



Набор для определения ИНСУЛИНА

Кат. № : 3608
Количество тестов: 96
Производитель : DRG (США)

Методика от 07-2006

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

НАЗНАЧЕНИЕ

Настоящий набор предназначен для количественного определения аутоантител к бычьему, свиному и рекомбинантному инсулину человека.

1. ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

Все реагенты этого набора предназначены строго для использования *in vitro*.

Строго считывательживайтесь последовательности шагов пипетирования, описанных в этой инструкции. Необходимо соблюдать данное руководство для осуществления качественного контроля в медицинских лабораториях путем исследования контролей и сывороток.

Все реактивы должны храниться охлажденными при температуре 2 - 8 °С в их первоначальной упаковке. Не смешивать компоненты набора различных партий. Необходимо соблюдать сроки годности указанные на упаковке. Не используйте компоненты набора после истечения срока годности.

Перед использованием все компоненты набора и образцы необходимо довести до комнатной температуры и хорошо смешать. Во время работы со всеми реагентами набора, контролями и образцами сыворотки необходимо соблюдать предписанные инструкции. При работе с потенциально инфекционными материалами необходимо соблюдать следующие меры предосторожности:

- не есть, не пить и не курить в зонах работы с образцами и реагентами набора
- не пипетировать ртом
- использовать одноразовые перчатки при обработке образцов и реагентов набора, после чего необходимо тщательно вымыть руки.

Набор содержит компоненты человеческого происхождения, которые, после тестирования FDA- методами, показали отрицательную реакцию на наличие поверхностного антигена гепатита В и антител к ВИЧ. Однако ни один известный тест не дает полной уверенности в том, что компоненты, извлеченные из человеческой крови, не инфицированы. Следовательно, при работе со всеми реагентами и компонентами человеческой крови, такими как плазма и образцы сыворотки, необходимо не исключать возможности передачи инфекции.

Избегайте контакта с реагентом ТМВ (3,3', 5,5'-Tetramethyl-benzidine). При контакте ТМВ с кожей, необходимо тщательно смыть поверхность кожи водой и мылом.

Стоп раствор содержит соляную кислоту. При контакте с кожей, необходимо тщательно промыть поверхность кожи водой и обратиться к врачу.

Необходимо избегать контакта буферного раствора пероксида и легко окисляемых материалов; высокая температура может вызвать неожиданное самовозгорание.

2. МАТЕРИАЛЫ, ВХОДЯЩИЕ В НАБОР

Набор на 96 определений.

1. Делимый микропланшет, состоящий из 12 модулей, по 8 лунок в каждом, покрытая смесью очищенного препарата бычьего, свиного и рекомбинантного человеческого инсулина – 1 шт.
2. Антиинсулиновые калибраторы на основе PBS/BSA, содержащие: 0; 6.3; 12.5; 25; 50 и 100 Е/мл (А - F) - 6 флаконов, по 1,5 мл каждый.
3. Антиинсулиновые контроли на основе PBS/BSA (положительные и отрицательные) для соответствующих концентраций (см. вложенную в набор инструкцию) - 2 флакона, по 1,5 мл каждый.
4. Буфер образца, желтый, концентрат – 1 флакон.
5. Раствор ферментного конъюгата, (светло-красный) содержащий поликлональный anti-h-IgG-IgG компонент кролика, меченый пероксидазой хрена - 1 флакон, 15 мл.
6. ТМВ раствор субстрата - 1 флакон, 15 мл.
7. Стоп-раствор (1 М соляная кислота) - 1 флакон, 15 мл.
8. Буферный промывочный раствор, концентрат - 1 флакон, 20 мл.

3. КОНТРОЛИ

Набор содержит комплект двух контролей.

4. ТЕХНИЧЕСКИЕ ДАННЫЕ

Материал образца: сыворотка или плазма
Требуемый объем образца: 10 мкл образца растворенные 1:100 буфером образца
100 мкл предварительно разбавленного образца каждого определения
Общее время инкубации: 60 минут при комнатной температуре (20 - 28 °С)
Диапазон калибровки: 6.3 - 100 Е/мл
Чувствительность: 0.5 Е/мл
Условия хранения: охлажденный при температуре 2 - 8 °С
Срок годности: 12 месяцев с даты изготовления или до сорока годности. Указанного на этикетках
Объем набора: 96 определений

5. ПРИНЦИП ПРОЦЕДУРЫ

Антиинсулин – непрямой твердофазный иммуноферментный набор (ELISA). Он разработан для количественного измерения аутоантител IgG класса к инсулину. Исследование производится на микропланшетах, покрытых смесью очищенного препарата бычьего, свиного и рекомбинантного человеческого инсулина. Микропланшета может быть разделена на 12 модулей, по 8 лунок в каждом или может использоваться для 96 определений. Во время описываемой процедуры, связывание присутствующих аутоантител, так же как и формирование комплекса по принципу сэндвича и ферментативной цветовой реакции происходит в трех различных стадиях реакции:

Стадия 1:

Калибраторы, контроли и нерастворенные образцы пациента пипетируются в лунки микропланшеты. Любые появившиеся антитела прикрепляются к внутренней поверхности лунок. По истечении 30 минут инкубации необходимо промыть микропланшету буферным раствором для извлечения неактивных компонентов сыворотки.

Стадия 2:

Раствор конъюгата anti-human-IgG пероксидазы хрена пипетируется в лунки микропланшеты для распознавания антител прикрепленных к неподвижным антигенам. По истечении 15 минут инкубации излишки ферментного конъюгата необходимо смыть буферным раствором.

Стадия 3:

Субстрат TMB (3,3',5,5'-Tetramethyl-benzidine) распределяется в лунки. По истечении 15 минут инкубации раствор становится синим. Изменение цвета останавливается добавлением стоп раствора 1 М соляной кислоты. Цвет раствора меняется на желтый. Интенсивность цвета прямо пропорциональна концентрации IgG в первоначальном образце.

Чтобы вычислить оптическую плотность необходим микропланшетный считыватель с 450 нм фильтром. Рекомендуется бихроматическое измерение с 600-690 нм разрешением. Оптическая плотность каждого калибратора может быть графически изображена по отношению к концентрации IgG и неизвестной, экстраполируемой от кривой.

7. НОРМАЛЬНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

В исследовании диапазона нормальных значений образцов сыворотки, взятой из крови здоровых доноров, с помощью теста антиинсулина были установлены следующие диапазоны:

Антиинсулин [Е/мл]

нормальный: <10

повышенный: ≥ 10

Положительные результаты должны быть подтверждены на основе полного медицинского обследования пациента. Также лечение назначается индивидуально для каждого пациента.

Каждой лаборатории рекомендуется устанавливать собственные диапазоны нормального и патологического состояния. Ниже приведенные референс-диапазоны следует рассматривать только как ориентир.

8. СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Микропланшета покрыта смесью очищенного препарата бычьего, свиного и рекомбинантного человеческого инсулина. Поэтому набор определений антиинсулина распознает только аутоантитела IgG-класса специфичные для этих инсулинов. Никаких перекрестных реакций не наблюдалось.

9. КАЛИБРОВКА

По причине отсутствия каких-либо упоминаний в международной медицине о антиинсулиновых антителах, тест система калибрована в относительных единицах.

11. ТРЕБУЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ**Оборудование**

- микропланшетный считыватель с измерениями конечной точки при 450 нм
- вихревой миксер
- пипетки 10 мкл, 100 мкл и 1000 мкл

Подготовка реагентов

- дистиллированная вода
- мерный цилиндр на 100 и 1000 мл
- пластмассовый контейнер для хранения промывочного раствора

Дополнительно

- многоканальный дозатор
- многоцветная пипетка на 100 мкл
- ПО для обработки данных.

12. ЗАБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Для определения антител к инсулину предпочтительно использовать матричные образцы сыворотки или плазмы. Все образцы сыворотки и плазмы предварительно растворены буферным образцом 1: 100. Таким образом, 10 мкл образца могут быть разведены с 990 мкл буферного образца.

Пациентам необходимо обойтись без пищи, никаких специальных приготовлений не требуется. Необходимо взять пункцию крови и поместить ее в вакуумный контейнер, после сворачивания крови необходимо отделить сыворотку или плазму от клеток путем центрифугирования.

Образцы могут быть храниться охлажденными при температуре 2 - 8 °С в течение по крайней мере 5 дней. Для более длительного хранения до шести месяцев, образцы необходимо хранить замороженными при температуре -20 °С. Образцы необходимо поделить на аликвоты для предотвращения их размораживания.

Ни билирубин, ни гемолиз не влияют каким-либо образом на процедуру.

13. ПОДГОТОВКА И ХРАНЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Все компоненты набора поставляются в жидком составе и готовы к использованию, кроме буферного образца и буферного раствора. При условии хранения образцов при температуре 2 - 8 °С, срок годности составляет по крайней мере 30 дней после открытия.

Оставшиеся модули микропланшета необходимо хранить охлажденными при температуре 2 - 8 °С, в сухом месте; вместе с влагопоглотителем, в тщательно запечатанном полиэтиленовом пакете.

Подготовка буфера образца

Перед использованием необходимо развести содержимое каждого флакона концентрата буферного образца (5x) дистиллированной водой до 100 мл. Хранить охлажденными при температуре 2 - 8 °С в течение 30 дней после приготовления или до истечения срока годности, указанного на упаковке.

Подготовка буферного промывочного раствора

Перед использованием необходимо развести содержимое каждого флакона концентрата буферного промывочного раствора (50x) дистиллированной водой до 1000 мл. Хранить охлажденными при температуре 2 - 8 °С в течение 30 дней после приготовления или до истечения срока годности, указанного на упаковке.

14. ПРИМЕЧАНИЯ ПО МЕТОДИКЕ

Контроли сывороток должны рассматриваться как неизвестные для установления поведения реагентов в исследовании.

Для всех контролей, соответствующие концентрации указаны на ярлыках каждого флакона. Используя эти концентрации можно вычислить кривую калибровки для получения результатов исследования.

Пипетирование и обработка образцов

Используйте микропипетку со сменными наконечниками для разведения образцов сыворотки и плазмы. Капать прямо на дно лунок. Чтобы избежать смешения образцов, необходимо сменять наконечники пипетки.

Образцы пациентов с высокой концентрацией перед исследованием необходимо дополнительно развести буферным образцом. При подсчете результатов необходимо учитывать дополнительное разведение.

15. ПРОЦЕДУРА ИММУНОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

Не смешивайте компоненты различных упаковок.

Перед использованием все компоненты должны быть доведены до комнатной температуры.

Разведите все образцы пациента 1:100 буферным образцом перед исследованием. Затем смешайте 10 мкл образца с 1000 мкл буферным образцом в полистироловой пробирке. Хорошо смешайте. Калибраторы и контроли готовы к использованию и не требуют разбавления.

1. Подготовьте достаточное количество модулей микропланшета, чтобы разметить калибраторы, контроли и неразведенные образцы пациента в дублях.

	1	2	3	4	5	6
A	SA	SE	P1	P5		
B	SA	SE	P1	P5		
C	SB	SF	P2	P..		
D	SB	SF	P2	P..		
E	SC	C1	P3			
F	SC	C1	P3			
G	SD	C2	P4			
H	SC	C2	P4			

SA – SF: стандарты А до F

P1, P2... образец пациента 1, 2.....

C1: положительный контроль

C2: отрицательный контроль

2. Раскапайте **100 мкл калибраторов, контролей и предварительно разбавленных образцов пациента** в лунки

3. Инкубировать в течение 30 минут при комнатной температуре (20 - 28 °C).

4. Удалите содержимое микролунок и промойте **3 раза 300 мкл промывочного раствора.**

5. Раскапайте **100 мкл раствора ферментного конъюгата в каждую лунку.**

6. Инкубировать в течение **15 минут** при комнатной температуре.

7. Удалите содержимое микролунок и промойте **3 раза 300 мкл промывочного раствора.**

8. Раскапайте **100 мкл субстрата ТМВ в каждую лунку.**

9. Инкубировать в течение **15 минут** при комнатной температуре, в темном месте.

10. Добавить **100 мкл стоп раствора в каждую лунку** и оставить на пять минут.

11. Считать оптическую плотность в **450 нм** и подсчитайте результаты. Рекомендуется бихроматическое измерение в 600-650 нм.

**Цвет стабилен по крайней мере в течение 30 минут.
Необходимо считать оптические плотности за это время.**

16. ПОДСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для анти-инсулина используется 4-параметровая функция с линейно-логарифмическими координатами для оптической плотности и концентрации.

Линейно-логарифмическое построение рекомендуется

Сначала подсчитать средние значения оптической плотности для каждого калибратора. На линейно-логарифмической бумаге отметить эти значения против соответствующей концентрации. Построить стандартную кривую. Вычислить неизвестные концентрации по стандартной кривой путем интерполяции.

17. ПРИМЕР ПОДСЧЕТА РЕЗУЛЬТАТОВ

Следующие данные приведены только в качестве иллюстрации и не могут быть использованы для вычисления неизвестных.

№	Лунка	ОП 1	ОП 2	Среднее значение	Конц. 1	Конц. 2	Среднее значение	Падение конц.	КВ %
STA	A 1/B 1	0.036	0.032	0.034	0.1	0.1	0.1	0.0	8
STB	C 1/D 1	0.354	0.345	0.349	6.3	6.1	6.2	6.3	2
STC	E 1/F 1	0.621	0.602	0.611	12.9	12.4	12.7	12.5	2
STD	G 1/H 1	0.984	1.005	0.994	25	25	25	25	1
STE	A 2/B 2	1.503	1.500	1.592	50	50	50	50	0
STF	C 2/D 2	2.57	2.035	2.046	102	99	100	100	1

18. ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗА**18.1 Чувствительность**

Минимальный определяемый уровень для данного анализа составляет 0.5 Е/мл.

18.2 Параллелизм

В тестах на разведение концентрации, сыворотки и антитела разводились буфером для образцов и тестировались на данном наборе. Набор показывает линейность на всем диапазоне измерений.

Образец №	Раствор	Фактические значения [Е/мл]	Ожидаемые значения [Е/мл]	Фактические/ожидаемые значения
1	1:50	77.6		
	1:100	41.7	38.8	107%
	1:200	21.1	19.4	109%
	1:400	10.3	9.7	106%
	1:800	4.7	4.9	96%
2	1:100	100.7		
	1:200	50.7	50.4	101%
	1:400	23.7	25.2	94%
	1:800	11.1	12.6	88%
	1:1600	5.3	6.3	84%

18.3 Точность

Статистические данные были рассчитаны для каждого из трех образцов на основании результатов 24 определений за одну процедуру. Точность многократного исследования была рассчитана на основании результатов 5 различных процедур по 6 определений в каждой:

В пределах анализа		
Образец №	Среднее значение [Е/мл]	КВ [%]
1	11.2	2.5
2	27.6	2.9
3	59.7	4.0

Между анализами		
Образец №	Среднее значение [Е/мл]	КВ [%]
1	11.6	6.0
2	31.2	5.2
3	69.5	4.3

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА:

ЧМП «ДИАМЕБ»
ул. Черновола 97, г. Ивано-Франковск, 76005
тел.: (0342) 775 122 , факс: (0342) 775612
e-mail: info@diameb.com
www.diameb.com