАСТЕРЕЖЕННЯ ТА ПОПЕРЕДЖЕННЯ ЩОДО

БЕЗПЕКИ: ПОТЕНЦІЙНО БІОНЕБЕЗПЕЧНИЙ

МАТЕРІАЛ

Сироватка крові людини, яка може бути використана для приготування стандартів та контролів, була протестована та визнана нереактивною на поверхневий антиген гепатиту В, а також була протестована на наявність антитіл до ВГС та вірусу імунодефіциту людини (ВІЛ) та виявилася негативною. Однак жоден метод тестування не може дати повної гарантії відсутності ВІЛ, ВГС та вірусу гепатиту В або будь-яких інфекційних агентів. Реагенти слід вважати потенційно біологічно небезпечними та поводитися з ними з тими ж запобіжними заходами, що й з будь-яким зразком крові.

ХІМІЧНІ НЕБЕЗПЕКИ

Уникайте контакту з реагентами, що містять ТМБ, перекис водню та сірчану кислоту. У разі контакту з будь-яким із цих реагентів промийте великою кількістю води. ТМБ є підозрюваним канцерогеном.

ЗБІР ТА ЗБЕРІГАННЯ ЗРАЗКІВ

Для одного дублікату визначення потрібно приблизно 0,1 мл сироватки. Зберіть 4–5 мл крові у відповідним чином позначену пробірку та дайте їй згорнутися. Центрифугуйте та обережно видаліть шар сироватки. Зберігайте при температурі 4 °C до 24 годин або при температурі -10 °C або нижче, якщо аналізи будуть проведені пізніше. Вважайте всі зразки людини потенційно біологічно небезпечними матеріалами та вживайте відповідних запобіжних заходів під час роботи.

ПОПЕРЕДНЯ ОБРОБКА ЗРАЗКА

Розбавити зразки сироватки пацієнта розведіть у співвідношенні 1:20 зі стандартом А перед використанням. Приклад: До 190 мкл стандарту А додайте 10 мкл зразка сироватки (1:20).

Не розбавляти стандарти і контролі, вони готові для використання.

НЕОБХІДНІ РЕАГЕНТИ ТА ОБЛАДНАННЯ, ЯКІ НЕ НАДАЮТЬСЯ

- Прецизійні піпетки для дозування 10, 20, 50, 100, 190, 200 та 300 мкл
- Одноразові наконечники для піпеток
- Дистильована або дейонізована вода
- Струшувач планшетів
- Мікропланшетний рідер з фільтром, встановленим на 450 нм, та верхньою межею оптичної густини 3,0 або більше* (див. крок 13 процедури аналізу).

НАДАНІ РЕАГЕНТИ

1. AA E-0030 **ПРОМИВКА-10** **Промивний Буфер Концентрат** – Потрібна підготовка x10

Зміст: Одна пляшка, що містить буфер з неіоногенним детергентом та консервантом без ртуті. Об'єм: 50 мл/пляшка
Зберігання: Зберігати в холодильнику при температурі 2–8 °C
Стабільність: 12 місяців або як зазначено на етикетці.
Підготовка: Перед використанням розведіть 1:10 у дистильованій або дейонізованій воді. Якщо буде використано весь планшет, розведіть 50 мл концентрату промивного буфера у 450 мл води.

2. AA E-0055 **СУБСТРАТ** **ТМБ Субстрат** – Готовий до використання

Зміст: Одна пляшка, що містить тетраметилбензидин та перекис водню в буфері, що не містить ДМФА або ДМСО.
Обсяг: 16 мл/пляшка
Зберігання: Зберігати в холодильнику при температурі 2–8 °C
Стабільність: 12 місяців або як зазначено на етикетці.

3. AA E-0080 СТОП- **Стоп розчин** – Готовий до використання

Зміст: Один флакон, що містить 1 М сірчану кислоту. Об'єм: 6 мл/пляшка
Зберігання: Зберігати в холодильнику при температурі 2–8 °С
Стабільність: 12 місяців або як зазначено на етикетці.

Ідентифікація небезпек:



H315 Спричиняє подразнення шкіри.
H319 Спричиняє серйозне подразнення очей.

4. Стандарти та контролю – готові до використання

Нижче наведено приблизні концентрації, будь ласка, зверніться до етикеток флаконів для отримання точної концентрації:

Кат. №	Компонент	Стандартний	Концентрація	Об'єм/флакон
ДМ Е-4601	СТАНДАРТ А	Стандарт А	0 нг/мл	16 мл
4602	СТАНДАРТ Б	Стандарт Б	100 нг/мл	0,5 мл
4603	СТАНДАРТ В	Стандарт В	400 нг/мл	0,5 мл
4604	СТАНДАРТ Г	Стандарт Г	1000 нг/мл	0,5 мл
4605	СТАНДАРТ Д	Стандарт Д	4000 нг/мл	0,5 мл
4606	СТАНДАРТ Е	Стандарт Е	10 000 нг/мл	0,5 мл
ДМ Е-4651	КОНТРОЛЬ 1	КОНТРОЛЬ 1		0,5 мл

Дивіться етикетки на флаконах для отримання інформації про очікуваний

ДМ Е-4652

КОНТРОЛЬ 2

КОНТРОЛЬ 2 значення та прийнятний діапазон!

0,5 мл

Зміст: СРБ у буфері на білковій основі з консервантом, що не містить ртуті. Приготовано шляхом додавання визначеної кількості СРБ до буфера. Калібровано відповідно до 1-го стандарту Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ) IS 85/506.

Зберігання: Зберігати в холодильнику при температурі 2–8 °С

Стабільність: 12 місяців у невідкритих флаконах або як зазначено на етикетці. Після відкриття стандарти слід використати протягом 14 днів або розділити на аліквоти та зберігати замороженими. Уникайте багаторазових циклів заморожування та розморожування.

5. ДМ Е-4613 ASSAY-BUFF **Буфер аналізу** – Готовий до використання

Зміст: Один флакон, що містить буфер на білковій основі з консервантом, що не містить ртуті. Об'єм: 40 мл/пляшка
Зберігання: Зберігати в холодильнику при температурі 2–8 °С
Стабільність: 12 місяців або як зазначено на етикетці.

6. ДМ Е-4631

ШРБ

Мікропланшет з покриттям мишачих антитіл до CRP, готовий до використання, з лунками, що розбираються

Зміст: Один 96-лунковий (12x8) мікропланшет, покритий поліклональними антитілами, у пакеті, що герметично закривається, з осушувачем.

Зберігання: Зберігати в холодильнику при температурі 2–8 °С

Стабільність: 12 місяців або як зазначено на етикетці.

7. ДМ Е-4640

Кон'югат КОНЦЕНТРАТ

Концентрат кон'югату мишачих антитіл проти CRP та пероксидази хрому (HRP) – потребує підготовки x 80.

Зміст: Кон'югат моноклональних антитіл проти CRP та HRP у буфері на білковій основі з консервантом, що не містить ртуті.

Обсяг: 0,3 мл/флакон

Зберігання: Зберігати в холодильнику при температурі 2–8 °С

Стабільність: 12 місяців або як зазначено на етикетці.

Підготовка: Перед використанням розведіть 1:80 у буфері для аналізу (наприклад, 25 мкл HRP у 2 мл буфера для аналізу). Якщо використовуватиметься весь планшет, розведіть 150 мкл HRP у 12 мл буфера для аналізу. Видаліть залишки.

ПРОЦЕДУРА ДОСЛІДЖЕННЯ

Усі реагенти повинні досягти кімнатної температури перед використанням. Стандарти, контролю та зразки слід аналізувати у двох примірниках. Після початку процедури всі кроки слід виконувати без перерви.

 Розбавити зразки сироватки 1:20 з Стандарт А перед використанням.
1. Приготуйте робочі розчини кон'югату анти-CRP-HRP та промивного буфера.
2. Вийміть потрібну кількість лункових стріпів. Щільно закрийте пакет і поверніть невикористані стріпи в холодильник.
3. Піпеткою внесіть по 20 мкл кожного стандартного, контрольного та розведеного зразків у відповідно позначені лунки у двох повторностях.
4. У кожен лунку піпеткою внесіть 200 мкл буфера для аналізу. (Ми рекомендуємо використовувати а багатоканальну піпетку.)
5. Інкубувати на шейкері для планшетів (приблизно 200 об/хв) протягом 30 хвилин за кімнатної температури.
6. Промийте лунки 3 рази по 300 мкл розведеного промивного буфера на лунку та щільно постукайте планшетом об абсорбуючий папір, щоб переконатися, що він висох. (Рекомендується використовувати промивний апарат.)
7. Піпеткою внесіть 100 мкл робочого розчину кон'югату в кожен лунку. (Ми рекомендуємо використовувати а багатоканальну піпетку.)
8. Інкубуйте на шейкері для планшетів (приблизно 200 об/хв) протягом 15 хвилин за кімнатної температури.
9. Промийте лунки 3 рази по 300 мкл розведеного промивного буфера на лунку та щільно постукайте планшетом об абсорбуючий папір, щоб переконатися, що він висох. (Рекомендується використовувати промивний апарат.)
10. Піпеткою внесіть 100 мкл субстрату ТМБ у кожен лунку через певні проміжки часу.
11. Інкубуйте на шейкері для планшетів протягом 10-15 хвилин за кімнатної температури. (або доки Стандарт F набуде темно-синього кольору для бажаної оптичної густини (ОГ).
12. Піпеткою внесіть 50 мкл стоп-розчину в кожен лунку через ті ж проміжки часу, що й у кроці 10.
13. Зчитайте результат на планшеті на мікропланшетному рідері при 450 нм протягом 20 хвилин після додавання стоп-розчину. Якщо ОГ перевищує верхній ліміт з виявлення або якщо 450 нм фільтр є недоступний, а 405 або 415 нм фільтр може бути замінені. Оптична щільність буде нижчою, проте це не вплине на результати зразків пацієнтів/контрольних зразків.

РОЗРАХУНКИ

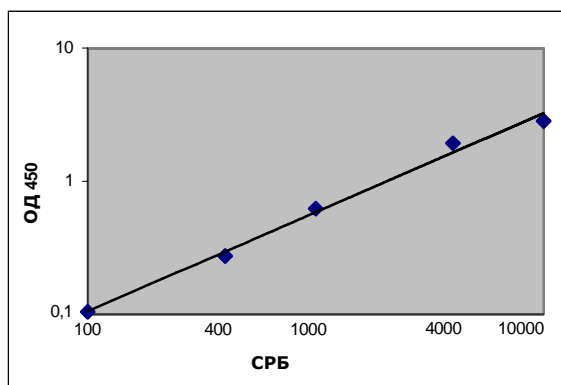
- Обчисліть середню оптичну густину кожного стандартного дублікату.
- Обчисліть середню оптичну густину кожного невідомого дублікату.
- Відніміть середнє значення поглинання стандарту А від середніх значень поглинання стандартів, контролів та зразків сироватки.
- Накресліть стандартну криву на логарифмічному папері, відклавши середні оптичні густини на осі Y, а стандартні концентрації на осі X. Якщо використовується програмне забезпечення для імуноферментного аналізу, рекомендується крива з 4 або 5 параметрами.
- Зчитайте значення невідомих безпосередньо зі стандартної кривої.
- Якщо зразок показує більше 10 000 нг/мл, розведіть його Стандартом А у співвідношенні не більше 1:10 від початкової сироватки, розведеної 1:20 (або 1:200 від чистої сироватки). Отриманий результат слід помножити на коефіцієнт розведення.

ТИПОВІ ТАБЛИЧНІ ДАНІ

Стандарт	ОГ1	ОГ2	Середнє значення ОГ	Значення (нг/мл)
A	0,055	0,053	0,054	0
B	0,105	0,103	0,104	100
C	0,271	0,276	0,274	400
B	0,607	0,633	0,620	1000
E	1.964	1.894	1.929	4000
F	2.829	2.827	2.828	10 000
Невідомо	1.035	1.048	1.042	1737

ТИПОВА СТАНДАРТНА КРИВА

Тільки зразок кривої. Не використовуйте для розрахунку результатів.



ХАРАКТЕРИСТИКИ РОБОТИ ЧУТЛИВІСТЬ

Нижня межа виявлення розраховується зі стандартної кривої шляхом визначення результуючої концентрації середньої оптичної густини (ОГ) стандарту А (на основі 10 повторних аналізів) плюс 2 стандартних відхилення (SD). Таким чином, чутливість набору ІФА для hs-CRP становить 10 нг/мл.

СПЕЦИФІЧНІСТЬ (ПЕРЕХРЕСНА РЕАКТИВНІСТЬ)

Специфічність набору ІФА для визначення hs-CRP визначали шляхом вимірювання видимого значення CRP зразків, до яких додавали такі сполуки:

Речовина	Очевидне Значення С- реактивного білка (нг/мл)
Людський альбумін	Не виявлено
Глобулін людини	Не виявлено

ТОЧНІСТЬ В АНАЛІЗІ

Три зразки були проаналізовані по десять разів кожен на одній стандартній кривій. Результати (в нг/мл) наведено в таблиці нижче:

Зразок	Середнє значення	Середнє відхилен ня	Коефіці єнт варіації (CV%)
1	205.8	31.2	15.2
2	769.2	38.4	5.0
3	8437.8	700.4	8.3

МІЖ АНАЛІЗАМИ ТОЧНІСТЬ

Три зразки були проаналізовані десять разів протягом чотирьох тижнів. Результати (у нг/мл) наведено в таблиці нижче:

Зразок	Середнє значення	Середнє відхилен ня	Коефіці єнт варіації (CV%)
1	227,0	22.4	9.9
2	1022.2	97.2	9.5
3	8791.8	685.8	7.8

ВІДНОВЛЕННЯ

Зразки з додаванням СРБ були підготовлені шляхом додавання визначеної кількості СРБ до трьох зразків сироватки крові пацієнтів. Результати (у нг/мл) наведено в таблиці нижче:

Зразок	Результат спостереження	Результат очікування	Відновлення %
1 незбагачений	263	-	-
+358	760	621	122,4
+1430	1820	1693	107,5
+5720	6520	5983	109,0
2 незбагачений	1352	-	-
+358	1880	1710	109,9
+1430	3020	2782	108,6
+5720	7720	7072	109,2
3 незбагачений	5546	-	-
+358	6107	5904	103,4
+1430	6169	6976	88,4
+5720	10400	11266	92,3

ЛІНІЙНІСТЬ

Три зразки сироватки пацієнтів були розведені стандартом А. Результати (у нг/мл) наведено в таблиці нижче:

Зразок	Результат спостереження	Результат очікування	Відновлення %
1	3662	-	-
1:5	894	732,4	122,1
1:25	136	146,5	92,8
1:50	62	73,2	84,7
2	6120	-	-
1:4	1922 рік	1530	125,6
1:16	428	382,5	111,9
1:64	110	95,6	115,0
3	8800	-	-
1:4	2472	2200	112,4
1:16	614	550	111,6
1:64	148	137,5	107,6

ЕФЕКТ ВИСОКОЇ ДОЗИ ХУКА

Набір для ІФА hs-CRP не зазнав ефекту хука при тестуванні з концентрацією CRP до 160 000 нг/мл.











ОЧІКУВАНІ НОРМАЛЬНІ ЗНАЧЕННЯ

Як і для всіх клінічних аналізів, кожна лабораторія повинна збирати дані та встановлювати власний діапазон очікуваних нормальних значень. Усі значення вказані в нг/мл.

	Чоловіки	Жінки	Комбінований
Пн.	43	45	88
Вік	17 – 87	12 – 79	12 – 87
Абс. Діапазон	73 – 63 680	34 – 39 240	34 – 63 680
2,5 ^й Процентиль	132	139	135
50 ^й Процентиль	1197	1033	1104
97,5 ^й Процентиль	9710	6578	8910

ПОСИЛАННЯ

1. Вілкінс Дж. та ін., Швидкий автоматизований високочутливий імуноферментний аналіз С-реактивного білка. Clin Chem. 1998; 44(6 Pt 1): 1358-61.
2. Ледью Т.Б. та ін. Аналітична оцінка імунонефелометричного аналізу з посиленням частинок для С-реактивного білка, сироваткового амілоїду А та манозозв'язуючого білка в сироватці крові людини. Ann. Clin. Biochem. 1998; 35 (Pt6): 745-53.
3. Масу ЕМ та ін. Варіабельність вимірювання С-реактивного білка у здорових осіб: значення для референтних інтервалів та епідеміологічних застосувань. Clin. Chem. 1997;43(1):52-8.
4. Кяруаһо К та ін. Швидке визначення С-реактивного білка за допомогою імуноферментного аналізу з використанням двох моноклональних антитіл. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 1989; 49(4):389-93.
5. Еда С та ін. Новий метод вимірювання С-реактивного білка з низькою межею виявлення, придатний для оцінки ризику ішемічної хвороби серця. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 1999; 230:32-5
6. Борк Л. та ін. Розробка та валідація автоматизованого та ультрочутливого імунотурбідиметричного аналізу на С-реактивний білок, Clin Chem. 2000; 46(11):1839-42
7. Робертст В.Л. та ін. Оцінка дев'яти автоматизованих методів високочутливого визначення С-реактивного білка: значення для клінічного та епідеміологічного застосування. Частина 2. Clin. Chem. 2001; 47(3):418-25.
8. Ріфай Н., Рідкер П.М. Високочутливий С-реактивний білок: новий та перспективний маркер ішемічної хвороби серця. Clin. Chem. 2001; 47:403-11
9. Ліббі П., Рідкер П.М. Нові запальні маркери коронарного ризику: теорія проти практики. Circulation. 1999; 100:1147-50.
10. Росс Р. Атеросклероз – запальне захворювання. N Engl. J. Med. 199; 340(2):115-26.
11. Ліббі П. Молекулярні основи гострих коронарних синдромів. Circulation. 1995; 91:2844-50
12. Рідкер П.М. та ін. С-реактивний білок та інші маркери запалення в прогнозуванні серцево-судинних захворювань у жінок. N. Engl J Med. 2000; 342:826-43.
13. Рідкер П.М. та ін. Концентрація С-реактивного білка в плазмі та ризик розвитку периферичних судинних захворювань. Circulation. 1998; 97:425-8.

 Температура	Виробник		Містить достатньо для <n> тестів
 Термін	Код партії		Тільки для діагностики in vitro!
 Зверніться до інструкції із	 Зміст		Маркування
Обереж	 Номер у каталозі		Дистриб'ю
 Дата виробництва			