

НАБІР РЕАГЕНТІВ

ІНСУЛІН ELISA

Insulin ELISA

Каталог. №: **EIA-2935**

Дата випуску інструкції: **2016/02**
Версія **9.0**



Основою при проведенні аналізу є оригінал інструкції англійською мовою, вкладеної в набір. Номер і дата версії оригіналу та перекладу інструкції повинні співпадати.

1. ПРИЗНАЧЕННЯ

Справжній набір призначений для кількісного визначення інсуліну в сироватці і плазмі (гепаріновою або EDTA плазма).

ВСТУП

Інсулін - це гормон, відповідальний за контроль метаболізму глюкози. Він синтезується в β -клітинах острівців Лангерганса, як проінсулін, який перетворюється в С-пептид і інсулін. Вони секретуються в еквімолярних кількостях в порталний кровотік. Дозрілі молекули інсуліну складаються з двох поліпептидних ланцюгів: А ланцюг і В ланцюг (21 і 30 амінокислот, відповідно). Два ланцюжка зв'язуються разом з допомогою двох дисульфідних містків. Також є внутрішньо- ланцюговий дисульфідний місток в А ланцюзі.

Секреція інсуліну в основному контролюється концентрацією глюкози в плазмі. Основна функція - це контроль за доставкою та переробкою глюкози в периферичних тканинах. Така гіпоглікемічна активність врівноважується гіперглікемічними гормонами, в тому числі глюкагоном, адреналіном, гормоном росту і кортизолом.

Концентрація інсуліну сильно знижується при інсулін-залежному діабеті (IDDM), і при деяких інших умовах, таких як гіполітуїтаризм. Рівень інсуліну зростає при неінсулін-залежному діабеті (NIDDM), при ожирінні, інсуліномі і деяких ендокринних дисфункціях, таких як синдром Кушинга та акромегалія.

2. ПРИНЦИП МЕТОДУ

Набір DRG Інсулін ELISA є твердофазним ферментно-зв'язуючим імуносорбентним аналізом (ELISA) типу сендвіч.

Мікропланшетні лунки покриті моноклональним антитілом, спрямованим проти унікальної антигенної сторони на молекулі інсуліну.

Аліквота сироватки пацієнта, що містить ендогенні інсуліну, інкубується в лунках, покритих ферментним кон'югатом, який є антитілом анти-інсуліну, кон'югованим біотином. Після інкубації незв'язаний матеріал вимивається. Під час другої інкубації ферментний комплекс стрептавідин-пероксидаза зв'язується з антитілом біотин-анти-інсулін. Кількість пов'язаного HRP комплексу пропорційна концентрації інсуліну в зразку. Після додавання розчину субстрату, інтенсивність забарвлення, що розвинулося, пропорційна концентрації інсуліну в зразку пацієнта.

3. ПЕРЕСТОРОГИ І ПОПЕРЕДЖЕННЯ

1. Тільки для діагностичного використання "in-vitro". Для використання тільки кваліфікованим персоналом.
2. 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.
3. Перед початком аналізу повністю та уважно прочитати інструкцію. Використовувати дійсну версію інструкції. Впевніться, що все зрозуміло.
4. Мікропланшет складається з відривних смужок. Невикористані лунки зберігати при 2-8 °С запакованими, та використовувати рамку, яка постачається.
5. Піпетування взірців та реагентів проводити як можна швидше та з однаковими інтервалами для кожного кроку.
6. Використовувати пробірки тільки для одного реагенту. Це особливо відноситься до пробірок з субстратами. Використання резервуару для дозування розчину субстрату, який раніше був використаний для кон'югатного розчину, може призвести до забарвлення розчину. Не виливайте реагенти назад у флакон, оскільки забруднення може статися.
7. Змішуйте вміст лунок мікропланшетів повністю, щоб забезпечити хороші результати тесту. Не використовуйте повторно лунки.

8. Не дозволяйте лункам висихати під час аналізу; додавати реагенти негайно після закінчення полоскання.
9. Дозволити реагентам досягти кімнатної температури (21-26 °С) до початку тесту. Температура може вплинути на значення оптичної щільності.
10. Не піпетуйте реагенти ротом і уникайте контакту реагентів і зразків з шкірою і слизовими.
11. Не їжте, не пийте і не куріть в приміщеннях, де використовуєте зразки чи реагенти.
12. Одягайте рукавички при роботі із зразками і реагентами. Мікробіологічне забруднення реагентів чи зразків може дати помилкові результати.
13. Використання набору повинно проводитись згідно з вимогами по техніці безпеки.
14. Не використовуйте реагенти після закінчення терміну придатності.
15. Необхідно дотримуватись об'ємів, вказаних в інструкції. Оптиміальні результати будуть отримані при використанні каліброваних піпеток.
16. Не змішуйте реагенти різних серій і різних наборів, оскільки ці набори могли транспортуватись чи зберігатись при різних умовах.
17. Щодо інформації відносно небезпечних речовин дивіться Паспорт Безпеки Матеріалів.
18. Хімічні речовини і приготовлені чи використані реагенти повинні бути оброблені відповідно до вимог по техніці безпеки.
19. Паспорт Безпеки Матеріалів доступний за запитом.

4. РЕАГЕНТИ

4.1 Реагенти, які постачаються

1. **Мікротитрові лунки**, 12 x 8 стрипів, 96 лунок на планшеті, покритих моноклональними антитілами анти-інсуліну
2. **Нульовий Стандарт**, 1 флакон, 3 мл, готовий до використання. 0 мкМО/мл. Містить нертутний консервант.
3. **Стандарт (1-5)**, 5 флаконів, 1 мл. Готові до використання. Концентрації: 6.25-12.5-25-50 і 100 мкМО/мл.
Конверсія: мкМО/мл x 0.0433 = нг/мл,
Нг/мл x 23.09 = мкМО/мл
Стандарти калібровані проти референтного матеріалу NIBSC 66/304. Містять нертутний консервант.
4. **Ферментний кон'югат**, 1 флакон, 5 мл, готовий до використання. моноклональне антитіло анти-інсуліну миші, кон'юговане з біотином. Містить нертутний консервант.
5. **Ферментний Комплекс**, 1 флакон, 7 мл, готовий до використання, комплекс Стрептавідин-Пероксидаза хрому
Містить нертутний консервант.
6. **Розчин субстрату**, 1 флакон, 14 мл. Готовий до використання. Містить 0.5M H₂SO₄. Уникайте контакту зі стоп-розчином. Може викликати опіки і подразнення.
7. **Стоп-розчин**, 1 флакон, 14 мл. Готовий до використання. Містить 0.5M H₂SO₄. Уникайте контакту, це може викликати подразнення шкіри та опіки.
8. **Промивний розчин**, 1 флакон, 30 мл (40X концентрат). (Див. «Підготовка реагентів»).

Зауваження: Додатковий *Нульовий Стандарт* для розведення зразків доступний за запитом.

4.2 Необхідні матеріали та обладнання, які не постачаються

- Мікротитровий планшетний відкалібрований рідер (450±10 нм).
- Відкалібровані мікропіпетки змінного об'єму.
- Абсорбуючий папір.
- Дистильована або деіонізована вода.
- Таймер.
- Графічний папір або ПЗ для обробки даних.

4.3 Умови зберігання

При зберіганні при температурі 2-8 °С активність реагентів буде збережена до дати закінчення терміну придатності. Не використовуйте після цієї дати.

Відкриті реагенти та лунки повинні зберігатись при 2-8 °С.

Після відкриття мішечка із фольги треба знову його герметично закрити. Відкритий набір стабільний 8 тижнів при зберіганні, як вказано вище.

4.4 Підготовка реагентів

Перед використанням доведіть всі реагенти та потрібну кількість стрипів до кімнатної температури.

Промивний розчин

Додайте деіонізовану воду до 40X концентрованого промивного розчину. Розведіть 30 мл концентрованого Промивного Розчину з 1170 мл деіонізованої води до об'єму 1200 мл.

Примітка: розведений промивний розчин стабільний впродовж 2 тижнів при КТ.

4.5 Утилізація набору

Знищення набору повинно проводитись відповідно до вимог техніки безпеки. Спеціальна інформація для цих продуктів вказана в Листі Даних Безпеки.

4.6 Пошкодження набору

При пошкодженні набору чи його компонентів необхідно повідомити в письмовій формі виробника впродовж одного тижня після отримання виробу. Окремі пошкоджені компоненти не слід використовувати.

5. ЗАБІР І ПІДГОТОВКА ЗРАЗКІВ

Сироватка або плазма (гепаринова або ЕДТА) можуть бути використані в цьому аналізі.

Не використовувати гемолітичні, іктеричні чи ліпемічні зразки.

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

5.1 Забір зразків

Сироватка:

Проведіть забір крові венепункцією (напр. Sarstedt Monovette для сироватки); дозвольте їй згорнутись; і відділіть сироватку, центрифугуючи при кімнатній температурі. Не центрифугуйте до повного згортання крові. Пацієнтам, які проходять терапію антикоагулянтами, може знадобитися більше часу для зсідання крові.

Плазма:

Цільну кров необхідно забрати в центрифужні пробірки, які містять антикоагулянти і центрифугувати негайно після забору.

(Наприклад, для гепаринової плазми - Sarstedt Monovette).

5.2 Підготовка та зберігання зразків

Зразки повинні бути закриті і в такому вигляді можуть зберігатись при 2-8 °C до 5 днів перед дослідженням.

Для довшого зберігання (мінімум, один рік) зразки повинні бути заморожені до -20 °C. Після розморожування зразки необхідно кілька разів перевернути перед дослідженням.

5.3 Розведення зразків

Якщо при початковому аналізі зразок сироватки показує значення вище за найвищий стандарт, зразки можуть бути розведені *Нульовим Стандартом* і проаналізовані як описано в процедурі аналізу.

Для вирахування концентрації необхідно брати до уваги наступний коефіцієнт розведення.

Приклад:

Розведення 1:10: 10 мкл зразка + 90 мкл *Нульового Стандарту* (ретельно змішайте)

Розведення 1:100: 10 мкл розведення а) 1:10 + 90 мкл *Нульового Стандарту* (ретельно змішайте).

6. ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

6.1 Загальні зауваження

- Доведіть 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.
- За загальним правилом ферментативна реакція прямо пропорційна часу і температурі інкубації.

6.2 Процедура дослідження

Кожна процедура повинна включати калібрувальну криву.

1. Закріпіть необхідну кількість мікротитрових лунок у штативі рамки.
2. Додайте **25 мкл** кожного **стандарту, контролю і зразків з новим одноразовим наконечником** у відповідні лунки.
3. Додайте **25 мкл Ферментного Кон'югату** в кожну лунку. Ретельно перемішайте протягом 10 секунд. На цьому етапі важливо провести повне змішування.
4. Інкубуйте при кімнатній температурі **30 хвилин**.
5. Вилийте різко вміст лунок. Промийте лунки **3 рази** розведеним промивним розчином (400 мкл на лунку). Переверніть лунки на абсорбуючий папір для видалення залишків.

Важливе зауваження:

Чутливість і точність цього аналізу залежить від правильності проведення процедури промивання.

6. Внесіть по **50 мкл Ферментного Комплексу** в кожну лунку.
7. Інкубуйте **30 хвилин** при кімнатній температурі.
8. Вилийте різко вміст лунок. Промийте лунки **3 рази** розведеним промивним розчином (**400 мкл** на лунку). Переверніть лунки на абсорбуючий папір для видалення залишків.
9. Додайте **50 мкл Розчину Субстрату** в кожну лунку.
10. Інкубуйте протягом **15 хвилин** при кімнатній температурі (20-25 °C).
11. Зупиніть ферментативну реакцію, додавши по **50 мкл Стоп-Розчину** в кожну лунку.
12. Визначте абсорбцію (ОЩ) кожної лунки при **450±10 нм** за допомогою мікротитрового планшет-рідера. Рекомендується проводити зчитування лунок **впродовж 10 хвилин** після додавання *Стоп-Розчину*.

6.3 Розрахунок результатів

1. Визначте значення середньої абсорбції для кожного набору стандартів, зразків і контролів.
2. Побудуйте стандартну криву, відкладаючи середню абсорбцію для кожного стандарту на У-осі проти відповідних концентрацій на Х-осі.
3. Використовуючи значення середньої абсорбції для кожного зразка, визначте відповідну концентрацію зі стандартної кривої.
4. Автоматичні дані, комп'ютерні програми, кубічний сплін, 4 PL або логарифмічний також дають хороші результати.
5. Концентрація зразків може зчитуватись з стандартної кривої. Зразки з концентрацією вище найвищого стандарту необхідно розвести або вважати як > 100 мкМО/мл. При вирахуванні концентрації необхідно врахувати цей фактор розведення.

6.3.1 Приклад типової калібрувальної кривої

Наступні дані наведені тільки для наочності та **не повинні** використовуватись замість отриманих даних в процесі аналізу.

Стандарт	мкМО/мл	Оптичні одиниці (450 нм)
Стандарт 0	0	0.03
Стандарт 1	6.25	0.07
Стандарт 2	12.5	0.14
Стандарт 3	25	0.35
Стандарт 4	50	0.88
Стандарт 5	100	2.05

7. ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ НОРМИ

Рекомендується, щоб кожна лабораторія встановлювала власні нормальні і патологічні значення. Були отримані наступні значення:

2 мкМО/мл – 25 мкМО/мл

Окремо взяті результати не повинні бути єдиною підставою для терапевтичних висновків. Результати повинні співставлятись з іншими клінічними даними та діагностичними дослідженнями.

8. КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Рекомендується використовувати контролі згідно державним і місцевими нормами. Використання контролю дає можливість щоденної оцінки достовірності результатів. Використовуйте контролі і нормального рівня, і патологічного.

Контролі і відповідні результати QC лабораторії вказані в QC сертифікаті, що поставляється з набором. Величини, вказані в даному сертифікаті відповідають лоту набору і повинні використовуватись для порівняння результатів.

Також рекомендується використовуватись національні і міжнародні програми оцінки якості для підтвердження достовірності результатів.

Використовуйте відповідний статистичний метод для аналізу величин контролю. Якщо результати аналізу не попадають в установленні границі матеріалів контролю, результати являються не достовірними.

В такому випадку перевірте наступні дані: пристрої піпетування і вимірювання часу; фотометр; дати придатності реагентів, умови зберігання і інкубації, методи аспірації і промивання.

Якщо не знайдено помилки, зверніться до Вашого постачальника.

9. РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

9.1 Динамічний діапазон аналізу

Діапазон аналізу знаходиться в межах 1.76-1000 мкМО/мл.

9.2 Специфічність антитіл (перехресна реактивність)

Специфічність набору визначалась шляхом додавання різних аналізів до сироватки, яка містить 4 нг/мл (≈ 100 мкМО/мл) Інсуліну і вимірювання отриманої концентрації Інсуліну.

Added analyte to a high value serum (4 ng/mL)	Observed Insulin value (ng/mL)	Cross reaction (%)
Porcine Insulin 8 ng/mL	17	> 100
Bovine Insulin 8 ng/mL	17.8	> 100
Dog Insulin 16 ng/mL	17.2	82
Rabbit Insulin 16 ng/mL	14.1	63
Rat Insulin 16 ng/mL	4.0	0
Human Proinsulin 32 ng/mL	4.1	0
Porcine Proinsulin 16 ng/mL	4.0	0
Bovine Proinsulin 16 ng/mL	4.1	0

9.3 Чутливість

Аналітична чутливість набору була визначена шляхом додавання 2 стандартних відхилень до середнього значення 20 реплікатів аналізів 0 стандарту і складала 1.76 мкМО/мл.

9.4 Відтворюваність

9.4.1 В аналізі

Точність в аналізі вказана нижче:

Зразок	Кількість	Середнє, мкМО/мл	КВ, %
1	20	17.5	2.6
2	20	66.4	1.8

9.4.2 Між аналізами

Точність між аналізами вказана нижче:

Зразок	Кількість	Середнє, мкМО/мл	КВ, %
1	12	17.4	2.9
2	12	66.9	6.0

9.5 Відтворюваність

Зразки були збагачені шляхом додавання розчинів Інсуліну з відомими концентраціями в співвідношенні 1:1.

Очікувані значення були обчислені додаванням половини значень, визначених для нерозбавлених зразків і половини значень відомих зразків. % відновлення було обчислено шляхом множення співвідношення коефіцієнта вимірювань і очікуваних значень на 100.

Sample	Added Concentration 1:1 (v/v) (μIU/mL)	Measured Conc. (μIU/mL)	Expected Conc. (μIU/mL)	Recovery (%)
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

9.6 Лінійність

Sample	Dilution	Measured Conc. (μIU/mL)	Expected Conc. (μIU/mL)	Recovery (%)
1	None	21.2	21.2	
	1:2	9.4	10.6	88.5
	1:4	5.2	5.3	98.5
	1:8	2.8	2.7	105.9
	1:16	1.5	1.3	110.3
2	None	69.0	69.0	
	1:2	30.5	34.5	88.4
	1:4	17.6	17.3	102.0
	1:8	8.7	8.6	101.2
	1:16	4.8	4.3	110.4

10. ОБМЕЖЕННЯ ПРОЦЕДУРИ

Надійні та відтворювані результати будуть отримані коли процедура дослідження проводиться з повним розумінням цієї інструкції, з дотриманням вимог професійної лабораторної практики.

Будь-яке неправильне поводження зі зразками або зміна цього дослідження може вплинути на результати.

10.1 Перехресно діючі речовини

Гемоглобін (до 4 мг/мл), білірубін (до 0.5 мг/мл) і тригліцериди (до 30 мг/мл) не роблять ніякого впливу на результати аналізу.

10.2 Вплив лікарських засобів

На сьогодні не відомо жодних речовин (лікарських засобів), що впливають на вимірювання Інсуліну в зразку.

10.3 «Хук-ефект» високої дози

Не спостерігалось хук-ефекту в цьому дослідженні до 1600 мкМО/мл Інсуліну.

11. ПРАВОВІ АСПЕКТИ

11.1 Достовірність результатів

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

Результати дослідження вважаються достовірними, якщо контролю знаходяться в указаних межах і якщо інші параметри дослідження також відповідають характеристикам процедури.

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 Відповідальність

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.



ВИРОБНИК

DRG Instrumente GmbH
вул. Фраунберг 18, 35039
м. Марбург, Німеччина
Тел: +49(0)64 21/170 00
Факс: +49(0)64 21/17 00 50
www.drg-diagnostics.de
e-mail: drq@drq-diagnostics.de



УПОВНОВАЖЕНИЙ ПРЕДСТАВНИК

ТОВ «ДІАМЕБ ТРЕЙД»
вул. Симона Петлюри, 25
м. Івано-Франківськ, 76014
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.ua

