

НАБОР ИФА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИНСУЛИНА

EIA-2935, Insulin ELISA

Каталог. № : EIA-2935

Методика от 07-2014

Количество : 96

Версия 8.0

Производитель: DRG (Германия)



Основой при проведении анализа является оригинал инструкции на английском языке, вложенной в набор. Номер и дата версии оригинала и перевода инструкции должны совпадать.

1. НАЗНАЧЕНИЕ

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

ВСТУПЛЕНИЕ

Инсулин - это гормон, ответственный за контроль метаболизма глюкозы. Он синтезируется в β -клетках островков Лангерганса, как проинсулин, который превращается в С-пептид и инсулин. Они секретируются в эквивалентном количестве в портальный 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 (ингибирование глюконеогенеза в печени и глюкоголиза) 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.

2. 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 развился, пропорциональна концентрации инсулина в образце пациента.

3. ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

1. Набор предназначен только для использования в in-Vitro диагностике. Только для профессионального использования.
2. Перед началом анализа полностью и внимательно прочитать инструкции. Использовать действующую версию инструкции, поставляемой с набором. Убедиться, что все понятно.
3. Все реагенты данного набора, содержащие сыворотку или плазму человека, были тестированы утвержденными методами и дали отрицательные результаты с ВИЧ 1/2, HBsAg и HCV. Со всеми реагентами обращаться как с потенциально опасными.
4. Избегать контакта со стоп-раствором, содержащим 0.2 моль/л H₂SO₄. Это может вызвать раздражение кожи и ожоги.
5. ТМБ раствор вреден. Вызывает раздражение кожи и слизистой. В случае возможного контакта промыть глаза с достаточным количеством воды и вымыть руки с мылом и водой. Вымыть загрязненные предметы перед их повторным использованием. Вывести человека на свежий воздух при вдыхании.
6. Микропланшет состоит из отделяющихся полосок. Неиспользованные лунки должны храниться при 2-8 °C в

запечатанной упаковке и должны использоваться с поставляемой рамкой.

7. Пипетирование образцов и реагентов должно проводиться как можно быстрее и с одинаковыми промежутками для каждого шага.
8. Резервуары использовать только для одиночных реагентов. Особенно это касается резервуаров с субстратами. Использование резервуаров, бывших в употреблении с раствором конъюгата, может привести к окрасу раствора. Не помещать реагенты обратно в пробирки во избежание загрязнения.
9. Для получения надлежащих результатов, тщательно перемешивать содержимое лунок. Не использовать лунки повторно.
10. Не допускать высушивания лунок в процессе тестирования; добавлять реагенты немедленно после завершения шага промывки.
11. Привести реагенты к комнатной температуре (21-26 °C) перед тестированием. Температура может исказить результаты оптической плотности анализа. Тем не менее, это не повлияет на результаты тестируемых образцов.
12. Не пипетировать ртом. Избегать контакта с кожей и слизистой.
13. Не употреблять пищу, не пить и не пользоваться косметикой в области работы с реагентами.
14. При работе с образцами и реагентами использовать одноразовые перчатки. Микробное загрязнение реагентов или образцов может привести к ложным результатам.
15. Обращаться с реагентами в соответствии с установленными нормами.
16. Не использовать после окончания срока годности.
17. Соблюдать все указанные объемы. Оптимальные результаты возможны только при использовании калиброванных пипеток и считывающего устройства микропланшета.
18. Не смешивать компоненты из разных наборов и партий.
19. Химикаты и приготовленные или использованные реагенты уничтожать в соответствии с установленными правилами.
20. За дополнительной информацией обратиться к производителю.

4. РЕАГЕНТЫ

4.1 Поставляемые материалы

1. **Микрострипы**, покрытые моноклональным анти-инсулин антителом (96 лунок).
2. **Нулевой стандарт**, 1 фл., 3 мл, готовый к использованию 0 мкЕд/мл
3. **Набор стандартов**, 5 флаконов, 1 мл, готовые к использованию, с концентрацией 6,25-12,5-25-50-100 мкМЕд/мл.

Конверсия: мкМЕд/мл x 0.0433 = нг/мл,
нг/мл x 23.09 = мкМЕд/мл

Стандарты калиброваны против международных WHO референсных материалов NIBSC 66/304.

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** – ТМБ, готовый к использованию, 14 мл.
7. **Стоп раствор**, 0,5 М H₂SO₄, 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.

4.2 Необходимые, но не поставляемые материалы

- Микропланшетный ридер, способный проводить измерения при 450 нм (± 10 нм).
- Калиброванные микропипетки разной точности.
- Абсорбирующая бумага.
- Дистиллированная или деионизированная вода.
- Таймер.
- График или программное обеспечение для обработки данных.

4.3 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.

4.4 Приготовление реагентов

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

Промывочный раствор

Добавить деионизированную воду к Концентрату Промывочного раствора 40X.

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.*

4.5 Уничтожение набора

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

4.6 Поврежденные тестовые наборы

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.

5. ЗАБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

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

5.1 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)

5.2 Хранение и приготовление 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.

5.3 Разбавление образцов

Образцы с начальными значениями выше, чем наивысший стандарт, необходимо разбавить 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)

6. ПРОЦЕДУРА ТЕСТА

6.1 Основные замечания

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

6.2 Проведение анализа

Каждый анализ должен включать стандартную кривую.

1. Поместить необходимое количество полосок в держатель.
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. Тщательно перемешайте на протяжении 10 сек. Очень важно достичь полного смешивания на данном этапе.
4. Инкубируйте в течении 30 минут при комнатной температуре.
5. 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 зависят от правильного исполнения процедуры промывания!
6. Добавьте 50 мкл энзимного комплекса в каждую лунку планшета.
7. Инкубируйте в течении 30 минут при комнатной температуре.
8. Вытряхните содержимое лунок.
Промойте разведенным промывочным раствором три раза (400 мкл на лунку). Резко встряхните планшетку над фильтровальной бумагой и промокните остатки влаги.
9. Добавьте 50 мкл раствора субстрата в каждую лунку.
10. Инкубируйте 15 минут при комнатной температуре.
11. Добавьте 50 мкл стоп реагента в каждую лунку.
12. Измерьте оптическую плотность каждой лунки при 450 нм ± 10 нм в течении 10 минут после добавления стоп раствора.

6.3 Расчет результатов

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 У и концентрации на оси Х.
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 или заявить их как те, которые имеют значения > 100 мкМЕд/мл. При вычислении концентрации этот фактор разбавления необходимо учитывать.

6.3.1 Типичный пример стандартной кривой

Приведен только для иллюстрации.

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

7. ОЖИДАЕМЫЕ НОРМАЛЬНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

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

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

8. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Рекомендуется использовать контрольные образцы в соответствии с государственными и федеральными положениями. Использование контрольных образцов рекомендуется для обеспечения надежности результатов. Используйте контроли на нормальном и патологическом уровнях.

Контроли и соответствующие результаты QC-Лаборатории приведены в сертификате качества, прилагаемом к набору. Значения и диапазоны так же указаны в сертификате качества, прилагаемом к данному лоту набора и должны использоваться для сравнения результатов.

Так же рекомендуется использовать государственные и международные программы контроля качества с тем, чтобы обеспечить точность результатов.

Применяйте соответствующие статистические методы для исследования контрольных значений и отклонений. Если же результаты не совпадают с установленными допустимыми значениями контрольных материалов, результаты пациента необходимо рассматривать как недействительные.

В этом случае проверьте следующие технические параметры: пипетирующие и измеряющие время приборы; фотометр, срок

годности реагентов, условия хранения и инкубации, методы промывки и аспирации.

После проверки вышеуказанных параметров, не обнаружив никаких ошибок, обратитесь к своему дистрибьютору или непосредственно в DRG.

9. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

9.1 Динамический диапазон анализа

Диапазон анализа находится в пределах 1.76-100 мкМЕд/мл.

9.2 Специфичность (перекрестная реактивность)

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

Добавленные вещества к сыворотке с высоким значением (4 нг/мл)	Полученное значение инсулина, (нг/мл)	Перекрестная реактивность, (%)
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

9.3 Чувствительность

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

9.4 Точность

Внутри тестовая				Межтестовая			
Образец	n	Среднее мкМЕд/мл	КВ %	Образец	n	Среднее мкМЕд/мл	КВ %
1	20	17,5	2,6	1	12	17,4	2,9
2	20	66,4	1,8	2	12	66,9	6,0

9.5 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.

Сыворотка	Добавленная конц. 1:1 (v/v) мкМЕд/мл	Измеренная конц. мкМЕд/мл	Ожидаемая конц. мкМЕд/мл	Извлечение %
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	17,37	69,0	100,1
	50	69,0	84,6	98,1
	25	84,6	59,5	91,8
	12,5	58,4	47,0	91,9

9.6 Линейность

Сыворотка	Фактор разведения	Измеренная концентрация мкМЕд/мл	Ожидаемая концентрация мкМЕд/мл	Извлечение %
1	неразведенный	21,2	21,24	88,5
	1:2	9,4	10,62	98,5
	1:4	5,2	5,31	105,9
	1:8	2,8	2,66	110,3
	1:16	1,5	1,33	
2	неразведенный	69,0	69,0	88,74
	1:2	30,5	34,5	102,0
	1:4	17,6	17,3	101,2
	1:8	8,7	8,6	110,4
	1:16	4,8	4,3	

10. ОГРАНИЧЕНИЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

10.1 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.

10.2 Влияние лекарств

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

10.3 Побочный эффект

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

11. ПРАВОВЫЕ АСПЕКТЫ

11.1 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.

11.2 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.

11.3 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.



ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

ООО «ДИАМЕБ»
ул.Черновола, 97
г. Ивано-Франковск, 76005
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com