



## Набор ИФА для определения ИНСУЛИНА

**Каталог. №** : EIA-2935  
**Количество тестов:** 96  
**Производитель** : DRG (США)

*Методика от 06-2011  
Версия 7.0*

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

### НАЗНАЧЕНИЕ

Настоящий набор предназначен для количественного определения инсулина в сыворотке и плазме.

### ВСТУПЛЕНИЕ

Инсулин это гормон, ответственный за контроль метаболизма глюкозы. Он синтезируется в  $\beta$ -клетках островков Лангерганса, как проинсулин, который превращается в С-пептид и инсулин. Они секретируются в эквивалентном количестве в порталный кровоток. Созревшие молекулы инсулина состоят из двух полипептидных цепей: А цепь и В цепь (21 и 30 аминокислот, соответственно). Две цепочки связываются вместе с помощью двух дисульфидных мостиков. Также есть внутрицепочечный дисульфидный мостик в А цепи.

Секреция инсулина в основном контролируется концентрацией глюкозы в плазме. Основная функция это контроль за доставкой и переработкой глюкозы в периферических тканях. Такая гипогликемическая активность (ингибция глюконеогенеза в печени и глюконеолиз) уравновешивается гипергликемическими гормонами, в том числе глюкагоном, эпинефрином (адреналином), гормоном роста и кортизолом.

Концентрация инсулина сильно снижается при инсулин-зависимом диабете (IDDM), и при некоторых других условиях, таких как гипопитуитаризм. Уровень инсулина растет при неинсулин-зависимом диабете (NIDDM), при ожирении, инсулиноме и некоторых эндокринных дисфункциях, таких как синдром Кушинга и акромегалия.

### ПРИНЦИП МЕТОДА

Набор DRG Инсулин ELISA является твердо фазовым энзимосвязанным иммуносорбентным анализом (ELISA), что базируется на принципе сэндвича. Микропланшетные ячейки покрыты моноклональным антителом, направленным против уникальной антигенной стороны на молекуле инсулина.

Аликвот сыворотки пациента, содержащий эндогенный инсулин, инкубируется в ячейках, покрытых энзимным конъюгатом, что является анти-инсулин антителом, конъюгированным биотином. После инкубации несвязанный материал вымывается.

Во время второй инкубации стрептавидин пероксидазы энзимный комплекс связывается с биотин-анти-инсулин антителом. Количество связанного HRP комплекса пропорционально концентрации инсулина в образце. После добавления раствора субстрата, интенсивность окраса, что развилась, пропорциональна концентрации инсулина в образце пациента.

### ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЕ

1. Для диагностики *in vitro*.
2. Относительно информации по безопасности, которые включены в набор, следуйте листу данных по безопасности.
3. Этот набор может содержать реагенты, приготовленные из человеческой сыворотки или плазма. Использованные сыворотка или плазма тестировались методом, утвержденным FDA, и найдено, что они не содержат антител к ВИЧ-1/2, HCV и HBsAg. Тем не менее, так как не существует метода, дающего полную гарантию отсутствия ВИЧ, HCV, вируса гепатита В или каких-либо других инфекционных агентов, то с данными реагентами надо обращаться как с потенциально инфекционно-опасным материалом.
4. Избегайте контактов с кислотой стоп раствора. Это может привести к раздражению кожи и ожогам.

5. Не пипетируйте ртом и избегайте контакта кожи и слизистых с реагентами.
6. Не курите, не пейте, не ешьте и не применяйте косметику в местах работы с реагентами.
7. Используйте одноразовые перчатки при обращении с образцами и реагентами. Микробиологическое загрязнение реагентов или образцов может влиять на результаты.
8. Обращайтесь с реагентами согласно правилам безопасности.
9. Не используйте реагенты после истечения срока пригодности.
10. Необходимо придерживаться всех объемов, описанных в инструкции. Оптимальные тестовые результаты при использовании калиброванных пипеток.
11. Не смешивайте компоненты разных наборов. Не рекомендуется менять местами лунки разных планшеток даже от одного набора. Наборы могут транспортироваться разными способами, поэтому допускается незначительное различие.
12. Химикалии и приготовленные или использованные реагенты необходимо обрабатывать согласно требованиям безопасности.
13. Лист данных безопасности доступен по требованию.

### ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ.

1. **Микрострипы**, покрытые моноклональным анти-инсулин антителом. (96 лунок).
2. **Нулевой стандарт**, 1 фл., 3 мл, готовый к использованию 0 мклЕд/мл
3. **Набор стандартов**, 5 флаконов, 1 мл, готовые к использованию, с концентрацией 6,25-12,5-25-50-100 мклЕд/мл.  
*Стандарты калиброваны против международных WHO референсных материалов NIBSC 6/304.*
4. **Энзимный конъюгат**, 1 фл., 5 мл, готовый к использованию. Мышиный моноклональный анти-инсулин, конъюгированный биотином..
5. **Энзимный комплекс**, 1 фл., 7 мл, готовый к использованию. Комплекс, содержащий пероксидазу хрена
6. **Раствор субстрата** – ТМВ, готовый к использованию, 14 мл.
7. **Стоп раствор**, 0,5 М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1 фл., 14 мл. Готовый к использованию  
Избегайте контакта со стоп раствором. Он может вызвать ожог.
8. **Промывочный раствор**, концентрированный, 40X, 30 мл.

**Примечание:** Дополнительно нулевой стандарт доступен по запросу.

### НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

1. Микропланшетный ридер, способный проводить измерения при 450 нм ( $\pm 10$  нм).
2. Калиброванные микропипетки разной точности.
3. Абсорбирующая бумага.
4. Дистиллированная вода.
5. Таймер.
6. График или программное обеспечение для обработки данных.

### УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ

**При хранении при 2-8°C не вскрытые реагенты** будут сохранять свою активность до окончания срока годности. Не используйте реагенты после окончания срока пригодности.

Энзимный комплекс, раствор субстрата, нулевой стандарт и стандарты должны храниться при 2-8°C.

Микропланшетные ячейки должны храниться при 2-8°C. После открытия упаковки нужно плотно закрыть ее снова.

### ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Приведите все реагенты и стрипы, что будут использоваться к комнатной температуре.

### Промывочный раствор

Разбавьте 30 мл концентрата моющего раствора с 1170 мл деионизированной воды до конечного объема 1200 мл.  
*Разбавленный промывочный буфер стабилен 2 недели при комнатной температуре.*

### Уничтожение набора

Уничтожение набора необходимо делать согласно требованиям по безопасности. Специальная информация для данного продукта указана в листе данных по безопасности.

**Повреждение набора**

При повреждении набора или компонентов, необходимо уведомить производителя в течении 1 недели после получения набора. Поврежденные компоненты не должны использоваться в анализе. Их необходимо хранить до получения замены, после чего уничтожить.

**ОБРАЗЦЫ**

Может использоваться сыворотка или плазма (только гепариновая или цитратная плазма). Не используйте гемолитическую, иктерическую и липемическую сыворотку.

**Сбор образцов****Сыворотка:**

Соберите кровь венепункцией (напр. Sarstedt Monovette # 02.1388.001), дайте возможность стечь и отделите сыворотку центрифугированием при комнатной температуре.

**Плазма:**

Цельная кровь должна быть собрана в центрифужные пробирки, содержащие антикоагулянт и центрифугировать после забора. (Например, для гепариновой плазмы - Sarstedt Monovette – оранжевая крышка - # 02.165.001; для цитратной плазмы - Sarstedt Monovette – зеленая крышка - # 02.167.001)

**Хранение образцов**

Образцы должны быть закрытыми и храниться до 5 дней при 2-8°C. Для более длительного периода образцы должны быть заморожены до -20°C и хранить до проведения анализа. Оттаявшие образцы переверните несколько раз перед анализом.

**Разбавление образцов**

Образцы с начальными значениями высшими, чем наивысший стандарт необходимо разбавить 10- или 100-кратно *0 стандартом* и повторно анализировать.

Для вычисления концентрации этот фактор разбавления необходимо учесть.

**Например:**

- Разбавление 1:10: 10 мкл сыворотки + 90 мкл 0 стандарта (тщательно перемешайте);
- Разбавление 1:100: 10 мкл разбавления «1:10» + 90 мкл 0 стандарта (тщательно перемешайте)

**ПРОЦЕДУРА ТЕСТА****Основные замечания**

1. Перед использованием выдержите все реагенты при комнатной температуре. Тщательно перемешайте все реагенты и образцы перед использованием, легко переворачивая без образования пены.
2. После начала теста все этапы нужно выполнять без перерывов.
3. Используйте каждый раз новые пластиковые пипетки для каждого стандарта, образца и контроля для предотвращения перекрестного загрязнения.
4. Абсорбция является функцией времени инкубации и температуры. Приготовьте все необходимое перед началом теста, чтобы не тратить время во время самого теста.
5. Обычно, энзимная реакция линейно пропорциональна времени и температуре.

**ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА**

Все стандарты, образцы и контроли необходимо анализировать в дубликате одновременно, что б все условия анализа были одинаковыми

1. Пометьте стрипы, которые будут использованы.
2. Пипеткой внесите **25 мкл** каждого стандарта, контроля и образца, используя новые наконечники, в соответствующие лунки планшета.
3. Добавьте **25 мкл** энзимного конъюгата в каждую лунку планшета.
4. Тщательно перемешайте на протяжении 10 сек. Очень важно достичь полного смешивания на данном этапе.
5. Инкубируйте в течении **30 минут** при комнатной температуре.
6. Вытряхните содержимое лунок.  
Промойте разведенным промывочным раствором три раза (**400 мкл** на лунку). Резко встряхните планшетку над фильтровальной бумагой и промокните остатки влаги.

**Важное замечание:**

Чувствительность и точность анализа зависит от правильного исполнения процедуры промывания!

7. Добавьте **50 мкл** энзимного комплекса в каждую лунку планшета.
8. Инкубируйте в течении **30 минут** при комнатной температуре.
9. Вытряхните содержимое лунок.  
Промойте разведенным промывочным раствором три раза (**400 мкл** на лунку). Резко встряхните планшетку над фильтровальной бумагой и промокните остатки влаги.

10. Добавьте **50 мкл** раствора субстрата в каждую лунку.
11. Инкубируйте **15 минут** при комнатной температуре.
12. Добавьте **50 мкл** стоп реагента в каждую лунку.
13. Измерьте оптическую плотность каждой лунки при **450 нм ± 10 нм** в течении **10 минут** после добавления стоп раствора.

**РЕЗУЛЬТАТЫ**

1. Вычислите среднюю абсорбцию для каждого стандарта, контроля и образца.
2. Постройте стандартную кривую откладывая среднюю абсорбцию полученную для каждого стандарта против его концентрации при значении абсорбции на оси Y и концентрации на оси X.
3. Используя значение средней абсорбции для каждого образца, определите соответствующую концентрацию на стандартной кривой. Могут использоваться другие методы обработки данных в зависимости от опыта и компьютерной программы.
4. Автоматические данные, компьютерные программы, кубический сплайн, 4 PL или логарифмический также дают хорошие результаты.
5. Концентрация образцов может считаться со стандартной кривой. Образцы с концентрацией выше, чем концентрация наивысшего стандарта необходимо разбавить нулевым стандартом. При вычислении концентрации этот фактор разбавления необходимо учитывать.

Типичный пример стандартной кривой

| Стандарт                   | ОП   |
|----------------------------|------|
| Стандарт 0 (0 мклЕд/мл)    | 0,03 |
| Стандарт 1 (6,25 мклЕд/мл) | 0,07 |
| Стандарт 2 (12,5 мклЕд/мл) | 0,14 |
| Стандарт 3 (25 мклЕд/мл)   | 0,35 |
| Стандарт 4 (50 мклЕд/мл)   | 0,88 |
| Стандарт 5 (100 мклЕд/мл)  | 2,05 |

**ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ**

Настоятельно рекомендуется, что б каждая лаборатория установила собственные нормальные и патологические границы.

При проведении изучения нормальных здоровых взрослых, используя DRG инсулин ELISA, были получены следующие значения: 2-25 мклЕд/мл

**ХАРАКТЕРИСТИКИ****Динамический диапазон анализа**

Диапазон анализа находится между 0-100 мклЕд/мл

**Специфичность (перекрестная реактивность)**

Перекрестная реактивность была определена добавлением разных аналитов к сыворотке, содержащей 4 нг/мл (=100 мклЕд/мл) инсулина и измерена полученная концентрация инсулина.

| Добавленные вещества к сыворотке с высоким значением (4 нг/мл) | Полученное значение инсулина (нг/мл) | Перекрестная реактив. (%) |
|--|--------------------------------------|---------------------------|
| Инсулин свиньи 8 нг/мл   | 17                                   | >100                      |
| Инсулин быка 8 нг/мл   | 17,8                                 | >100                      |
| Собачий инсулин 16 нг/мл                                       | 17,2                                 | 82                        |
| Инсулин кроля 16 нг/мл   | 14,1                                 | 63                        |
| Инсулин крысы 16 нг/мл   | 4,0                                  | 0                         |
| Человеческий проинсулин 32 нг/мл                               | 4,1                                  | 0                         |
| Проинсулин свиньи 16 нг/мл                                     | 4,0                                  | 0                         |
| Проинсулин быка 16 нг/мл                                       | 4,1                                  | 0                         |

**Чувствительность**

Аналитическая чувствительность была вычислена для среднего плюс два стандартных отклонений 20 репликантов анализа 0 стандарта и равно 1,76 мклЕд/мл.

**Точность**

| сывор. | n | Внутри тестовая  |      | Межтестовая |   |                  |      |
|--------|---|------------------|------|-------------|---|------------------|------|
|        |   | среднее мклЕд/мл | КВ % | с           | п | среднее мклЕд/мл | КВ % |
|        |   |                  |      | с           | п |                  |      |
|        |   |                  |      | в           |   |                  |      |
|        |   |                  |      | о           |   |                  |      |
|        |   |                  |      | р           |   |                  |      |

|   |    |       |     |   |    |      |     |
|---|----|-------|-----|---|----|------|-----|
| 1 | 20 | 17,45 | 2,6 | 1 | 12 | 17,4 | 2,9 |
| 2 | 20 | 66,4  | 1,8 | 2 | 12 | 66,9 | 6,0 |

**Точность****Контроль качества**

Рекомендуется использовать контроли согласно государственным и федеральным правилам. Использование контроля дает возможность повседневной оценки достоверности результатов. Используйте контроли и нормального уровня, и патологического.

Контроли и соответствующие результаты QC лаборатории указаны в QC сертификате, что поставляется с набором. Величины, указанные в данном сертификате соответствуют лоту набора и должны использоваться для сравнения результатов.

Также рекомендуется использовать национальные и международные программы оценки качества для подтверждения достоверности результатов.

Используйте соответствующий статистический метод для анализа величин контроля. Если результаты анализа не попадают в установленные границы материалов контроля, результаты являются не достоверными.

В таком случае проверьте следующие данные: устройства пипетирования и измерения времени; фотометр; даты пригодности реагентов, условия хранения и инкубации, методы аспирации и промывания.

Если не обнаружено ошибки, обратитесь к Вашему поставщику.

**Воспроизводимость**

Образцы были обогащены добавлением инсулина раствора при известной концентрации 1:1.

Ожидаемые значения были вычислены добавлением половины значения, определенных для неразбавленных образцов и половины значений для известных растворов. % восстановления был вычислен умножением коэффициента измерений и ожидаемых значений на 100.

| Сыро-<br>вка | Добавле-<br>нная конц.<br>1:1 (v/v)<br>мклЕд/мл | Измеренная<br>конц.<br>мклЕд/мл | Ожидаем<br>ая конц.<br>мклЕд/мл | Извлечение<br>% |
|--------------|---|---------------------------------|---------------------------------|-----------------|
| 1            | 100   | 21,2                            | 60,6                            | 109,6           |
|              | 50  | 66,4                            | 35,6                            | 108,9           |
|              | 25  | 38,8                            | 23,1                            | 101,1           |
|              | 12,5  | 23,4                            | 16,9                            | 102,9           |
| 2            | 100   | 69,0                            | 84,5                            | 100,1           |
|              | 50  | 84,6                            | 59,5                            | 98,1            |
|              | 25  | 58,4                            | 47,0                            | 91,8            |
|              | 12,5  | 43,2                            | 40,8                            | 91,9            |

**Линейность**

| Сыво-<br>ротка | Фактор<br>развед. | Измерян.<br>концент.,<br>мклЕд/мл | Ожидаем<br>концент.,<br>мклЕд/мл | Извлеч<br>ение |
|----------------|-------------------|-----------------------------------|----------------------------------|----------------|
| 1              | неразведен        | 21,2                              | 21,24                            |                |
|                | 1:2               | 9,4                               | 10,62                            | 88,5           |
|                | 1:4               | 5,2                               | 5,31                             | 98,5           |
|                | 1:8               | 2,8                               | 2,66                             | 105,9          |
|                | 1:16              | 1,5                               | 1,33                             | 110,3          |
| 2              | неразведен        | 69,0                              | 69,0                             |                |
|                | 1:2               | 30,5                              | 34,5                             | 88,74          |
|                | 1:4               | 17,6                              | 17,3                             | 102,0          |
|                | 1:8               | 8,7                               | 8,6                              | 101,2          |
|                | 1:16              | 4,8                               | 4,3                              | 110,4          |

**ОГРАНИЧЕНИЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ****Влияющие вещества**

Неправильное обращение с образцами или модификация теста может влиять на результаты.

Гемоглобин (до 4 мг/мл), билирубин (до 0,5 мг/мл) и триглицериды (до 30 мг/мл) не влияют на результаты анализа.

**Влияние лекарств**

До сегодняшнего дня не известны вещества (лекарства), что влияют на результаты анализа.

**Побочный эффект**

Не наблюдается побочных эффектов в этом тесте до 1600 мклЕд/мл инсулина.

**ПРАВОВЫЕ АСПЕКТЫ****Достоверность результатов**

Тест должен проводиться точно с инструкцией производителя. Также пользователь должен следовать национальным стандартам и законам. Это особенно относится к использованию контролей. Очень важно всегда включать в анализ достаточное количество контролей для оценки достоверности и точности анализа.

Тестовые результаты достоверные, только если контроли попадают в указанные границы и если все другие параметры соответствуют спецификации.

**Терапевтическое заключение**

Терапевтическое заключение никогда не должно основываться на результатах лабораторных исследований. Оно должно учитывать полностью всю клиническую картину пациента.

Тестовые результаты не должны быть единственным фактором, на основе которого ставится терапевтическое заключение.

**Надежность**

Любые изменения набора и/или смешивания компонентов разных лотов могут отрицательно влиять на результаты теста.

Такие модификации не могут быть причиной для замены набора. Любые повреждения при транспортировке набора не являются под ответственностью производителя.

**ЛИТЕРАТУРА**

(См. в оригинале инструкции).

**ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА:**

**ЧМП «ДИАМЕБ»**  
Ул. Чорновола, 97, г. Ивано-Франковск, 76005  
Тел.: (0342) 775122  
Тел/факс: (0342) 775612  
E-mail: [info@diameb.ua](mailto:info@diameb.ua)  
[www.diameb.ua](http://www.diameb.ua)