

НАБОР ИФА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРОИНСУЛИНА

EIA-1560, Proinsulin

Каталог. № : EIA-1560
Количество : 96
Производитель: DRG (Германия)

Методика от 09-2012
Версия 10.0



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

ВВЕДЕНИЕ

DRG Проинсулин ELISA набор служит для количественного определения Проинсулина (целой молекулы) в человеческой сыворотке и плазме.

Краткая информация

Измерение Проинсулина в сыворотке может дать ценную информацию при диагностике инсулином. Повышенный уровень Проинсулина также является показательным при инсулиннезависимом сахарном диабете (ИНСД), ранее выявленном инсулинозависимом сахарном диабете (ИСД) и других клинических случаях.

Проинсулин – это полипептид массой 9390, состоящий из 86 аминокислот, синтезируемый β -клетками островков Лангерганса поджелудочной железы. Он также является прекурсором инсулина. Большинство проинсулина превращается в инсулин и С-пептид, которые секретируются в равных долях в кровь. Около 15% не проходят превращения и вырабатывается как проинсулин. Биологическая активность проинсулина составляет лишь 10% от Инсулина, но период полураспада у него в три раза длиннее, чем у последнего.

Уровень проинсулина в сыворотке может отражать состояние β -клеток островков Лангерганса. Как ИСД, так и ИНСД свидетельствуют о нарушении работы β -клеток. Повышенные уровни проинсулина подмечались во время приступов ИСД и у здоровых потомков пациентов-диабетиков. Уровень гормона также может быть повышен у пациентов с открытой формой ИНСД. Повышенные концентрации циркулирующего проинсулина встречаются у пожилых пациентов, беременных или ожиревших диабетиков, пациентов с инсулиномами, функциональной гипогликемией и гиперинсулинемией.

Так как проинсулин и инсулин сходны по своей структуре, проинсулин может быть обнаружен как иммунореактивный инсулин в тесте на инсулин. Уровень иммунореактивного инсулина в целом обнаруживаются конверсионным РИА, который преувеличивает уровень инсулина, поскольку эти методы используют антитела, обладающие перекрестной реактивностью с проинсулином. Подсчитывая молярную долю проинсулина к настоящему инсулину (P/I), можно добиться лучшей оценки состояния и дееспособности β -клеток.

ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Набор DRG Проинсулин ELISA – это твердофазный меченный ферментом иммуносорбентный анализ, основанный на принципе сэндвича. Микротитровальные лунки покрыты моноклональными антителами к уникальному антигенному сайту на молекуле Проинсулина. Аликвота пробы пациента, содержащая эндогенный Проинсулин, инкубируется в закрытых лунках с ферментным конъюгатом, который представляет из себя анти-проинсулин антитело, конъюгированное с пероксидазой хрена. После промывки несвязавшийся конъюгат вымывается.

Количество связавшейся пероксидазы пропорционально концентрации Проинсулина в образце.

После добавления субстратного раствора, интенсивность развившегося окрашивания пропорциональна концентрации проинсулина в образце пациента.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Данный набор предназначен только для *in vitro* диагностики и профессионального использования.
2. Все реагенты этого набора, которые содержат сыворотку или плазму человека, были протестированы и показали отрицательный результат на HIV I/II, HBsAg и HCV по методам одобренным FDA. Однако не существует методов, гарантирующих полное отсутствие этих веществ. Поэтому, все

продукты человеческой крови, включая образцы сыворотки, должны считаться потенциально опасными.

3. Перед началом исследования прочитайте инструкцию полностью и внимательно. Используйте действительную версию инструкции, приложенную к набору. Убедитесь, что вам все понятно.
4. Микротитровальная плашка содержит делимые стрипы. Неиспользованные лунки должны храниться при 2-8 °C в пакете из фольги и использоваться с поставляемой рамкой.
5. Пипетирование образцов и реагентов должно осуществляться как можно быстрее и с одинаковыми временными интервалами.
6. Используйте резервуары только для одного компонента. Это особенно важно для резервуаров с субстратом. Использование для разлива субстрата емкости, которая прежде использовалась для раствора конъюгата, может привести к изменению цвета раствора. Не сливайте реагенты обратно в флаконы, т.к. это может привести к контаминации реагентов.
7. Для получения достоверных результатов тщательно перемешивайте содержимое лунок. Не используйте лунки повторно.
8. Не позволяйте лункам высохнуть во время анализа; добавьте реагенты сразу после промывки.
9. Перед анализом доведите все компоненты до комнатной температуры (21-26°C). Температура влияет на показания абсорбции. Тем не менее, не будет влияния на образцы пациентов.
10. Никогда не пипетируйте ртом и избегайте контакта реагентов и образцов с кожей и слизистыми.
11. НельзЯ есть, пить, курить или наносить косметику в месте работы с реагентами.
12. Надевайте одноразовые перчатки при раскапывании образцов и реагентов.
13. Работа с реагентами должна проводиться в соответствии с процедурами, утвержденными соответствующим управлением биологической безопасности и регулирования.
14. Не используйте реагенты после истечения срока годности, указанного на этикетке.
15. Все указанные объемы должны соблюдаться в соответствии с инструкцией. Оптимальные результаты возможны только при использовании калибровочных пипеток и микропланшетного ридера.
16. Не смешивайте и не используйте компоненты из различных лотов. Рекомендуется не менять лунки разных плашек даже одного лота. Наборы могут транспортироваться или храниться в разных условиях и в результате характеристики связывания у плашек могут отличаться.
17. Избегайте контакта со стоп раствором – 0.5M H₂SO₄; 1M HCl. Это может вызвать раздражения кожи или ожоги.
18. Некоторые реагенты содержат Проклин 300, БНД и/или МИТ в качестве консервантов. В случае их контакта с глазами или кожей, промойте этот участок водой.
19. Раствор субстрата ТМБ оказывает раздражающий эффект на коже и слизистых. В случае контакта, промойте глаза с большим объемом воды и кожу с мылом и большим количеством воды. Промойте загрязненные объекты перед повторным использованием. В случае вдыхания реагентов, выведите человека на свежий воздух.
20. Химикаты и готовые и использованные реагенты должны быть утилизированы как биологически опасные в соответствии с региональными нормами.
21. Информацию об опасных реагентах, используемых в этом наборе, вы можете найти в Паспорте безопасности. Он также доступен по запросу в ДРГ.

СОСТАВ НАБОРА

1. **Микротитровальная плашка**, 96 лунок, 12x8, разламываемые. Лунки покрыты моноклональными анти-Проинсулин антителами
2. **Стандарты** 6 флаконов, лиофилизированные, 1 мл. Концентрации: 0 – 2,6 – 6,6 – 16,5 – 33 – 66 пмоль/л
Кoeffициент пересчета: 106 пмоль/л = 1 нг/мл
Стандарты откалиброваны по 1-ому Международному Стандарту ВОЗ для Проинсулина IRP (84/611)
Содержит безртутный консервант
3. **Раствор для разведения проб**, 1 флакон, 2 мл, готов к использованию.
Содержит безртутный консервант
4. **Ферментный конъюгат**, 11X концентрат, 1 флакон, 1,2 мл
Анти-Проинсулин антитело конъюгировано с пероксидазой хрена.
См. Приготовление реагентов.
Содержит безртутный консервант.
5. **Раствор для разведения конъюгата**, 1 флакон, 12 мл, готов к использованию.
Содержит безртутный консервант

6. **Раствор субстрата**, 1 флакон, 14 мл, готов к использованию Тетраметилбензидин (ТМБ).
7. **Буфер**, 1 флакон, 12 мл, готов к использованию. Содержит безртутный консервант
8. **Контроли (низкий и высокий)**, 2 флакона, лиоф., 2 мл. См. Приготовление реагентов. Точные данные по диапазону контролей смотреть на этикетке флакона
Содержит безртутный консервант
9. **Стоп-раствор**, 1 флакон, 14 мл, готов к использованию. Содержит 0,5M H₂SO₄. Избегать контакта с кожей или слизистыми оболочками. Вызывает раздражения и ожоги!!!
10. **Промывочный раствор**, 1 флакон, 30 мл, 40X концентрированный
См. Приготовление реагентов

Внимание: Добавочный Раствор для разведения проб доступен по запросу.

Необходимые приборы и материалы не входящие в набор

1. Прибор, считывающий с микротитровальных плашек с фильтром 450±10 нм (например, DRG E-LisaMat 3000).
2. Откалиброванные пипетки с меняющимся объемом.
3. Фильтровальная бумага.
4. Дистиллированная вода

Хранение реагентов

Невскрытые реагенты годны при надлежащем хранении при 2-8 °С в течение всего срока годности. Не использовать по истечении этого срока.

Вскрытые реагенты хранить при 2-8 °С. Микротитровальные стрипы хранят при 2-8 °С. После открывания стрипы должны быть запечатаны в пакет из фольги вместе с поглотителем влаги.

Вскрытые реагенты годны в течение 2 месяцев при надлежащем условии хранения.

Подготовка реагентов

Доведите все реагенты до комнатной температуры перед использованием

Стандарты

Лиофилизированные стандарты восстановить 1 мл дистиллированной воды каждый.

Восстановленные стандарты годны при 2-8 °С 3 дня. Для более длительного хранения их необходимо заморозить до – 20 °С.

Контроли

Лиофилизированные контроли восстановить 2 мл дистиллированной воды каждый.

Восстановленные стандарты годны при 2-8 °С 3 дня. Для более длительного хранения их необходимо заморозить до – 20 °С.

Промывочный раствор

30 мл концентрированного промывочного раствора развести 1170 мл дистиллированной воды до финального объема 1200мл.

Разбавленный промывочный раствор стабилен при комнатной температуре 2 недели.

Ферментный конъюгат

Развести ферментный конъюгат 1:11 *Раствором для разведения конъюгата*. Разведенный ферментный конъюгат стабилен при комнатной температуре 24 часа.

Пример:

Если используется вся плашка, развести 1,2 мл *Ферментного конъюгата* с 12 мл *Раствора для разведения конъюгата* до общего объема 13,2 мл.

Если вся плашка сразу не используется, необходимое количество ферментного конъюгата получается при смешивании 100 мкл 11X *концентра* *Ферментного конъюгата* с 1 мл *Раствора для разведения конъюгата* на 1 стрип (см. таблицу ниже)

Кол-во стрипов	11X конц. ферментный конъюгат, мкл	Раствор для разведения конъюгата, мл
1	100	1
2	200	2
3	300	3
4	400	4
5	500	5
6	600	6
7	700	7
8	800	8
9	900	9
10	1000	10
11	1100	11
12	1200	12

Утилизация набора

Утилизация набора должна производиться в соответствии с местными нормами.

Повреждение набора

В случае повреждения набора или его компонентов немедленно информируйте ДРГ. До принятия решения по этому случаю не используйте данный набор в постановках.

ПОДГОТОВКА ПРОБ

Для анализа пригодна сыворотка или гепарин-плазма.

Не используйте сильно гемолизированные, желтушные или жирные образцы.

Пробы, содержащие азид натрия, также не подойдут для анализа.

Отбор проб

Сыворотка: Соберите кровь венопункцией, дайте свернуться и отделите сыворотку центрифугированием при комнатной температуре. Не центрифугируйте до полного свертывания крови. У образцов пациентов с антикоагулянтной терапией на свертывание может потребоваться больше времени.

Плазма

Сразу после забора крови поместите её в пробирку для центрифугирования с антикоагулянтом внутри и немедленно отцентрифугируйте.

Хранение образцов

Пробирки с образцами нужно закрыть крышкой. Они могут храниться 24 часа при 2-8 °С.

Если тест невозможно провести в день забора крови, образцы необходимо заморозить до –20 °С. Замороженные образцы могут храниться до 2 месяцев. Перед анализом необходимо инвертировать размороженные образцы несколько раз. Избегайте повторных разморозок.

Разведение образцов

В этом анализе при исследовании образцов с концентрацией больше самого высокого стандарта образец необходимо развести Нулевым Стандартом и повторно проанализировать. При расчете результатов следует учитывать фактор разведения.

Пример:

- a) разведение 1:10: 10 мкл Сыворотки + 90 мкл *Нулевого Стандарта* (резко смешать)
- b) разведение 1:100: 10 мкл предварительно разведенной сыворотки a) 1:10 + 90 мкл *Нулевого Стандарта* (резко смешать).

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Общие наставления

- Все реагенты и пробы должны перед началом тестирования быть перенесены в комнатную температуру и хорошо перемешаны. При перемешивании не должно быть пены.
- После начала анализа все шаги должны проводиться без промедления.
- Для каждого реагента, пробы или стандарта должен быть свой пластиковый наконечник, чтобы избежать перекрестных реакций. Для пипетирования субстратного раствора и стоп-раствора не применять пипетки из металла.
- Стандарты и пробы пипетировать на дно лунки. При пипетировании буфера и стоп-раствора пипетку держать под наклоном и соответствующий раствор пипетировать в середину лунки, что обеспечивает хорошее перемешивание буфера с пробами/стандартами и стоп-раствора с субстратным раствором.

- Перед началом тестирования реагенты приготовить, бутылочки открыть, стрипы вставить в рамку, чтобы проделать все шаги при пипетировании без промедления.
- Так как ферментная реакция зависит от времени и температуры, можно сократить время инкубации субстратной реакции на 15 мин, если экстинкции для высших концентраций стандарта лежат выше области измерения для ридера.
- Субстратный раствор должен быть бесцветным или слегка голубым или зеленым. Если раствор синий, то он не пригоден для анализа.

Процедура анализа

1. Вставьте нужное число стрипов в держатель.
2. Внесите **100 мкл** каждого стандарта, контроля и пробы.
3. Добавьте **100 мкл** Буфера в каждую лунку. В течение 10 сек. хорошо перемешивать, это дает однородную смесь и важно на этом этапе.
4. Запечатать плашку в пакет и инкубировать в течении ночи (16-24 часа) в увлажняющей камере при 4 °С.
5. Осторожно вытряхните содержимое лунок. Лунки промыть **3 раза** промывочным раствором, 350 мкл на лунку. После последнего ополаскивания убрать капли похлопыванием по адсорбирующей бумаге.
Важно: чувствительность и точность результатов данного анализа зависят от промывки.
6. Внесите **100 мкл** разведенного Ферментного конъюгата в каждую лунку.
7. Инкубировать **60 мин** при комнатной температуре (не запечатывать).
8. Вытряхните осторожно инкубационный раствор. Лунки промыть **5 раз** Разбавленным промывочным раствором, 350 мкл на лунку. После последнего ополаскивания похлопать по адсорбирующей бумаге.
9. Внесите **100 мкл** Субстрата в каждую лунку.
10. Инкубировать **30 мин** при комнатной температуре.
11. Добавить в каждую полосу **50 мкл** стоп-раствора.
12. Считать ОП при 450 ±10 нм на ридере в течение **10 мин** после добавления стоп-раствора.

РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

1. Посчитать среднюю величину поглощения для стандартов, контролей и проб.
2. Построить стандартную кривую, на которой функция (y) значение ОП наносится напротив соответствующей концентрации в пг/мл (x) как на линейной или на логарифмической бумаге.
3. Концентрации Проинсулина проб пациентов можно рассчитать только при интерполяции стандартной кривой. Если позволяет ридер, то можно обсчет производить через компьютер.
4. Для построения стандартной кривой с помощью ПК использовали метод 4-х параметровой регрессии. Если пробы разбавлены, то данные необходимо корректировать в соответствии с разведением.
5. Если у пробы при первом тестировании концентрация выше стандартной области, надо развести растворителем проб и еще раз протестировать.

Пример стандартной кривой

Следующие данные служат исключительно как демонстрация.

Стандарт	ОП (450 нм)
Стандарт 0 (0 пмоль/л)	0.16
Стандарт 1 (2.6 пмоль/л)	0.25
Стандарт 2 (6.6 пмоль/л)	0.36
Стандарт 3 (16.5 пмоль/л)	0.63
Стандарт 4 (33 пмоль/л)	1.06
Стандарт 5 (66 пмоль/л)	1.82

Ожидаемые значения

Каждая лаборатория должна иметь свои собственные значения нормы и отклонений!

Ниже представлена таблица с нормами для здоровых мужчин и женщин.

	Количество образцов	Возраст ± разброс	Среднее значение ± разброс
После 12-часового голодания (Плазма)	32	-	4,5 ± 3,8
После 12-часового голодания (Сыворотка)	15	32 ± 11	2,5 ± 1,8

Также был проведен тест на переносимость глюкозы на 77 здоровых детях (возраст 14 ± 3) после 12 часового голодания. Была получена

сыворотка после 12 часов голодания. Участникам было дано по 75 г глюкозы и после 30 – 120 мин снова была получена сыворотка.

	Среднее (± отклонение) пмоль/л
После 12-часового голодания (Сыворотка)	1,3 (0,5 – 3,5)
30 мин после введения глюкозы	6,4 (3,0 - 13,6)
120 мин после введения глюкозы	14,8 (6,5 - 33,3)

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Лабораторная практика требует, чтобы контроль должен быть проанализирован с каждой калибровочной кривой. Статистически значимое число контролей должно быть проанализированы, чтобы установить средние значения и приемлемые диапазоны для обеспечения нормального режима работы лаборатории. Рекомендуется использовать контрольные образцы в соответствии с государственными и федеральными нормами. Использование контрольных образцов рекомендуется для обеспечения повседневной достоверности результатов. Используйте контроли с нормальными и патологическими уровнями. Контроли и соответствующие им результаты полученные Лабораторией Контроля Качества указаны в Паспорте Качества, приложенном к набору. Значения и диапазоны, указанные на листе КК всегда относятся к текущему лоту набора и должны использоваться для прямого сравнения результатов. Также рекомендуется использовать национальные или международные программы оценки качества для того, чтобы обеспечить точность результатов. Используйте соответствующие статистические методы для анализа контрольных значений и тенденций. Если результаты анализа не соответствуют установленным приемлемым диапазонам контрольных материалов, результаты пациента должны быть признаны недействительными. В этом случае, пожалуйста, проверьте следующие технические параметры: пипетирование и таймеры; фотометр, срок годности реагентов, условия хранения и инкубации, аспирацию и методы промывки. После проверки указанных выше элементов, не найдя ошибок, свяжитесь с вашим дистрибьютором или ДРГ напрямую.

ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗА

Динамический диапазон исследования: 0,5 – 66 пмоль/л.

Специфичность (Кросс-реакция)

Вещества, способные давать перекрестные реакции:

Пептиды	Интенсивность окраски соответствует проинсулину в сыворотке (пмоль/л)
Проинсулин 32-33, 500пмоль/л	7,5
Проинсулин 32-33, 5 пмоль/л	0
Проинсулин Дес 31-32, 500 пмоль/л	4,5
Проинсулин Дес 31-32, 5 пмоль/л	0
Проинсулин 65-66, 500 пмоль/л	27,5
Проинсулин 65-66, 5 пмоль/л	2,7
Проинсулин Дес 64-65, 500 пмоль/л	266
Проинсулин Дес 64-65, 5 пмоль/л	3,2
Проинсулин 56-57, 500 пмоль/л	375
Проинсулин 56-57, 5 пмоль/л	3,5
Проинсулин Дес 57-65, 500пмоль/л	271
Проинсулин Дес 57-65, 5 пмоль/л	3,4
Человеческий инсулин, 17000 пмоль/л	0
Свиной проинсулин, 2,5 мг/мл	0
Бычий проинсулин, 2 мг/мл	0
Крысиный проинсулин инсулина, 180 пмоль/л	0
Человеческий С-пептид, 33000 пмоль/л	0
проинсулин соматомедина-С, 10 мг/мл	0
Соматомедин-С, 1 мг/мл	0

Аналитическая чувствительность

Аналитическая чувствительность анализа установлена путем расчета среднего плюс два стандартных отклонения 20 репликантов *Стандарта 0* и составила < 0,5 пмоль/л.

Воспроизводимость

– Интра-Анализ

Анализ тестов за одну постановочную сессию

Образец	Кол-во тестов	Среднее, пмоль/л	КВ, %
1	10	6,97	4,3
2	10	27,2	2,9
3	10	60,3	7,4

– Интер-Анализ

Анализ тестов в течение нескольких постановочных сессий

Образец	Кол-во тестов	Среднее, пмоль/л	КВ, %
1	10	7,38	6,8
2	10	29,6	5,5
3	10	64,7	5,5

Точность

Образцы были усилены добавлением растворов с известной концентрацией Проинсулина. Процентная Воспроизводимость была подсчитана умножением отношения измерений к ожидаемым значениям со 100.

Образец	Добавленная концентрация (пмоль/л)	Измеренная концентрация (пмоль/л)	Ожидаемая концентрация (пмоль/л)	Воспроизводимость
1	0	6,8	6,8	
	10	16,9	16,8	101
	30	36,7	36,8	100
	50	52,6	56,8	93
2	0	27,2	27,2	
	10	34,7	37,2	93
	30	55,0	57,2	96
	50	73,1	77,2	95

Линейность

Сыворотки пациента были серийно разведены раствором для разведения. Процентная Воспроизводимость была подсчитана умножением отношения измерений к ожидаемым значениям со 100.

Образец	Разведение	Измеренная концентрация (пмоль/л)	Ожидаемая концентрация (пмоль/л)	Воспроизводимость
6	Нет	72,65	72,65	
	1:2	36,88	36,33	101,5
	1:4	18,72	18,16	103,0
	1:8	9,33	9,08	102,7
	1:16	4,63	4,54	101,9
7	Нет	61,86	61,86	
	1:2	31,01	30,93	100,3
	1:4	16,02	15,47	103,6
	1:8	8,02	7,73	104,1
	1:16	4,12	3,38	106,5

ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

Интерферирующие вещества

Любое неправильное действие в отношении образцов или модификации данного теста может повлиять на результаты. Высокая концентрация Гемоглобина, Билирубина, и Триглицеридов может повлиять на результаты анализа.

Азид натрия влияет на результат.

Влияние лекарств

На сегодняшний день не обнаружено веществ (лекарств), влияющих на измерение Проинсулина в образце.

Хук-эффект

Не наблюдалось хук-эффекта до 6000 пмоль/л в данном тесте.

ПРАВОВЫЕ АСПЕКТЫ

Достоверность результатов

Тест должен быть выполнен в соответствии с инструкциями изготовителя по применению. Кроме того, пользователь должен строго придерживаться правила GLP (хорошей лабораторной практики) или других применимых национальных стандартов и / или законов. Это особенно актуально для использования контрольных реагентов. Важно всегда включать, в рамках проведения анализа, достаточное количество контролей для проверки достоверности и точности теста. Результаты действительны, только если все контроли находятся в пределах заданного диапазона, и, если все остальные параметры теста, также в рамках данных характеристик анализа. В случае каких-либо сомнений, пожалуйста, свяжитесь с ДРГ.

Терапевтические заключения

Терапевтические заключения никогда не должны быть основаны только на результатах лабораторных анализов, даже если результаты всех тестов находятся в согласии, как указано в пункте 11.1. Любой лабораторный результат только часть общей клинической картины пациента. Только в тех случаях, когда результаты лабораторных исследований соответствуют общей клинической картине, может быть сделано терапевтическое заключение. Результат теста никогда не должен быть единственным

определяющим фактором для получения любого терапевтического заключения.

Ответственность

Любое изменение набора и/или обмен или замена каких-либо компонентов разных партий из одного набора на другой может негативно сказаться на ожидаемых результатах и обоснованности анализа вообще. В случае таких изменений и / или замен любое требование о замене набора недействительно. Претензии, поданные в связи с неверной интерпретацией результатов анализа клиентом, в соответствии с пунктом 11.2. также недействительны. Несмотря на это, в случае каких-либо претензий, ответственности производителя не должна превышать стоимость набора. Вред, причиненный набору при транспортировке, не подлежит ответственности 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