



## ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ НАБОР ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИНСУЛИНОПОДОБНОГО ФАКТОРА РОСТА 1 (IGF-1)

Тест для количественного определения инсулиноподобного фактора роста 1 (IGF-1) в сыворотке или плазме человека

Кат. №: AC-27F1  
Производитель: Immunodiagnostic Systems Ltd (IDS Ltd)

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

Методика от 07-09-2010  
Версия 16

Для использования in-Vitro диагностике

### НАЗНАЧЕНИЕ

Только для диагностики *in vitro*

Набор OSTEIA® IGF-1 предназначен для количественного определения инсулиноподобного фактора роста 1 (IGF-1) в сыворотке или плазме человека иммуноферментным «сэндвич» методом. В методе предусматривается предварительная обработка образцов для предотвращения влияния связывающих белков.

### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ И ОБЪЯСНЕНИЕ

Инсулиноподобный фактор роста 1 (IGF-1) – это полипептид, состоящий из 70 аминокислот (7650 Дальтон), один из множества циркулирующих инсулиноподобных факторов роста. Последовательность молекулы IGF-1 примерно на 50% гомологична молекуле проинсулина и обладает многими биологическими активностями, подобными инсулину. Пептид в большой степени является гормон роста (GH) зависимым, но накапливаются данные о его GH-независимой секреции. IGF-1 обладает многими свойствами, стимулирующими рост, включая митогенные эффекты и усиление сульфатирования в хряще. Он также является медиатором способствующего росту воздействия гормона роста в синовиальной и других биологических жидкостях. Почти весь (>95%) сывороточный IGF-1 циркулирует в связанном с IGF-связывающими белками виде. В настоящий момент классифицировано 6 классов таких белков (IGF-BP 1-6). BP3 считается основным IGF-1связывающим белком, образующим комплекс их трех элементов, с массой 140 000 Дальтон, содержащий IGF-1и кислото-лабильную субъединицу. Измерения уровня IGF-1 в сыворотке значимы у детей при нарушениях роста и при диагностике и мониторинге акромегалии. Изменения в концентрации IGF-1 связаны с возрастом, состоянием питания, конституцией, секрецией гормона роста. Единичное определение базового уровня IGF-1 могут быть полезны при оценке маленького роста у детей и при изучении дополнительного питания тяжелобольных. При диагностике акромегалии, единичное определение IGF-1 считается более надежным, чем произвольные определения GH.

### ПРИНЦИП МЕТОДА

Образцы сывороток пациентов в течение короткого периода инкубируют с реагентом для инактивации связывающих белков, а затем разводят для проведения анализа. В методе OSTEIA® IGF-1 очищенные поликлональные овечьи антитела сорбированы в лунках микропланшета (твердая фаза или «захватывающие» антитела). Предварительно обработанные и разведенные образцы инкубируют в лунках микропланшета, вместе с моноклональными анти-IGF-1 антителами, меченными пероксидазой хрена, в течение 2 часов при комнатной температуре. Затем лунки промывают и вносят однокомпонентный хромощенный субстрат (раствор тетраметилбензидина) для развития окраски. Абсорбцию остановленной реакционной смеси считывают с помощью микропланшетного спектрофотометра, интенсивность развившегося окрашивания прямо пропорциональна количеству IGF-1, присутствовавшего в образце.

### ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

Набор OSTEIA® IGF-1 предназначен только для диагностики *in vitro* и не должен быть использован для внутреннего употребления людьми или животными. Данный продукт должен быть использован в строгом соответствии с инструкциями, поставляемыми с набором. Производитель не несет никакой ответственности за какие-либо потери или повреждения (за исключением предписанных законом), независимо от того, чем это было вызвано, проистекающих из-за несоответствия поставляемой инструкции.

**ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ:** данный набор содержит материалы человеческого и/или животного происхождения. Обращайтесь с реагентами набора как с потенциально инфекционно опасными или способными переносить инфекционные агенты.

При хранении, работе и утилизации реагентов набора необходимо соблюдать соответствующие меры безопасности и правила хорошей лабораторной практики. Утилизация реагентов набора должна проводиться в соответствии с локальными правилами.

**Человеческая сыворотка:** Стандарты «CAL» и Контроли «CTRL»

При приготовлении этих продуктов были использованы материалы человеческого происхождения, протестированные методами, рекомендованными FDA, на присутствие антител к вирусу иммунодефицита человека (HIV I и II), поверхностного антигена гепатита В, антител к гепатиту С, для них были получены отрицательные результаты. Так как не существует метода, полностью гарантирующего отсутствие инфекционных агентов, с реагентами необходимо обращаться согласно уровню 2 биобезопасности.

### Азид натрия

Некоторые реагенты данного набора содержат азид натрия в качестве консерванта, он может реагировать со свинцом, медью или латунью водопроводных труб, с образованием взрывоопасных азидов металлов. При утилизации смывайте большими количествами воды для предотвращения накопления азидов.

### Тетраметилбензидин

Субстрат TMB «SUBS» содержит 3,3',5,5'-тетраметилбензидин. R21/22 вредное вещество при контакте с кожей и при проглатывании. S36/37 одевайте соответствующую защитную одежду и перчатки.

### 1M раствор серной кислоты

Стоп-раствор H2SO4 содержит 1M серную кислоту. R36/38 вызывает раздражение глаз и кожи. S26 при контакте с глазами немедленно промойте большим количеством воды и обратитесь к врачу. S36/37 одевайте соответствующую защитную одежду и перчатки.

### ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

**Стандарты «CAL» и Контроли «CTRL»:** Стандарты «CAL» и Контроли «CTRL» поставляются лиофилизированными. Растворите в 0.5 мл дистиллированной или деионизированной воды, закройте крышкой и оставьте на 10-15 минут при комнатной температуре. Переверните несколько раз, убедитесь в полном растворении. Если Стандарты «CAL» или Контроли «CTRL» предполагается использовать более одного раза, они должны быть своевременно заморожены (-20°C, < чем через 30 минут после растворения). При использовании замороженных Стандартов «CAL» и Контролей «CTRL» они должны оттаять при комнатной температуре, при перемешивании, и использованы в течение 15 минут после полного оттаивания.

**Буфер для промывок:** Добавьте к содержимому каждого флакона с 20x концентратом буфера для промывок «WASHBUF» по 950 мл дистиллированной или деионизированной воды и перемешайте. Храните при комнатной температуре. Все остальные реагенты поставляются готовыми к использованию. Перед использованием все реагенты должны достичь комнатной температуры. Реагенты должны быть перемешаны повторным переворачиванием перед началом анализа.

### Срок годности и хранение реагентов

При соблюдении указанных условий хранения данный набор стабилен до истечения срока годности. После получения храните все реагенты при 2-8°C. Растворенные Стандарты «CAL» и Контроли «CTRL» могут храниться при -20°C в течение 8 недель.

**Признаки порчи реагентов**

1. Присутствие необычных твердых частиц в любом реагенте.
2. Снижение максимума абсорбции.
3. Смещение наклона кривой от ее нормального положения.

**СБОР И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ**

Данным методом должны анализироваться образцы сыворотки или плазмы. Сыворотка или плазма должны быть отделены как можно быстрее после взятия образцов крови. Для длительного хранения образцы должны быть заморожены при  $-20^{\circ}\text{C}$ . Избегайте повторных циклов замораживания/оттаивания.

*Замечание: Неправильное хранение или подготовка образцов могут приводить к потере определяемого IGF-1.*

**РЕАГЕНТЫ, ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ НАБОРА****1. CAL 0 - 5 - стандарты**

(кат. № AC-2701A - AC-2701F):

Лиофилизованная человеческая сыворотка, содержащая IGF-1 и 0.09% азид натрия. Точные значения всех стандартов указаны на этикетке флаконов, 0.5 мл во флаконе, 6 флаконов в наборе.

**2. MICROPLAT – микропланшет, покрытый антителами (кат. № AC-2702W):**

Микропланшет, в лунках которого сорбированы овечьи поликлональные анти-IGF-1 антитела, 12 x 8-луночных стрипа с пакете из фольги с осушителем.

**3. ENZYMCONJ – Ферментный конъюгат (кат. № AC-2703):**

Фосфатный буфер, содержащий мышинные моноклональные анти-IGF-1 антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена, содержит белок, ферментные стабилизаторы и консервант. 22 мл во флаконе.

**4. CTRL 1 - 2 – Контроли (кат. № AC-2705A - AC-2705B):**

Лиофилизованная человеческая сыворотка, содержащая IGF-1 и 0.09% азида натрия, 0.5 мл во флаконе, 2 флакона в наборе.

**5. H2SO4 – Стоп-раствор (кат. № AC-2706):**

1M серная кислота, 12 мл во флаконе.

**6. RELEASREAG – Высвобождающий реагент**

(кат. № AC-2707):

Запатентованный реагент для диссоциации IGF-1 из комплексов со связывающими белками, 21 мл во флаконе.

**7. SUBS – субстрат TMB (кат. № AC-SUBS):**

Запатентованный водный раствор тетраметилбензидина (TMB) и перекись водорода, 30 мл во флаконе.

**8. SAMPDIL – Буфер для разведения образцов (кат. № AC-270B):**

Фосфатный буфер с консервантом, 50 мл во флаконе.

**9. WASHBUF 20x – Буфер для промывок (кат. № AC-WASHL):**

Фосфатный буфер, содержащий Твин, 50 мл во флаконе.

**НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ**

1. Одноразовые пластиковые пробирки 12 x 75 мм.
2. Калиброванные пипетки объемом 25 мкл и 50 мкл.
3. Диспенсеры для внесения 100 мкл и 1 мл.
4. Многоканальные пипетки на 100 и 200 мкл.
5. Вортекс.
6. Автоматический микропланшетный вошер (опция).
7. Микропланшетный спектрофотометр и оборудование для расчета результатов.

**ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА**

Перед выполнением анализа растворите или приготовьте реагенты, как описано в разделе «Подготовка реагентов».

1. Приготовьте подписанные пластиковые пробирки, по одной для каждого стандарта «CAL», контроля «CTRL» и образца.
2. Внесите по **25 мкл** каждого стандарта «CAL», контроля «CTRL» или образца в соответствующим образом помеченную пробирку.
3. Внесите по **100 мкл** высвобождающего реагента «RELEASREAG» в каждую пробирку. Перемешайте на вортексе содержимое каждой пробирки. Инкубируйте при  $18-25^{\circ}\text{C}$  в течение 10 минут.

4. Внесите по **1.0 мл** буфера для разведения образцов «SAMPDIL» в каждую пробирку. Перемешайте на вортексе содержимое каждой пробирки. Теперь образцы готовы к анализу.

5. Внесите по **50 мкл** каждого разведенного стандарта, контроля или образца в соответствующую лунку микропланшета «MICROPLAT», в дублях.

*Замечание: для минимизации дрейфа все пробы необходимо внести в лунки в течение 10 минут.*

6. Внесите по **200 мкл** ферментного конъюгата «ENZYMCONJ» во все лунки, используя многоканальную пипетку. Инкубируйте при  $18-25^{\circ}\text{C}$  в течение от 2 часов до 2 часов 15 минут.

7. Промойте все лунки 3 раза буфером для промывок:

a. При использовании автоматического вошера: установите программу вошера на внесение не менее **300 мкл** буфера для промывок в каждую лунку. Установите 3 цикла наполнения и аспирации.

b. При ручной промывке: Удалите полностью содержимое всех лунок, резко перевернув микропланшет. Внесите по **250 мкл** буфера для промывок в каждую лунку, во все лунки. Удалите буфер и повторите промывку еще 2 раза.

Постучите перевернутый микропланшет по фильтровальной бумаге для удаления остатков буфера для промывок перед тем, как перейти к следующему шагу процедуры.

8. Внесите по **200 мкл** субстрата TMB «SUBS» во все лунки, используя многоканальную пипетку. Инкубируйте при  $18-25^{\circ}\text{C}$  в течение 30 минут.

*Замечание: Субстрат TMB легко загрязняется. Налейте из флакона в чистую емкость необходимое для анализа количество субстрата. Выбросьте неиспользованный субстрат из емкости. Не возвращайте его обратно и 1074 во флакон.*

9. Внесите по **100 мкл** стоп-раствора  $\text{H}_2\text{SO}_4$  во все лунки, используя многоканальную пипетку.

10. Измерьте абсорбцию каждой лунки при длине волны 450 нм (длина волны сравнения 650 нм) используя микропланшетный спектрофотометр, не позднее, чем через 30 минут после внесения стоп-раствора.

**Калибровка**

Данный метод IGF-1 был прокалиброван по Международному референсному стандарту инсулин-подобного фактора роста 1, IGF-1, код 87/518.

**Контроль качества**

Для обеспечения повседневной достоверности результатов рекомендуется регулярно использовать контрольные образцы с различными уровнями аналита. В наборе поставляются контроли двух уровней. Контроли должны тестироваться также, как образцы с неизвестным содержанием аналита. Для наблюдения за выполнением метода необходимо вести графики контроля качества.

**Расчет результатов**

Рассчитайте среднюю абсорбцию (ОП) для каждого стандарта, контроля и исследуемого образца. Постройте калибровочную кривую, используя логарифмическую графическую бумагу (log-log). По оси ординат откладывайте значение средней ОП, полученной для каждого стандарта, а по оси абсцисс – соответствующую ему концентрацию стандарта IGF-1. Используя калибровочную кривую, рассчитайте значения контролей и тестируемых образцов. Для определения низких концентраций рекомендуется построить калибровочную кривую в линейных координатах (на линейной графической бумаге), абсорбция против концентрации, используя стандарты с низкими концентрациями. Результаты для тестируемых образцов могут быть получены непосредственно из калибровочной кривой.

Могут быть использованы другие методы расчета результатов, но в этих случаях пользователи должны самостоятельно подтвердить, что выбран подходящий метод аппроксимации кривой и что он дает приемлемые результаты. Рекомендуемый метод аппроксимации – гладкий сплайн.

Преобразование единиц:

$$X \text{ мкг/л} \quad \begin{matrix} \times 0.131 \Rightarrow \\ \leftarrow \times 7.63 \end{matrix} \quad Y \text{ нмоль/л}$$

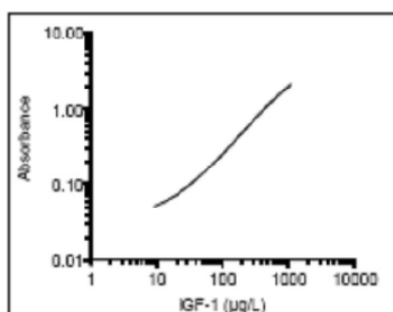
**Пример результатов измерений**

Данные приведены только в целях иллюстрации и не должны использоваться для каких-либо расчетов результатов тестирования.

Лунка	Тип анализита	Абсорбция, дубли	Средняя ОП	результат (мкг/л)
A1, A2	стандарт 0 (0 мкг/л)	0,060 0,060	0,060	
B1, B2	Стандарт 1 (16 мкг/л)	0,108 0,114	0,111	
C1, C2	Стандарт 2 (32 мкг/л)	0,152 0,152	0,152	
D1, D2	Стандарт 3 (107 мкг/л)	0,347 0,357	0,352	
E1, E2	Стандарт 4 (357 мкг/л)	0,923 0,933	0,928	
F1, F2	стандарт 5 (1137 мкг/л)	2,231 2,238	2,235	
G1, G2	образец 1	0,253 0,263	0,258	71
H1, H2	образец 2	0,664 0,698	0,681	244

#### Пример типичной калибровочной кривой

Данный пример приводится только для иллюстрации.



#### Ограничения метода

- Образцы с содержанием анализита выше, чем в самом высоком стандарте, должны тестироваться после дополнительного разведения.
- Как и в случае любых диагностических процедур, результаты должны интерпретироваться только в связи с клиническими проявлениями и другой информацией о состоянии пациента, доступной врачу.
- Были протестированы следующие вещества и показано отсутствие их влияния на результаты тестирования методом OSTEIA® IGF-1:  
Гемоглобин – протестирован с концентрацией до 500 мг/дл.  
Билирубин – протестирован с концентрацией до 30 мг/дл.  
Липиды – протестированы с концентрацией до 4000 мг/дл триглицеридов.
- Присутствие Хук-эффекта тестировали с использованием концентрации IGF-1 до 5,000 мкг/л. При таких концентрациях Хук-эффект не наблюдался.

#### Ожидаемые значения

Используя данный метод OSTEIA® IGF-1 были получены следующие диапазоны значений. Они приводятся только как рекомендации. Каждая лаборатория должна самостоятельно определить диапазоны ожидаемых значений для локальной популяции.

	Возраст (годы)	n	мкг/л
Нормальные значения	<1	10	12 - 108
	1 - 3	14	13 - 100
	>3 - 6	19	26 - 280
	>6 - 9	16	85 - 230
	>9 - 12	25	98 - 404
	>12 - 15	17	142 - 525
	>15 - 20	14	146 - 415
	>20 - 30	18	89 - 276
	>30 - 40	18	22 - 197
	>40 - 50	18	49 - 147
>50 - 60	26	35 - 210	
>60 - 70	25	30 - 196	
	>70	11	56 - 191
Акромегалия		10	340 - 635

*Замечание: Ожидаемые значения, представленные для каждого типа образцов являются абсолютными диапазонами –каждый диапазон от минимального значения до максимального значения, для каждого образца соответствующего типа.*

#### ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗА

##### Точность

Данный метод OSTEIA® IGF-1 был сравнен с другим методом, основанным на «сэндвич» радиоиммунном анализе, предназначенном для количественного определения IGF-1. Выборка из 67 образцов, со значениями IGF-1 в широком диапазоне [12-627 мкг/л], была протестирована каждым методом. Был проведен регрессионный анализ методом наименьших квадратов для сравнения полученных данных;  
 $y = 0.45 [x] - 11.82$ ; коэффициент корреляции ( $r$ ) = 0.94.

##### Воспроизводимость

Воспроизводимость внутри серии (n=20)		Воспроизводимость между сериями (n=38)	
Среднее значение (мкг/л)	%CV	Среднее значение (мкг/л)	%CV
22,9	7,2	26,7	6,5
132	5,1	145	5,7
273	4,6	287	4,3

##### Чувствительность

Чувствительность, определяемая как концентрация, соответствующая среднему значению, полученному для 20 реплик стандарта «0», плюс 2 стандартных отклонения, составила 3.1 мкг/л.

##### Линейность

Линейность оценивали разведением образцов стандартом « 0 » перед исследованиями.

Образец	Измеренное (мкг/л)	Ожидаемое (мкг/л)	% И/О
А	61,0	-	-
0,875А+0,125В	82,1	83,8	98
0,750А+0,250В	106	107	100
0,625А+0,375В	129	129	100
0,500А+0,500В	145	152	95
0,375А+0,625В	174	175	100
0,250А+0,750В	203	198	103
0,125А+0,875В	225	221	102
В	244	-	-
		Среднее	99

#### Инактивация IGF-1 связывающих белков

35 образцов с концентрациями IGF-1 в диапазоне 10.5 –512 мкг/л были проанализированы, сравнивали экстракцию кислота-этанол и acid-ethanol extraction и IDS высвобождающий реагент. Результаты экстракции кислота-этанол составили 92.9% от результатов, полученных с использованием высвобождающего реагента (CV 20.5%).

#### Извлечение

Извлечение оценивали при добавлении IGF-1 к образцам перед исследованиями.

Концентрация в образце, (мкг/л)	Добавленный IGF-1, (мкг/л)	Измеренная концентрация (мкг/л)	Извлечение (мкг/л)	Извлечение (%)
221	300	526	305	102
231	300	506	275	92
187	300	456	269	90
			Среднее	95

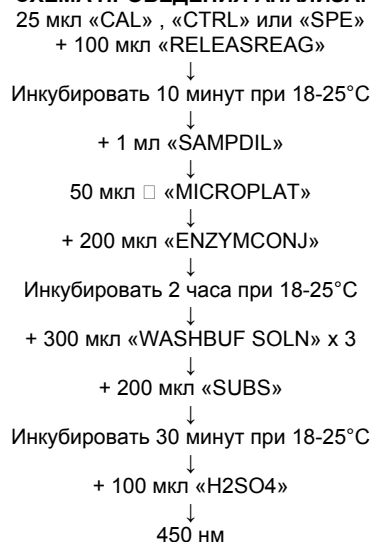
#### Специфичность

Потенциально обладающие перекрестной реактивностью и влияющие вещества, такие как IGF-2, инсулин и проинсулин, были протестированы с концентрациями добавленного IGF-2 до 4,444 мкг/л, инсулина – до 25 МЕд/л и проинсулина – до 1000 мкг/л к стандартам «0» и «150» мкг/л. Не наблюдалось какой-либо интерференции.

#### ЛИТЕРАТУРА

(См. в оригинале инструкции).

#### СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА:



#### ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА

ООО «БиоТехЛаб-С»

ул. Черновола, 97,

г. Ивано-Франковск, 76005

тел./факс: (0342) 52-57-10

80681043216 (безлимит)

E-mail: [info@biotechlab-s.com](mailto:info@biotechlab-s.com)

[www.biotechlab-s.com](http://www.biotechlab-s.com)