



Набір ІФА для кількісного визначення С-ПЕПТИДУ в сироватці, плазмі і сечі людини

Кат. № : EIA-1293
Кількість : 96
Виробник : DRG (Німеччина)

*Методика від 09-2012
Версія 11.0*

Увага: основою для проведення аналізу є оригінал інструкції англійською мовою.

1. ВСТУП

Інсулін синтезується в панкреатичних β -клітинах як компонент 86-амінокислотного поліпептиду вагою 6000 Дальтон, який називається проінсулін. Проінсулін послідовно ферментативно розщеплюється, вивільняючи інсулін в кровотік разом з залишковим фрагментом молекулярною вагою 3000 Дальтон, що називається С-пептид, так названий за зв'язування А і В ланцюгів інсуліну в середині молекули проінсуліну. Людський складається з 31 амінокислоти і не має метаболічної функції. Проте, оскільки С-пептид та інсулін секретуються в еквімолярних кількостях, визначення С-пептиду дозволяє проводити кількісне визначення інсулінової секреції. Більше того, С-пептид має кілька переваг перед інсуліном під час визначення.

Напівжиття циркуляції С-пептиду в 2-5 р довше, ніж інсуліну. Таким чином, рівень С-пептиду є більш стабільним індикатором інсулінової секреції, ніж швидко змінювані рівні самого інсуліну. Крім того, в периферичній крові рівні С-пептиду в 5-6 р вищі, ніж інсуліну. Також дослідженнявання С-пептиду дає можливість розрізнити ендogenousний інсулін від введеного.

Так, низькі рівні С-пептиду очікуються, коли зникає сам інсулін (як при інсулін-залежному діабеті), або рівні його знижені (як нормальна відповідь на введення інсуліну), в той час, як підвищені рівні С-пептиду можуть свідчити про надмірну активність β -клітин, що буває при інсуліномах.

Визначення С-пептиду може використовуватись для виявлення толерантності до глюкози і при глібенкламід-глюкозових тестах.

С-пептид можна визначати як в крові, так в сечі, при сучасній чутливості тестів навіть при дуже низьких рівнях. С-пептид визначають при інсуліномах і при диференціюванні гіпоглікемії, зумовленої панкреатектомії, а також для визначення біологічної активності острівкових клітинних трансплантантів.

КЛІНІЧНІ ПОКАЗИ ДО НАБОРУ

- визначення функції залишкових β -клітин у діабетиків при інсуліновій терапії
- визначення і моніторинг фази ремісії діабету I-го типу
- додатковий метод для диференціації діабетів I та II типу
- діагностика штучної інсуліно спровокованої гіпоглікемії
- додатковий метод для діагностики інсуліноми
- прогностична ознака для плода у вагітних, хворих діабетом
- визначення інсулінової секреції при захворюваннях печінки
- моніторинг панкреатектомії.

2. ПРИНЦИП ДОСЛІДЖЕННЯ

У наборі використовується принцип конкурентного зв'язку. Мікропланшет покритий анти-мишачими антитілами, які зв'язують моноклональне антитіло направлене проти антигенної сторони молекули С-пептиду. Ендogenousний С-пептид зразку пацієнта конкурує з С-пептидом, кон'югованим пероксидазою хрому за зв'язування з привитим антитілом. Після інкубації незв'язаний кон'югат вимивається. Кількість зв'язаного кон'югату пероксидази обернено пропорційно концентрації С-пептиду в зразку. Після додавання розчину субстрату, інтенсивність кольору обернено пропорційно концентрації С-пептиду в зразку пацієнта.

3. ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

1. Тільки для діагностичного використання "in vitro".
2. Щодо інформації відносно небезпечних речовин дивіться Лист Даних Безпеки Матеріалів.
3. Методів, які б з остаточною впевненістю переконали, що такі інфекційні агенти як вірус гепатиту В, ВІЛ-вірус чи інші в

компонентах набору відсутні не існує. Тому, зразки і матеріали треба вважати потенційно інфекційними і використовувати з відповідною обережністю.

4. Уникайте контакту з Стоп-розчином (0,5 М H_2SO_4). Це може спричинити подразнення шкіри і опіки.
5. Не піпетуйте реагенти ротом і уникайте контакту реагентів і зразків з шкірою і слизовими.
6. Не їжте, не пийте і не куріть в приміщеннях, де використовуєте зразки чи реагенти.
7. Одягайте рукавиці при роботі з зразками і реагентами. Мікробіологічне забруднення реагентів чи зразків може дати фальшиві результати.
8. Використання набору повинно проводитись згідно з вимогами по техніці безпеки.
9. Не використовуйте реагенти після закінчення дати придатності.
10. Необхідно дотримуватись об'ємів, вказаних в інструкції. Оптиміальні результати будуть отримані при використанні каліброваних піпеток.
11. Не змішуйте реагенти різних лотів і різних наборів, оскільки ці набори могли транспортуватись чи зберігатись при різних умовах.
12. Хімікалії і приготовлені чи використані реагенти повинні бути оброблені відповідно до вимог по техніці безпеки.
13. Лист Даних Безпеки доступний по замовленню.

4. РЕАГЕНТИ

4.1 Реагенти, що надаються

1. **Мікротитраційні лунки:** стрипи 12x8 (роздільні), 96 лунок, вкритих антимишиминим антитілом.
2. **Стандарти (стандарт 0-5),** ліофілізовані 0,75 мл, 6 флаконів 0-16 нг/мл (дивись точне значення вказане на флаконі або в листку Контролю Якості)
3. **Розчинник зразків:** 1 флакон, 3 мл, готовий до використання.
4. **Антисироватка,** 1 флакон, 7 мл, готове до використання моноклональне мишаче анти-С-пептид антитіло.
5. **Ферментний кон'югат:** 1 флакон 14 мл. Готовий до використання біотинильований С-пептид.
6. **Ферментний комплекс:** 1 флакон 14 мл. Готовий до використання. Розчин, в якому є пероксидаза.
7. **Розчин субстрату,** 14 мл, готовий до використання ТМБ.
8. **Стоп-розчин:** 1 флакон 14 мл. Містить 0,5 М H_2SO_4 сірчаної кислоти.
9. **Промивний розчин:** 1 флакон, 30 мл. концентрований (x40)
Примітка: додатковий розчинник зразків для розведення зразків доступний на запит.

4.2 Матеріали, які вимагаються, а не постачаються

1. Мікротитраційний планшетний калібрований рідер (450±10 нм).
2. Калібровані регульовані точні мікропіпетки
3. Абсорбуючий папір.
4. Дистильована або деіонізована вода.
5. Таймер
6. Напівлогарифмічний графічний папір або ПЗ для обробки даних.

4.3 Умови зберігання

Коли відкриті реагенти зберігати при температурі 2-8°C, вони зберігатимуть активність до закінчення терміну придатності. Відкриті реагенти повинні зберігатись при 2-8°C. мікротитраційні лунки повинні зберігатись при 2-8°C. Після відкриття набір знову повинен бути герметично закритим.

Підготовка реагентів

Перед використанням приведіть всі реагенти та необхідну кількість стрипів до кімнатної температури.

Стандарти

Розведіть ліофілізований вміст флаконів стандартів 0,75 мл дистильованої води.

Примітка: розведені стандарти стабільні 3 дні при 2-8°C. При довшому зберіганні заморозьте до -20°C.

Промивний розчин

Додайте деіонізовану воду до 40x концентрованого промивного розчину.

Розбавити 30 мл концентрованого промивного розчину 1170 мл деіонізованої води до кінцевого об'єму 1200 мл.

Розбавлений промивний розчин стабільний 2 тижні при кімнатній температурі.

4.4 Знищення набору

Знищення набору повинно проводитися відповідно до місцевих вимог. Спеціальна інформація для цих продуктів вказана в Паспорті Безпеки.

4.5 Пошкодження набору

При пошкодженні набору чи його компонентів необхідно повідомити в письмовій формі виробника на протязі одного тижня після отримання продукту. Окремі пошкодженні компоненти не слід використовувати.

5. ЗБІР ТА ПІДГОТОВКА ЗРАЗКІВ

В цьому аналізі може використовуватись сироватка та плазма (ЕДТА, гепарин, або цитратна). Не використовувати сильно гемолізовані чи ліпемічні зразки.

Примітка: зразки, які містять азид натрію, не повинні використовуватись в аналізі.

5.1 Збір матеріалу для дослідження

Сироватка:

Проведіть збір крові венопункцією (напр. Sarstedt Monovette # 02.1388.001); дозвольте їй зсістись; і відділіть сироватку, центрифугуючи при кімнатній температурі. Не центрифугуйте до повного зсідання крові. Пацієнтам, які проходять терапію антикоагулянтами, може знадобитися більше часу для зсідання крові.

Плазма:

Цілісну кров необхідно забрати в центрифужні пробірки, які містять антикоагулянти і центрифугувати негайно після забору. (Наприклад, для EDTA плазми - Sarstedt Monovette – червона кришка - # 02.166.001; для гепаринової плазми - Sarstedt Monovette – оранжева кришка - # 02.165.001; для цитратної плазми - Sarstedt Monovette – зелена кришка - # 02.167.001).

Сеча:

Загальний об'єм сечі за 24 години повинен бути змішаний в єдиному контейнері.

Примітка: зразки повинні зберігатись при 2-8°C 24 години і потрібно підрахувати загальний об'єм сечі.

5.2 Зберігання та підготовка зразків

Сироватка / плазма:

Зразки повинні бути закриті і в такому виді можуть зберігатись при 2-8°C до 24 години перед аналізом. Для довшого зберігання зразки повинні бути заморожені до -20°C. Після розмороження зразки необхідно кілька разів легко потрясти перед дослідженням.

Сеча:

Розділіть на рівні частини зразок, який добре перемішуються перед аналізом. Відцентрифугуйте зразок. Зразки сечі можуть зберігатись до 36 годин при 2-8°C перед аналізом.

Для довшого зберігання зразки повинні бути заморожені до -20°C.

5.3 Розведення зразків

Якщо при початковому дослідженні зразки вищі ніж найвищий стандарт, зразки можуть бути розбавлені розчинником зразків і повторно проаналізовані, як описано в Процедурі Аналізу.

Наприклад:

а) розведення 1:10: 10 мкл зразка + 90 мкл розчинника зразків (ретельно перемішайте)

б) розведення 1:100: 10 мкл розбавленого 1:10 зразка + 90 мкл розчинника зразків (ретельно перемішайте).

Зразки сечі

Перед аналізом розвести зразки сечі **1:20** розчинником зразків.

6. ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

6.1 Загальні зауваження

- Приведіть всі реагенти до кімнатної температури перед початком дослідження. Всі реагенти змішуйте без піноутворення.
- Після початку дослідження всі кроки повинні виконуватись без затримки.
- Використовуйте нові насадки для піпеток перед кожним використанням.
- Абсорбція залежить від температури і часу інкубації. Тому, перед початком дослідження необхідно прослідкувати, щоб все було готово: ковпачки зняті, реагенти приготовлені, лунки позначені і таке інше. Це дозволить проводити всі кроки за однакові інтервали часу.
- Якщо абсорбція виходить вища чи нижча, ви можете зменшити або подовжити час інкубації кінцевої ферментативної реакції формування забарвлення відповідно до потреб. За загальним правилом ферментативна реакція прямо пропорційна часу і температурі інкубації.

6.2 Процедура аналізу

Кожна процедура повинна включати калібрувальну криву.

- Закріпіть в штативі рамки необхідну кількість лунок.
- Додайте у відповідні лунки по **100 мкл** кожного зі стандарту, контролів і зразків, **використовуючи нові наконечники**.
- Внесіть по **50 мкл** антисироватки в кожну лунку.
- Внесіть по **100 мкл** ферментного кон'югату у кожну лунку. Ретельно перемішайте 10 секунд. Важливим є повне змішування на даному етапі.
- Інкубуйте **60 хв** при кімнатній температурі зі струшуванням (400-500 об/хв).
- Видаліть вміст лунок. Промийте лунки 3 рази розведеним промивним розчином (400 мкл на лунку). Різно вдарте лунками по абсорбуючому папері для видалення залишків води.
Важливе зауваження:
Чутливість і точність аналізу залежать від правильного виконання процедури промивання.
- Додайте по **100 мкл** ферментного комплексу в кожну лунку.
- Інкубуйте **30 хв** при кімнатній температурі зі струшуванням (400-500 об/хв).
- Видаліть вміст лунок. Промийте лунки 3 рази розведеним промивним розчином (400 мкл на лунку). Різно вдарте лунками по абсорбуючому папері для видалення залишків води.
- Додайте **100 мкл** розчину субстрату в кожну лунку.
- Інкубуйте **20 хв** при кімнатній температурі.
- Зупиніть ферментативну реакцію, додавши **100 мкл** стоп розчину в кожну лунку.
- Визначте абсорбцію кожної лунки при **450±10 нм впродовж 10 хв** після додавання стоп-розчину.

6.3 Вирахування результатів

- Визначте значення середньої абсорбції для кожного набору стандартів, зразків і контролів.
- Побудуйте стандартну криву, відкладаючи середню абсорбцію для кожного стандарту на У-вісі проти відповідних концентрацій на Х-вісі.
- Використовуючи значення середньої абсорбції для кожного зразка, визначте відповідну концентрацію зі стандартної кривої. Опрацювання даних може проводитись і іншими методами, в залежності від досвіду.
- Автоматичний метод: можна використовувати комп'ютерні програми з використанням кубічної регресії, 4 параметрову логістику.
- Концентрація зразків може бути визначена зі стандартної кривої. Зразки з концентрацією вище найвищого стандарту повинні бути розведені, або вказуватись як > 16 нг/мл. Для калькуляції концентрацій до уваги слід брати цей коефіцієнт розведення.

6.3.1 Приклад типової калібрувальної кривої

Наступні дані тільки для демонстрації і не можуть використовуватись замість даних під час дослідження.

Стандарт	Оптичні одиниці (450 нм)
Стандарт 0 (0 нг/мл)	1,82
Стандарт 1 (0,2 нг/мл)	1,64
Стандарт 2 (0,7 нг/мл)	1,46
Стандарт 3 (2,0 нг/мл)	1,02
Стандарт 4 (6,0 нг/мл)	0,47
Стандарт 5 (16 нг/мл)	0,21

7. ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ НОРМИ

Наполегливо рекомендується, щоб кожна лабораторія встановлювала свої межі С-пептиду. Даними, отримані за допомогою цього набору у нормальних чоловіків та жінок наступні:

	n	Середнє +/- Стандартне Відхилення
Сироватка (після 12-год голодування)	60	0,5-3,2 нг/мл
Сеча		1-200 мкг/день

8. КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Рекомендовано використовувати контролі відповідно до державного і федерального регулювання. Використання контролів дає можливість оцінки результатів. Використовуйте контролі при нормальних і патологічних значеннях. Контролі і відповідні результати QC-лабораторії вказані в QC сертифікаті. Значення вказані в даному сертифікаті відповідають лоту набору і повинні використовуватись для прямого порівняння результатів.

Також рекомендується використовувати національні і міжнародні програми оцінки якості.

Для встановлення середніх значень і допустимих коливань необхідно прослідкувати статистично достовірну кількість контролів.

Якщо результати не попадають у відповідний діапазон контрольних матеріалів, результати пацієнтів повинні вважатись не вірними.

В такому випадку перевірте відповідні технічні дані: піпетування і часовий пристрій, фотометр, дата придатності реагентів, умови зберігання і умови інкубації, методи аспірації і промивання.

Якщо при перевірці вище вказаних одиниць не знайдено помилок, зв'яжіться з Вашим дистриб'ютером.

9. РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

9.1 Динамічний діапазон аналізу

Діапазон аналізу знаходиться між 0,06-16 нг/мл.

9.2 Специфічність антитіл (перехресна реактивність)

Перехресна реактивність інтактного або спліт-проінсуліну є клінічно незначною.

9.3 Чутливість

Аналітична чутливість цього набору була визначена за мінусом 2 стандартних відхилень від середнього значення 20 реплікатів аналізів нульового стандарту і склала 0,064 нг/мл.

9.4 Відтворюваність

9.4.1 Варіативність в аналізі

Сироватка	N	Середнє нг/мл	КВ %
1	20	0,48	6,54
2	20	2,30	6,70
3	20	3,86	5,13

9.4.2 Варіативність між аналізами

Сироватка	N	Середнє нг/мл	КВ %
1	12	0,42	9,33
2	12	2,05	9,92
3	12	4,23	8,38

9.5 Відтворюваність

(Див. таблицю в оригіналі інструкції).

9.6 Лінійність

(Див. таблицю в оригіналі інструкції).

10. ОБМЕЖЕННЯ ПРОЦЕДУРИ

Будь-яка неналежна робота зі зразками чи зміна дослідження може впливати на результати.

10.1 Впливаючі речовини

Гемоглобін (до 4 мг/мл), білірубін (до 0,5 мг/мл) і тригліцериди (до 30 мг/мл) не впливають на результати аналізу.

11. ПРАВОВІ АСПЕКТИ

11.1 Достовірність результатів

Тест необхідно проводити точно у відповідності з інструкцією виробника. Також користувачу необхідно слідувати правилам техніки безпеки, національним стандартам. Особливо це стосується використання контрольних реагентів.

Тестові результати вважаються достовірними, якщо контролі знаходяться в указаних межах і якщо інші тестові параметри також відповідають тестовій специфікації.

11.2 Терапевтичні висновки

Терапевтичні висновки не повинні базуватись на результатах одного дослідження і повинні враховувати всю клінічну картину пацієнта.

Тільки якщо лабораторні дані повністю збігаються з клінічною картиною, можна встановлювати терапевтичні висновки для пацієнта.

11.3 Надійність

Будь-які зміни дослідження чи зміна компонентів різних лотів може негативно відобразитись на результатах дослідження. Такі зміни та модифікації не можуть бути приводом для заміни набору.

Будь-які пошкодження набору при транспортуванні не відносяться до відповідальності виробника.

ЛІТЕРАТУРА

(Див. в оригіналі інструкції).

ІНФОРМАЦІЯ ДЛЯ ЗАМОВЛЕННЯ:

ПМП «ДІАМЕБ»

вул. Чорновола, 97, м. Івано-Франківськ, 76005

тел.: (0342) 775122. факс: (0342) 775612

E-mail: info@diameb.ua

www.diameb.ua