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

C-Peptide ELISA

Кат. № : 108-1293
Кількість : 96
Виробник : DRG International, Inc. (USA)

<u>Увага</u>: основою для проведення аналізу є оригінал інструкції на англійській мові.

Версія 7.0
*Методика від **05/05***

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 секретується 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 тестування С-пептиду дає можливість розрізнити ендогенний 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 інсулінома 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 діагнастики інсуліноми
- прогностична ознака для плода у вагітних, хворих діабетом
- визначення інсулінової секреції при захворюваннях печінки
- моніторинг панкреатектомії.

ПРИНЦИП ТЕСТУ

У наборі використовується принцип конкурентного зв'язку. Мікро планшет покритий анти-мишачими антитілами, які зв'язують моноклональне антитіло направлене проти антигенної сторони молекули С-пептиду. Ендогенний С-пептид зразку пацієнта конкурує с С-пептидом, кон'югованим пероксидазою хрону 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.

ПЕРЕСТОРОГИ І ПОПЕРЕДЖЕННЯ

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. Оптимальні 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.

РЕАГЕНТИ

1. **Стрічкова мікропланшетка**: 96 лунок, вкритих антимишиною антисироваткою.
2. **Стандарти**, ліофілізовані 0,75 мл, 6 флаконів 0-16 нг/мл (дивись точне значення на флаконах)
3. **Антисироватка,** 1 фл., 7 мл, готове до використання моноклональне мишаче анти-С-пептид антитіло.
4. **Кон'югат**: 1 флакон 14 мл. Готовий до використання біотинальний С-пептид.
5. **Ензимний Комплекс**: 1 флакон 14 мл. Готовий до використання. Розчин, в якому є пероксидаза.
6. **Розчинник зразків**: 3 мл, готовий до використання.
7. **Розчин субстрату -TMB**, 14 мл, готовий до використання TMB,
8. **Стоп-розчин**: 1 флакон 14 мл. Містить 0,5 М сірчану кислоту.
9. **Мийний розчин:** 1 флакон 30 мл. концентрований (x40)

Примітка: додатковий розчинник зразків для розведення зразків доступний по замовленню.

МАТЕРІАЛИ, ЩО НЕ ПОСТАЧАЮТЬСЯ

1. Фотометр для зчитування при 450±10 нм.
2. Мікропіпетки
3. Абсорбуючий папір.
4. Дистильована вода.

ЗБЕРІГАННЯ І СТАБІЛЬНІСТЬ

1. Набір повинен зберігатися при температурі 2-8^{0}C і бути використаним до дати виходу терміну.
2. С-пептидний коньюгат, Ензимний Комплекс, Субстрат, Мийний розчин і Нульовий стандарт зберігають при 2-8^{0}C
3. Стрічки зберігають при 2-8^{0}C. Після відкривання набір знову повинен бути міцно запечатаний. Імунореактивність планшетки стабільна приблизно 6 тижнів після повторного запечатування в ящику з дессікантом.

ПРИГОТУВАННЯ РЕАГЕНТІВ

Приведіть всі реагенти до кімнатної температури перед використанням.

Стандарти

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

Примітка: розведені стандарти стабільні 3 дні при 2-8^{0}C. При довшому зберіганні заморозьте до –20^{0}C.

Миючий розчин

Розведіть 30 мл концентрованого миючого розчину з 1170 мл дистильованої води до кінцевого об'єму 1200 мл. Розбавлений миючий розчин стабільний 2 тижні при кімнатній температурі.

Знищення набору

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

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.

ЗБИРАННЯ ТА ПРИГОТУВАННЯ ЗРАЗКІВ

<u>А. Для сироватки та плазми</u> зберігайте звичні перестороги при венепункції. Не використовуйте сильно гемолізовані чи ліпемічні зразки. Зразки, у яких підозрюється вища концентрація С-пептиду, ніж найвища межа стандартної кривої, повинні бути розведені розчинником зразків.

<u>В. Сеча</u>

1. Загальний об'єм сечі за 24 години повинен бути змішаний в єдиному контейнері.
2. Примітка: зразки повинні зберігатись при 2-8^{0}C 24 години і треба відмітити загальний об'єм її.
3. Виберіть кратне число зразків для тесту. Центрифугуйте їх до очищення при –10^{0}C чи нижче аж поки вони не будуть готові до використання.
4. Розведіть 1:20 розчинником зразків.

Зберігання зразків

Зразки повинні бути закриті і в такому виді можуть зберігатись при 2-8^{0}C 24 годин. Для довшого зберігання зразки повинні бути заморожені до –20^0 C. Після відтаювання зразки необхідно кілька разів легко потрясти перед тестуванням.

Розведення зразків

Якщо при початковому тесті зразки вищі ніж найвищий стандарт, зразки можуть бути розбавлені 10- або 100-кратно розчинником зразків і повторно проаналізовані, як описано в Процедурі аналізу.

Наприклад:

- Розведення 1:10: 10 мкл зразка + 90 мкл розчинника зразків (ретельно перемішайте)
- Розведення 1:100: 10 мкл розбавленого 1:10 зразку + 90 мкл розчинника зразків (ретельно перемішайте.

ПРОВЕДЕННЯ ТЕСТУ

Загальні зауваження

- Приведіть всі реагенти до кімнатної температури перед початком тесту. Всі реагенти змішуйте без піноутворення.
- Після початку тесту всі кроки повинні виконуватись без затримки.
- Використовуйте нові насадки для піпеток перед кожним використанням.

- Абсорбція залежить від температури і часу інкубації. Тому, перед початком тесту 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.

Процедурні зауваження

- Всі стандарти, зразки і контролі повинні тестуватись в дублікаті, щоб умови тестування були однаковими.
- Концентрація зразків може бути зчитана зі стандартної кривої. Зразки з концентрацією вищою від найвищого стандарту повинні бути розведені 1:10 розчинником зразків. При обчисленні концентрації фактор розведення необхідно взяти в розрахунок.

ПРОЦЕДУРА ТЕСТУ

1. Виберіть необхідну кількість лунок.
2. Додайте **100 мкл** стандартів, контролів і зразків, **використовуючи нові піпетки**, у відповідні лунки.
3. Внесіть **50** мкл антисироватки в кожну лунку.
4. Внесіть **100 мкл** кон'югату у кожну лунку.
5. Ретельно перемішайте 10 секунд. Важливим є повне змішування на даному етапі.
6. Інкубуйте **60 хв** при кімнатній температурі.
7. Витряхніть вміст з планшету. Промийте лунки 3 раза розведеним миючим розчином (400 мкл на лунку). Переверніть планшет на абсорбуючу бумагу для видалення залишків води.

   Важливе зауваження:

   Чутливість і точність аналізу залежать від правильного виконання миючої процедури.
8. Додайте **100 мкл** ензимного коньюгату в кожну лунку.
9. Інкубуйте **30 хв** при кімнатній температурі.
10. Витрухніть вміст з планшету. Промийте лунки 3 раза розведеним миючим розчином (400 мкл на лунку). Переверніть планшет на абсорбуючий папір для видалення залишків води.
11. Додайте **100 мкл** розчину субстрату в кожну лунку.
12. Інкубуйте **20 хв** при кімнатній температурі.
13. Зупиніть реакцію, додавши **100 мкл** стоп розчину в кожну лунку
14. Визначте абсорбцію кожної лунки пр **450±10 нм на протязі 10 хв** після добавлення стоп розчину.

ВИРАХУВАННЯ 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-вісі проти відповідних концентрацій на Х-вісі.
3. Використовуючи значення середньої абсорбції для кожного зразка, визначте відповідну концентрацію зі стандартної кривої. Опрацювання даних може проводитись і іншими методами, в залежності від досвіду.
4. Автоматичний метод: можна використовувати комп'ютерні програми з використанням кубічної регресії, 4 параметрову логістику.
5. Визначена концентрація зі стандартної кривої. Зразки з концентрацією вище найвищого стандарту повинні бути розведені розчинником зразку. Для розведених зразків повинна бути помножена на фактор розведення.

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

Стандарт	Оптичні одиниці
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

ХАРАКТЕРИСТИКИ ТЕСТУ

Очікувані значення

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

ЧУТЛИВІСТЬ

Найнижчий рівень С-пептиду складав 0,064 нг/мл

СПЕЦИФІЧНІСТЬ

Перехресна реактивність інтактного або сплит-проінсуліну незначна.

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 набора і повинні використовуватись для прямого порівняння результатів.

Також рекомендується використовувати національні і міжнародні програми оцінки якості.

Для встановлення середніх значень і допустимих коливань необхідно протестувати 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.

ТОЧНІСТЬ

Внутрітестова

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

Міжтестова

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

ВІДТВОРЮВАНІСТЬ

Дивіться таблиці на сторінці 10 оригіналу інструкції на англ.. мові.

ЛІНІЙНІСТЬ

Дивіться таблиці на сторінці 10 оригіналу інструкції на англ.. мові.

ОБМЕЖЕННЯ ПРОЦЕДУРИ

Впливаючі речовини

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

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

Побічний ефект

При тестуванні не було виявлено жодних побічних ефектів.

ЮРИДИЧНІ АСПЕКТИ

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.

Терапевтичні висновки

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

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

Надійність

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

Будь-які пошкодження набору при транспортуванні не відноситься о відповідальності виробника.

Інформація для замовлення:

ПМП «ДІАМЕБ»
вул. Чорновола, 97, м. Івано-Франківськ, 76005
тел.: (0342) 775122. факс: (0342) 775612
e-mail: info@diameb.com