



## ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ НАБОР ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИНСУЛИНА

Тест для количественного определения уровней Инсулина в сыворотке крови человека

Кат.№ 2425-300  
Производитель: Monobind Inc., (США)

**Внимание:** основой при проведении анализа является оригинал инструкции на английском языке.

Методика от 03-2012  
Версия 4

### НАЗНАЧЕНИЕ

Тест предназначен для количественного определения концентрации С-пептида в человеческой сыворотке методом иммуноферментного анализа в микропланшетном формате.

### ВВЕДЕНИЕ

Человеческий инсулин – это пептид, продуцируемый бета-клетками поджелудочной железы и отвечающий за метаболизм и хранение углеводов. В результате биологической обратной связи уровни инсулина повышаются при приеме сахаров и снижаются, когда содержание сахара становится низким для абсорбции. У больных диабетом механизм продукции инсулина нарушен либо из-за генетической предрасположенности (тип I), либо из-за образа жизни и/или наследственных факторов (тип II). Во всех этих случаях продукция инсулина должна стимулироваться медикаментозно или инсулин должен вводиться орально или внутривенными методами. Определение инсулина может помочь при подборе дозы тем пациентам, которым это необходимо.

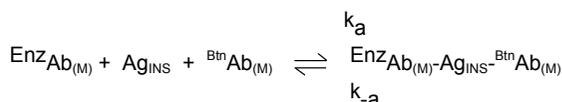
С другой стороны, циркулирующий инсулин выявляется в очень высоких концентрациях у пациентов с опухолями поджелудочной железы. Эти опухоли секретируют патологически высокие уровни инсулина, что приводит к гипогликемии. Соответственно, гликемия натошак, ассоциированная с высокой концентрацией инсулина, предполагает с большой вероятностью опухоль островков поджелудочной железы (инсулиному). Для дифференциальной диагностики между экзогенной гипогликемией, вызванной введением инсулина, и гипогликемией, индуцированной опухолью, рекомендуется использовать определение концентрации С-пептида в сыворотке. (Пожалуйста, см. Monobind C-Peptide Microwell Elisa кам. № 2525-300). Эти инсулиномы могут быть локализованы провоцирующими внутривенными дозами толбутамида и кальция.

### ПРИНЦИП МЕТОДА

#### Иммуноферментный анализа (тип 3)

Настоящие реагенты, необходимые для иммуноферментного определения, включают в избытке высокоаффинные и специфичные антитела (фермент-меченые и биотинилированные) для специфического распознавания различных эпитопов, и естественный антиген. В процессе анализа на поверхности микрочаек взаимодействуют сорбированный в ячейках стрептавидин и добавляемые биотинилированные антитела к инсулину.

При смешивании биотинилированных анти-инсулин моноклональных антител, ферментного конъюгата и сыворотки, содержащей естественный антиген, между нативным антигеном и антителами происходит реакция без конкуренции или пространственных затруднений с образованием растворимого сэндвич-комплекса. Взаимодействие иллюстрируется следующим уравнением:



$\text{B}^{\text{tn}}\text{Ab}_{(M)}$  = биотинилированные моноклональные антитела (избыточное количество)

$\text{Ag}_{\text{INS}}$  = нативный антиген (переменное количество)

$\text{EnzAb}_{(M)}$  = фермент-меченые моноклональные антитела (избыточное количество)

$\text{EnzAb}_{(M)}\text{-Ag}_{\text{INS}}\text{-B}^{\text{tn}}\text{Ab}_{(M)}$  = сэндвичевый комплекс антиген-антитело

$k_a$  = константа скорости ассоциации

$k_{-a}$  = константа скорости диссоциации

Одновременно в ячейках образуется комплекс при реакции высокоаффинного взаимодействия стрептавидина и биотинилированных антител. Это взаимодействие иллюстрируется так:



стрептавидин<sub>C.W.</sub> = стрептавидин, иммобилизованный на ячейках Иммуно(обилизованный) комплекс = сэндвич-комплекс, связанный с твердой поверхностью.

После достижения равновесия фракция, связанная с антителами, отделяется от несвязавшихся антигенов декантацией или аспирацией и последующей промывкой. Активность фермента во фракции связанных антител прямо пропорциональна концентрации нативного антигена. При использовании нескольких стандартов с известным значением концентрации антигена строится калибровочная кривая, по которой вычисляется концентрация неизвестных образцов.

### РЕАГЕНТЫ

#### Поставляемые материалы:

#### A. Калибраторы инсулина - 2 мл во флаконе (сухие)- значки A-F (Insulin Calibrators)

Шесть флаконов стандартов антигена инсулина с концентрациями 0 (A), 5 (B), 25 (C), 50 (D), 100 (E) и 300 (F) мкМЕ/мл. Растворите содержимое каждого флакона в 2 мл дистиллированной или деионизированной воды. Разведенные калибраторы стабильны 60 дней при 2-8°C. В образцы добавлены консерванты.

**Замечание:** Калибраторы на основе человеческой сыворотки прокальброваны по 1-му Международному стандарту ВОЗ IRP 66/304.

#### B. Ферментный реагент инсулина- 13 мл во флаконе - значок E (Insulin Enzyme Reagent)

Один флакон, содержащий фермент-меченые аффинно очищенные IgG-антитела против инсулина и биотинилированные моноклональные мышиные IgG-антитела против инсулина в буфере, краситель и консервант. Хранить при 2-8°C.

#### C. Планшет, покрытый стрептавидином - 96 ячеек - значок S (Streptavidin Coated Plate)

Один 96-луночный микропланшет, покрытый стрептавидином и запакованный в пакет из алюминиевой фольги с осушителем. Хранить при 2-8°C.

#### D. Концентрат промывочного буфера - 20 мл - значок W (Wash Solution)

Один флакон, содержащий поверхностно-активное вещество в фосфатном буфере. Содержит консервант. Хранить при 2-8°C.

#### E. Субстрат А - 7 мл - значок S<sup>A</sup> (Substrate A)

Один флакон, содержащий ТМБ в буфере. Хранить при 2-8°C.

#### F. Субстрат В - 7 мл - значок S<sup>B</sup> (Substrate B)

Один флакон, содержащий перекись водорода в буфере. Хранить при 2-8°C.

#### G. Стоп-раствор - 8 мл - значок STOP (Stop Solution)

Один флакон, содержащий кислоту (1M HCl). Хранить при 2-8°C.

#### H. Инструкция

**Замечание 1:** Не используйте реагенты с истекшим сроком годности.

**Замечание 2:** Открытые реагенты стабильны 60 дней при хранении от 2 до 8°C.

**Замечание 3:** Все реагенты предназначены для одного 96-луночного планшета.

#### Требуемые, но не поставляемые материалы:

1. Микродозаторы на 50 и 100 мкл с точностью не хуже 1.5%
2. Диспенсеры на 100 и 300 мкл с точностью не хуже 1.5%
3. Микропланшетный вошер или бутылочка
4. Микропланшетный ридер с фильтрами 450 и 620 нм
5. Фильтровальная бумага для высушивания микрочаек

6. Пластиковая пленка или крышка для инкубации
7. Вакуумный аспиратор
8. Таймер
9. Контейнер(ы) для реагентов
10. Дистиллированная вода
11. Контрольные материалы

### ЗАМЕЧАНИЯ И ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

**Набор предназначен только для диагностики *in vitro*.**

**Не для внутреннего или наружного использования на людях или животных.**

Потенциально опасный биоматериал. Используемая для изготовления компонентов набора человеческая сыворотка протестирована методами, одобренными FDA, в которых получены отрицательные результаты на наличие антител к ВИЧ 1 и 2, HCV и поверхностного антигена гепатита В. Однако, поскольку не существует методов, дающих полную гарантию отсутствия инфекционных агентов, с реагентами следует обращаться с осторожностью, как с потенциально опасным биоматериалом, что рекомендуется для любых образцов крови согласно правилам квалифицированной лабораторной практики. Рекомендации смотрите в национальных руководствах по биобезопасности или, например, в "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories," 2nd Edition, 1988, HHS Publication No. (CDC) 88-8395.

**Безопасное уничтожение компонентов набора должно проводиться в соответствии с местными правилами.**

### СБОР И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Образцами служит сыворотка крови. Должны соблюдаться обычные меры предосторожности. Для сопоставимого сравнения нормальных значений должна быть получена утренняя сыворотка (натощак). Кровь следует собирать в пробирки с красной маркировкой без добавок или антикоагулянтов. Позвольте крови свернуться. Для отделения сыворотки используйте центрифугу.

Образцы могут храниться при 2-8°C до 5 дней. Если образцы не могут быть проанализированы за это время, они могут быть заморожены до -20°C на период до 30 дней. Избегайте повторных циклов замораживания - оттаивания. Для анализа в дублях требуется 0.100 мл сыворотки.

### КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Каждая лаборатория должна использовать контроли низкого, нормального и высокого уровней для мониторинга правильности теста. Эти контроли должны исследоваться как неизвестные образцы в каждой постановке анализа. Должны строиться карты контроля качества для отслеживания характеристик поставляемых реагентов. Следует применять приемлемые статистические методы для установления отклонений. Значительные отклонения от установленных характеристик могут свидетельствовать об изменениях в условиях эксперимента или разложении реагентов набора. Для определения причины изменений должны быть использованы свежие реагенты.

### ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

#### 1. Промывочный буфер

Разбавьте содержимое концентрата промывочного буфера до 1000 мл с дистиллированной или деионизированной водой. Хранить при комнатной температуре 2-30 °C до 60 дней.

#### 2. Рабочий раствор субстрата

Вылейте содержимое янтарного флакона с пометкой «Раствор А» в прозрачный флакон с пометкой «Раствор В». Закройте желтой крышкой прозрачный флакон для легкой идентификации. Перемешайте и пометьте флакон. Хранить при 2-8 °C.

**Примечание 1: Не используйте Рабочий субстратный раствор, если он приобрел голубую окраску.**

**Примечание 2: Не использовать загрязненные реагенты или реагенты, покрытые бактериями.**

### ПРОТОКОЛ АНАЛИЗА

*Перед началом анализа все реагенты, стандарты и контроли должны достичь комнатной температуры (20-27°C).*

**\*\*Процедура тестирования должна проводиться опытным профессиональным персоналом\*\***

1. Выберите необходимое количество лунок для образцов, стандартов и контролей для постановки в дублях. **Поместите неиспользуемые стрипы обратно в пакет, закройте и храните при 2-8°C.**
2. Добавьте пипеткой по 50 мкл стандартов, контролей и исследуемых образцов в соответствующие лунки.
3. Добавьте пипеткой по 100 мкл Ферментного реагента Инсулина в каждую лунку. **Важно добавлять все реагенты близко ко дну микроячеек.**
4. Осторожно перемешайте планшет в течение 20-30 секунд и накройте его пластиковой крышкой.
5. Инкубируйте 120 минут при комнатной температуре (20-25°C).
6. Удалите содержимое ячеек декантацией или аспирацией. Высушите планшет на фильтровальной бумаге, если использовалась декантация.
7. Добавьте 350 мкл промывочного буфера (см. раздел «Приготовление реагентов») и удалите его. Повторите процедуру еще два раза (общее количество циклов промывки - 3). **Для этой процедуры лучше использовать автоматический или ручной вошер в соответствии с инструкциями производителя приборов (избегайте воздушных пузырьков). При использовании сжимаемой бутылки заполняйте каждую ячейку до края сжатием бутылки. Удалите промывочный буфер и повторите процедуру еще 2 раза.**
8. Добавьте пипеткой по 100 мкл Рабочего раствора субстратного реагента в каждую лунку (см. «Приготовление реагентов»).  
**НЕ ВСТРЯХИВАЙТЕ ПЛАНШЕТ ПОСЛЕ ДОБАВЛЕНИЯ СУБСТРАТА!**
9. Инкубируйте 15 мин при комнатной температуре.
10. Остановите развитие окраски добавлением в каждую ячейку 50 мкл стоп-раствора и перемешайте ячейки в течение 15-20

секунд. **Всегда добавляйте реагенты в одной и той же последовательности и с одной и той же скоростью, чтобы избежать различий во времени реакции в разных ячейках.**

11. Читать результат каждой лунки при 450 нм (используя контрольную длину волны 620-630 нм для минимализации неточностей) в ридере микропланшета. **Результаты должны быть считаны в течение 30 минут после добавления стоп-раствора.**

### РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для определения концентрации Инсулина в неизвестных образцах используется калибровочная кривая.

1. Запишите значения оптической плотности для всех ячеек как показано в примере 1.
2. Для построения калибровочной кривой на линейной графической бумаге используйте каждую из двух оптических плотностей для каждого стандарта в зависимости от концентрации Инсулина в мкЕд/мл (не рассчитывайте среднего значения до построения).
3. Проведите оптимальную калибровочную кривую.
4. Определите неизвестные концентрации Инсулина в контролях и образцах по калибровочной кривой, используя средние значения оптической плотности для каждого образца. В приведенном ниже примере средняя абсорбция 0.624 пересекает стандартную кривую при концентрации Инсулина 66.8 мкЕд/мл (см. рис.1).

**Примечание:** Данные могут быть обработаны посредством компьютерной программы. Дубли образцов пересчитываются, как показано ниже:

\*Данные в примере 1 приведены только для иллюстрации и **не должны** использоваться для построения стандартной кривой.

**Пример 1**

Образец	№ ячейки	ОП (А)	Средняя ОП (В)	Значение (мкЕд/мл)
Кал. А	A1	0.011	0.010	0
	B1	0.009		
Кал. В	C1	0.054	0.054	5
	D1	0.053		
Кал. С	E1	0.244	0.243	25
	F1	0.241		
Кал. D	G1	0.464	0.476	50
	H1	0.488		

Кал. E	A2	0.882	0.902	100
	B2	0.922		
Кал. F	C2	2.467	2.405	300
	D2	2.342		
Контроль 1	E2	0.065	0.065	6.4
	F2	0.067		
Контроль 2	G2	1.581	1.587	188.0
	H2	1.593		
пациент 1	A3	0.597	0.624	66.8
	B3	0.651		

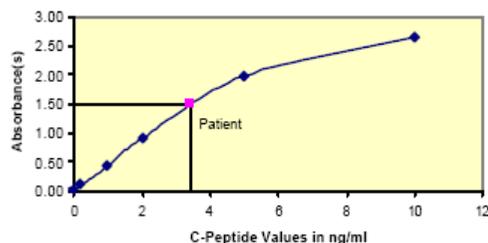


Рисунок 1

## ПАРАМЕТРЫ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА

Для того чтобы результаты теста считались действительными, должны быть соблюдены следующие условия:

1. Оптическая плотность Калибратора «А»  $\leq 0.1$
2. Оптическая плотность Калибратора «F»  $\geq 1.3$
3. Четыре из шести контролей качества должны укладываться в установленные интервалы.

## АНАЛИЗ РИСКА

MSDS и Форма Анализа Риска доступны по запросу от Monobind Inc.

### Проведение анализа

1. Для воспроизводимости результатов важно, чтобы время реакции поддерживалось постоянным в каждой ячейке.
2. Пипетирование образцов не должно превышать 10 минут.
3. Очень липемические, гемолизированные и сильно загрязненные образцы не должны использоваться.

4. Если используется больше, чем один планшет, рекомендуется повторять калибровочную кривую.
5. Добавление раствора субстрата инициирует кинетическую реакцию, которая останавливается при добавлении стоп-раствора. Следовательно, добавление субстрата и стоп-раствора должно проводиться в одинаковой последовательности и с одинаковой скоростью для устранения различий во времени реакции в разных ячейках.
6. Измерение оптической плотности на ридере проходит вертикально. Не прикасайтесь ко дну микроячеек.
7. Плохая промывка ячеек может приводить к невоспроизводимым результатам.
8. Использовать компоненты из одного набора. Не перемешивать реагенты из разных партий.
9. Аккуратное и точное пипетирование и соблюдение точного времени и температуры являются важными. Любое отклонение может привести к неточным результатам.
10. Для надлежащей работы устройства придерживаться всех установленных норм.
11. Важно провести калибровку всего оборудования, например, пипеток, считывающих устройств, моющих устройств и/или автоматизированных инструментов.
12. Анализ риска, как требуется Директивой 98/79/CE, для данного и других устройств, произведенных Monobind Inc., может быть запрошен у [Monobind@Monobind.com](mailto:Monobind@Monobind.com).

## Интерпретация

1. Измерения и интерпретация результатов должны проводиться опытным специалистом.
2. Лабораторные результаты не могут быть единственным критерием для определения диагноза. Особенно если результаты противоречат другим данным анализов.
3. Для действительных результатов соответствующие контрольные и другие параметры должны находиться в установленных нормах.
4. Производитель не несет ответственности за результаты, если смешиваются составляющие из разных наборов.
5. Если используются контрольные данные компьютера для интерпретации результатов, ожидаемые значения калибраторов должны быть в пределах 10 % заданных концентраций.

## ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Значения Инсулина в плазме выше, чем в сыворотке; таким образом, сыворотка предпочтительнее. У людей, не страдающих диабетом, значения Инсулина натошак наиболее высокие у людей, страдающих ожирением, а у тренированных спортсменов – самые низкие.

Важно иметь в виду, что установленный диапазон значений, который можно ожидать у данной популяции "нормальных" людей с использованием данного метода зависит от множества факторов: специфичности метода, тестируемой популяции и точности метода в руках лаборанта. По этим причинам каждая лаборатория должна установить свой собственный диапазон нормальных значений.

Основываясь на клинических исследованиях, проведенных компанией Monobind, и в соответствии с опубликованными данными, был получен следующий диапазон нормальных значений. **Данный диапазон должен быть использован только как ориентировочный:**

Население	Диапазон
Дети < 12 лет	< 10 мкЕд/мл
Взрослые (нормальные значения)	0.7-9.0 мкЕд/мл
Диабетики (тип 2)	0.7-25 мкЕд/мл

## ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

### А. Точность

Внутрисерийная и междусерийная точность набора *Инсулин AccuBind™* определялись при анализе трех различных уровней пула контрольных сывороток. Число измерений (N), среднее значение (X), стандартное отклонение ( $\sigma$ ) и коэффициент вариации (C.V.) для этих сывороток приведены в таблицах 2 и 3.

Таблица 2

### Воспроизводимость внутри серии (значения в мкЕд/мл)

Образец	N	X	$\sigma$	C.V., %
Пул 1	24	10.70	0.89	8.3%
Пул 2	24	48.16	2.07	4.3%
Пул 3	24	130.08	6.64	5.1%

Таблица 3

### Воспроизводимость между сериями\* (значения в мкЕд/мл)

Образец	N	X	$\sigma$	C.V., %
Пул 1	15	11.78	1.33	11.3%
Пул 2	15	48.92	4.69	9.6%
Пул 3	15	145.17	10.45	7.2%

\*Все измерения проводились в 10 постановках, в дублях на протяжении 10 дней.

## В. Чувствительность

Чувствительность (предел определения) определен статистически как концентрация, соответствующая значению оптической плотности нулевого стандарта 0 нг/мл плюс  $2\sigma$  ( $\sigma$  – стандартное отклонение) при 95% доверительном интервале. Чувствительность метода составила 0.182 мкЕд/мл.

## С. Достоверность

Настоящий метод *Инсулин AccuBind™ ELISA* сравнивался с утвержденным радиоиммунным методом. Использовались образцы сывороток от симптоматической и бессимптомной популяций (значения в диапазоне 0.01 мкЕд/мл – 129 мкЕд/мл). Общее количество образцов составило 104. Полученные данные приведены в таблице 4.

Таблица 4

Метод	Среднее (x)	Регрессионный анализ по методу наименьших квадратов	Коэффициент корреляции
Данный метод	13.6	$y=2.6+0.91(x)$	0.975
Контрольный метод	11.4		

Было найдено только незначительное расхождение данного метода и контрольного метода, что доказывает близость средних значений. Уравнение регрессии и коэффициент корреляции показывают прекрасную согласованность методов.

#### D. Специфичность

Перекрестная реактивность данного метода определения Инсулина с выбранными веществами изучали добавлением влияющих веществ к сыворотке в различных концентрациях. Перекрестная реактивность оценивалась расчетом отношения дозы влияющего вещества к дозе инсулина, необходимого для получения той же абсорбции.

Вещество	Перекрестная реактивность	Концентрация
С-пептид	Не определяется	75 нг/мл
Проинсулин	0.0078	100 нг/мл
Инсулин	1.0000	-
Глюкагон	Не определяется	150 нг/мл

#### 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)