

НАБІР ІФА

ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ІНСУЛІНУ

2425-300, Insulin Test System

Каталог. №: 2425-300

Методика від 16-07-2019

Кількість : 96

Версія 5

Виробник : **Monobind Inc., (США)**



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

1.0 ПРИЗНАЧЕННЯ

Цільове використання: Кількісне визначення рівнів інсуліну в сироватці людини за допомогою мікропланшетного імуноферментного аналізу, колориметричного.

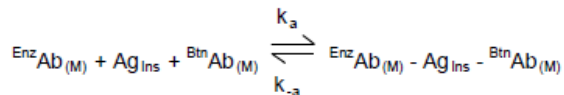
2.0 ВСТУП (Див. оригінал інструкції).

3.0 ПРИНЦИП МЕТОДУ

Імуноферментний аналіз (ТИП 3)

Реагенти, необхідні для імуноферментного визначення, включають в надлишку високоафінні і специфічні антитіла (фермент-мічені і біотинильовані) для специфічного розпізнавання різних епітопів, і природний антиген. У процесі аналізу на поверхні мікролунок взаємодіють сорбовані в осередках стрептавідин і додані біотинильовані антитіла до Інсуліну.

При змішуванні біотинильованих антитіл і сироватки, що містить антиген Інсуліну, між Інсуліну антигеном і антитілами відбувається реакція з утворенням комплексу антитіло-антиген. Послідовно біотин, зв'язаний з антитілом, взаємодіє зі Стрептавідином, нанесеним в лунки, що призводить до іммобілізації комплексу. Взаємодія ілюструється наступним рівнянням:



$\text{BiotAb}_{(M)}$ = Біотинильовані моноклональні антитіла (надлишкова кількість)

$\text{Ag}_{\text{Insulinu}}$ = Нативний антиген (змінна кількість)

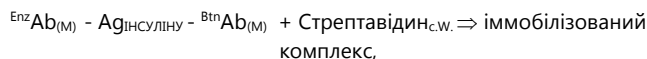
$\text{EnzAb}_{(M)}$ = ферментно-мічене антитіло (надлишкова кількість)

$\text{EnzAb}_{(M)} - \text{Ag}_{\text{Insulinu}} - \text{BiotAb}_{(M)}$ = Сендвіч-комплекс антиген-антитіло (змінна кількість)

k_a = Константа швидкості асоціації

k_{-a} = Константа швидкості дисоціації

Одночасно утворюється комплекс в лунках при реакції стрептавідину і біотинильованих антитіл. Ця взаємодія ілюструється так:



$\text{Стрептавідин}_{\text{c.w.}}$ = Стрептавідин, нанесений в лунки

Іммобілізований комплекс = Імунний комплекс, зв'язаний з поверхнею лунок.

Після досягнення рівноваги фракція, пов'язана з антитілами, відділяється від не зв'язаних антигенів декантацією або промиванням. Активність ферменту у фракції пов'язаних антитіл прямо пропорційна концентрації нативного антигену. При використанні декількох стандартів з відомим

значенням концентрації антигену будується калібрувальна крива, по якій обчислюється концентрація невідомих зразків.

4.0 РЕАГЕНТИ

Матеріали, що постачаються:

A. Калібратори Інсуліну – 2.0 мл/флакон (сухі)

6 флаконів референсного матеріалу для антигену Інсуліну з концентраціями 0 (A), 5 (B), 25 (C), 50 (D), 100 (E) і 300 (F) мкМОд/мл. Розчиніть вміст кожного флакона в 2 мл дистильованої або деіонізованої води. Відновлені калібратори стабільні три (3) дні при 2-8 °С. Для зберігання на більш тривалий проміжок часу аликвотуйте відновлені калібратори і зберігайте при температурі -20 °С до 30 днів. Не заморожуйте-розморозуйте більш ніж один раз. Додано консервант.

Зауваження: Калібратори на основі людської сироватки прокалібровані по 1-му Міжнародному стандарту WHO IRP 66/304.

B. Ферментний реагент Інсуліну – 13 мл/флакон

Один флакон, що містить фермент-мічені афінно очищені IgG-антитіла проти Інсуліну і біотинильовані моноклональні мишачі IgG-антитіла проти Інсуліну в буфері, барвник і консервант. Зберігати при 2-8 °С.

C. Планшет, покритий стрептавідином – 96 лунок

Один 96-лунковий мікропланшет, покритий стрептавідином і запакований в алюмінієву фольгу з осушувачем. Зберігати при 2-8 °С.

D. Концентрат розчину для промивання – 20 мл

Один флакон, що містить ПАВ в фосфатному сольовому буфері. Містить консервант. Зберігати при 2-8 °С.

E. Субстрат А – 7.0 мл/флакон

Один флакон, що містить ТМБ в буфері. Зберігати при 2-8 °С.

F. Субстрат В – 7.0 мл/флакон

Один флакон, що містить перекис водню в буфері. Зберігати при 2-8 °С.

G. Стоп-розчин – 8.0 мл/флакон

Один флакон, що містить сильну кислоту (1N HCl). Зберігати при 2-8 °С.

H. Інструкція

Зауваження 1: Не використовуйте реагенти після закінчення терміну придатності.

Зауваження 2: Уникати впливу тепла і світла. Відкриті реагенти стабільні 60 днів при зберіганні від 2 до 8 °С. Стабільність набору і компонентів вказана на етикетці.

Зауваження 3: Всі реагенти призначені для формату одного планшета.

4.1 Необхідні матеріали, які не постачаються з набором

1. Мікродозатори на 50 і 100 мкл з точністю не гірше 1.5%.
2. Диспенсери на 100 і 350 мкл з точністю не гірше 1.5% (опційно).
3. Мікропланшетний вошер або гнучка пляшка (опційно).
4. Мікропланшетний рідер з фільтрами 450 нм і 620 нм.
5. Фільтрувальний папір для висушування мікролунок.
6. Пластикова плівка або кришка для інкубування мікропланшетів.
7. Вакуумний аспіратор для промивання (опційно).
8. Таймер.
9. Контейнер (и) для реагентів.
10. Дистильована або деіонізована вода.
11. Контрольні матеріали.

5.0 ЗАУВАЖЕННЯ ТА ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

**Набір призначений тільки для діагностики in-vitro
Не для внутрішнього або зовнішнього використання
на людях або тваринах**

Використовувана для виготовлення компонентів набору людська сироватка протестована методами, схваленими FDA, в яких отримані негативні результати на наявність антитіл до ВІЛ 1 та 2, HCV і поверхневого антигену гепатиту В. Однак, оскільки не існує методів, що дають повну гарантію відсутності інфекційних агентів, з реагентами слід

поводитися з обережністю, як з потенційно небезпечним біоматеріалом, що рекомендується для будь-яких зразків крові згідно правил кваліфікованої лабораторної практики. Рекомендації дивіться в національних посібниках з біобезпеки або, наприклад, в "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories" 2nd Edition, 1988, HHS.

Безпечна утилізація компонентів набору повинна відповідати місцевим нормативним та законодавчим вимогам.

6.0 ЗБІР І ЗБЕРІГАННЯ ЗРАЗКІВ

Зразками служить сироватка крові. Необхідно дотримуватися звичайних застережних заходів. Для порівняння нормальних значень повинна бути отримана ранкова сироватка (натще). Кров слід збирати в пробірки з червоним маркуванням без добавок або антикоагулянтів. Дозвольте крові згорнутися. Для відділення сироватки використовуйте центрифугу.

У пацієнтів, які отримують терапію високими дозами біотину (тобто > 5 мг/добу), не слід брати зразок до принаймні 8 годин після останнього введення біотину, переважно протягом ночі, щоб забезпечити отримання зразка натще.

Зразки можуть зберігатися при 2-8 °C до 5 днів. Якщо зразки не можуть бути проаналізовані за цей час, вони можуть бути заморожені до -20 °C на період до 30 днів. Уникайте повторних циклів заморожування - відтавання. Для аналізу в дублях вимагається 0.100 мл зразка.

7.0 КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Кожна лабораторія повинна проводити аналіз контролю на рівні в низькому, нормальному та підвищеному діапазоні для моніторингу ефективності аналізу. Ці контролю слід розглядати як невідомі та значення визначатись в кожній проведеній тестовій процедурі. Повинні будуватися карти контролю якості для відстеження характеристик реагентів, що поставляються. Слід застосовувати прийнятні статистичні методи для встановлення відхилень. Значні відхилення від встановлених характеристик можуть свідчити про зміни в умовах експерименту або зниження якості реагентів набору. Для визначення причини змін повинні бути використані свіжі реагенти.

8.0 ПРИГОТУВАННЯ РЕАГЕНТІВ

1. Промивний розчин

Розбавте концентрат розчину для промивання до 1000 мл дистильованою або деіонізованою водою. Зберігайте при кімнатній температурі (2-30 °C) до 60 днів.

2. **Робочий Субстратний розчин** - Стабільний протягом одного року Змішайте Субстрати, виливши вміст бурштинового флакона з Субстратом А у прозорий флакон з Субстратом В. Закрийте прозорий флакон жовтою кришкою для легкої ідентифікації. Перемішайте суміш і підпишіть відповідно. Розчин зберігається при 2-8 °C.

Зауваження 1: Не використовуйте субстрат, якщо він придбав блакитне забарвлення.

Зауваження 2: Не використовувати забруднені реагенти, або реагенти, де спостерігається ріст бактерії.

9.0 ПРОТОКОЛ АНАЛІЗУ

Перед початком аналізу всі реагенти, стандарти і контролю повинні досягти кімнатної температури (20-27 °C).

****Процедуру тестування повинна виконувати кваліфікована особа або досвідчений фахівець.****

1. Виберіть необхідну кількість лунок для калібратора, контролю і зразка пацієнта для постановки в дублях. Поверніть невикористані смужки в алюмінієвий пакет і закрийте його. Зберігайте при 2-8 °C.
2. Додайте піпеткою по 50 мкл калібраторів, контролів та досліджуваних зразків у відповідні лунки.
3. Додайте по 100 мкл Ферментного реагенту Інсуліну у кожен лунку. Дуже важливо додавати всі реагенти на дно лунок.

4. Струшуйте мікропланшет обережно протягом 20-30 секунд для перемішування і накрийте його.
5. Інкубуйте 120 хвилин при кімнатній температурі (20-27 °C).
6. Видаліть вміст лунок декантацією або аспірацією. Висушіть планшет на фільтрувальному папері, якщо використовувалася декантація.
7. Додайте 350 мкл промивного буфера (див. розділ "Приготування реагентів") і видаліть його. Повторіть процедуру ще два рази (загальна кількість циклів промивки - 3). Для цієї процедури краще використовувати автоматичний або ручний вошер відповідно до інструкцій виробника приладів. Якщо використовується гнучка пляшка, наповнити кожен лунку до верху (уникайте повітряних бульбашок). Видаліть вміст і повторіть ще 2 рази.
8. Додайте по 100 мкл Робочого розчину субстрату в кожен лунку (див. "Приготування реагентів"). Завжди додавайте реагенти в одній і тій же послідовності і з однаковою швидкістю, щоб уникнути відмінностей у часі реакції в різних лунках.

НЕ СТРУШУЙТЕ ПЛАНШЕТ ПІСЛЯ ДОДАВАННЯ СУБСТРАТУ

9. Інкубуйте 15 хвилин при кімнатній температурі.
10. Зупиніть розвиток забарвлення додаванням в кожен лунку 50 мкл стоп-розчину і перемішайте протягом 15-20 секунд. Завжди додавайте реагенти в одній і тій же послідовності і з однаковою швидкістю, щоб уникнути відмінностей у часі реакції в різних лунках.
11. Виміряйте величини поглинання вмісту лунок на довжині хвилі 450 нм (вимірювання проводити при референсній довжині хвилі 620-630 нм). Виміри повинні бути проведені протягом 30 хвилин після додавання стоп-розчину.

10.0 РЕЗУЛЬТАТИ

Для визначення концентрації Інсуліну в невідомих зразках використовується калібрувальна крива.

1. Запишіть значення оптичної щільності для всіх лунок як показано в прикладі 1.
2. Для побудови калібрувальної кривої на лінійному графічному папері використовуйте кожен з двох оптичних густин для кожного стандарту залежно від концентрації Інсуліну в мкМОд/мл (не розраховуйте середнього значення до побудови).
3. Проведіть оптимальну калібрувальну криву.
4. Щоб визначити концентрацію інсуліну для невідомого, знайдіть середнє поглинання дублікатів для кожного невідомого на вертикальній осі графіка, знайдіть точку перетину на кривій та прочитайте концентрацію (у мкМОд/мл) від горизонтальної осі графіка (дублікати невідомого можуть бути усереднені, як зазначено). У наступному прикладі середнє поглинання 0,624 перетинає криву реакції на дозу на рівні 66,8 мкМОд/мл для концентрації інсуліну (див. Рисунок 1).

Примітка: Програмне забезпечення для аналізу даних комп'ютера, призначене для аналізу ІЕМА (ELISA), також може використовуватися для аналізу даних. Якщо використовується така програма, слід провести валідацію програмного забезпечення.

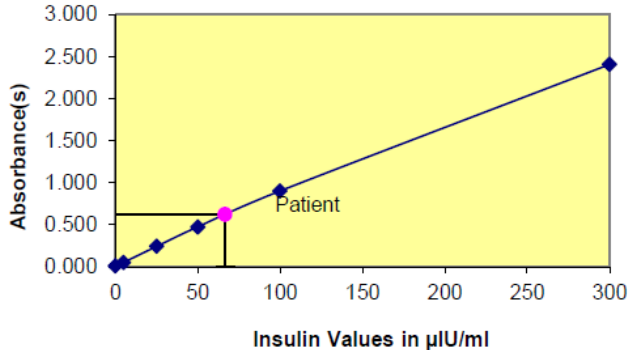
Приклад 1

Зразок	Лунка	Абсорбція (A)	Середнє абсорбції (B)	Концентрація
Калібратор А	A1	0.011	0.010	0
	B1	0.009		
Калібратор В	C1	0.054	0.054	5
	D1	0.053		
Калібратор С	E1	0.244	0.243	25
	F1	0.241		
Калібратор D	G1	0.464	0.476	50
	H1	0.488		
Калібратор E	A2	0.882	0.902	100
	B2	0.922		
Калібратор F	C2	2.467	2.405	300
	D2	2.342		

Контроль 1	E2	0.065	0.065	6.4
	F2	0.067		
Контроль 2	G2	1.581	1.587	188.0
	H2	1.593		
Зразок	A3	0.597	0.624	66.8
	B3	0.651		

*Дані наведені в прикладі 1 тільки для ілюстрації і **не повинні використовуватися** для побудови стандартної кривої.

Рисунок 1



11.0 ПАРАМЕТРИ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ

Результати аналізу можна вважати достовірними, якщо дотримуються наступні умови:

1. Оптична щільність калібратора 0 мкМОд/мл ≤ 0.4 .
2. Оптична щільність калібратора 300 мкМОд/мл ≥ 1.3 .
3. Чотири з шести контролів якості повинні укладатися у встановлені інтервали.

12.0 АНАЛІЗ РИЗИКІВ

Форма MSDS та аналіз ризику для цього продукту доступна на запит від Monobind Inc.

12.1. Якість роботи набору

1. Для відтворюваності результатів важливо, щоб час реакції підтримувався постійним в кожній лунці.
2. Піпетування зразків не повинно перевищувати 10 хвилин.
3. Не використовувати високо ліпемічні, гемолізовані або забруднені зразки.
4. Якщо використовується більше, ніж один планшет, рекомендується повторювати калібрувальну криву.
5. Додавання субстратного розчину ініціює кінетичну реакцію, яка зупиняється при додаванні стоп-розчину. Отже, додавання субстрату і стоп-розчину повинно проводитися в однаковій послідовності для усунення відмінностей у часі реакції в різних лунках.
6. Вимірювання оптичної щільності на рідері проходить вертикально. Не торкайтеся до дна мікролунок.
7. Погана промивка лунок (неповне видалення розчину під час аспірації) може призводити до невідтворюваних і недостовірних результатів.
8. Використовуйте компоненти тільки з одного лота. Не змішуйте реагенти з різних партій.
9. Правильне і точне піпетування, а також дотримання точного часу і температурних вимог є необхідними умовами. Будь-які відхилення від встановлених Monobind можуть давати невірні результати.
10. Дотримуватись всіх встановлених норм роботи лабораторної практики для забезпечення нормальної роботи пристрою.
11. Важливим є калібрування всього обладнання, тобто, піпеток, рідера, вошера та/або автоматизованих інструментів, які використовуються з даним пристроєм. Також обов'язковим є належний догляд і обслуговування пристрою.
12. Аналіз ризиків для даного пристрою може бути наданий Monobind.

12.2 Інтерпретація результатів

1. **Вимірювання та інтерпретація результатів повинні проводитись досвідченими професіоналами.**
2. Лабораторні результати не можуть бути єдиним критерієм для визначення лікування, особливо, якщо отримані результати не співпадають з іншими дослідженнями.
3. Реагенти для тест-системи були сформульовані для усунення максимальних перешкод; однак потенційна взаємодія між рідкісними зразками сироватки та тест-реактивами може спричинити помилкові результати. Гетерофільні антитіла часто викликають ці взаємодії і, як відомо, є проблемами для всіх видів імуноферментних аналізів (Boscato LM, Stuart MC. «Гетерофільні антитіла: проблема для всіх імуноферментних аналізів» Clin. Chem. 1988: 3427-33). Для діагностичних цілей результати цього аналізу повинні поєднуватися з клінічним обстеженням, анамнезом пацієнта та всіма іншими клінічними результатами.
4. Для отримання дійсних результатів адекватні контролю та інші параметри повинні знаходитись в межах встановлених норм.
5. **Monobind не несе відповідальності** за результати тесту в разі, якщо складові набору були замінені іншими складовими з інших наборів, або якщо результати були інтерпретовані невірно.
6. Якщо для обробки результатів тесту використовується комп'ютер, то розраховані значення стандартів не повинні відхилятися більш, ніж на 10% від приписаних значень концентрації.
7. Зразки пацієнтів з концентраціями Інсуліну вище 300 мкМОд/мл розвести нульовим калібратором і аналізувати повторно. Отримане значення **Само по собі значення Інсуліну не є діагностичною величиною** і повинно використовуватися разом з іншими клінічними даними.

13.0 ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ

Значення Інсуліну в плазмі вище, ніж в сироватці; таким чином, використанню сироватки надається перевага. У людей, які не страждають діабетом, значення інсуліну натще найбільш високі у людей, страждаючих ожирінням, а у тренуваних спортсменів - найнижчі. Важливо мати на увазі, що встановлений діапазон значень, який можна очікувати у даній популяції "нормальних" людей з використанням даного методу залежить від безлічі факторів: специфічності методу, популяції, яка тестується, і точності методу в руках лаборанта. З цих причин кожна лабораторія повинна встановити свій власний діапазон нормальних значень.

Грунтуючись на клінічних дослідженнях, проведених компанією Monobind, і відповідно до опублікованих даних, було отримано наступний діапазон нормальних значень. **Даний діапазон повинен бути використаний тільки як орієнтовний:**

Популяція	Діапазон
Діти < 12 років	< 10 мкМОд/мл
Дорослі (нормальні значення)	0.7-9.0 мкМОд/мл
Діабетики (тип 2)	0.7-25 мкМОд/мл

Важливо мати на увазі, що встановлений діапазон значень, який можна очікувати у даній популяції "нормальних" людей з використанням даного методу, залежить від безлічі факторів: специфічності методу, популяції, яка тестується, і точності методу в руках лаборанта. З цих причин кожна лабораторія повинна встановити свій власний діапазон нормальних значень.

14.0 ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРУ

14.1 Точність

Точність набору Інсуліну всередині серії і між серіями визначалася в аналізі пулів сироваток трьох різних рівнів. Кількість (N), середнє значення (\bar{x}), стандартне відхилення (δ) і коефіцієнт варіації (C.V.) для цих сироваток наведені в таблицях 2 і 3.

ТАБЛИЦЯ 2
Точність в аналізі (мкМОд/мл)

Зразок	N	x	δ	C.V., %
Пул 1	24	10.70	0.89	8.3
Пул 2	24	48.16	2.07	4.3
Пул 3	24	130.08	6.64	5.1

ТАБЛИЦЯ 3
Точність між аналізами* (мкМОд/мл)

Зразок	N	x	δ	C.V., %
Пул 1	15	11.78	1.33	11.3
Пул 2	15	48.92	4.69	9.6
Пул 3	15	145.17	10.45	7.2

*вимірювання проводились в декількох експериментах в дублях.

14.2 Чутливість

Чутливість (межа визначення) визначений статистично як концентрація, відповідна значенню оптичної щільності нульового стандарту 0 мкМОд/мл плюс 2σ (σ - Стандартне відхилення) при 95% довірчому інтервалі. Чутливість методу склала 0.182 мкМОд/мл.

14.3 Точність

Справжній метод *Insulin AccuBind ELISA* порівнювався з затвердженим радіоімунним методом. Використовувалися зразки сироваток від симптоматичної та безсимптомної популяцій (значення в діапазоні 0.01 мкМОд/мл - 129 мкМОд/мл). Загальна кількість зразків склала 104. Отримані дані наведені в таблиці 4.

ТАБЛИЦЯ 4

Метод	Середнє (x)	Рівняння регресії	Коефіцієнт кореляції
Даний метод	13.6	$Y = 2.6 + 0.91(x)$	0.975
Метод порівняння	11.4		

Тільки незначна розбіжність даного методу і референс-методу була виявлена, що доводить близькі середні значення. Рівняння регресії і коефіцієнт кореляції показують прекрасну узгодженість методів.

14.4 Специфічність

Перехресна реактивність даного методу визначення інсуліну з вибраними речовинами вивчали додаванням інтерферуючих речовин до сироватці в різних концентраціях. Перехресна реактивність оцінювалася розрахунком відношення дози інтерферуючої речовини до дози інсуліну, необхідного для одержання тієї ж абсорбції.

Речовина	Перехресна реактивність	Концентрація
Інсулін	1.0000	-
Проінсулін	0.0078	100 нг/мл
С-пептид	Не визначається	75 нг/мл
Глюкагон	Не визначається	150 нг/мл



Monobind, Inc.
100 North Pointe Drive
Lake Forest, CA 92630

Tel: 949.951.2665 Fax: 949.951.3539 www.monobind.com



УПОВНОВАЖЕНИЙ ПРЕДСТАВНИК

ТОВ «ДІАМЕБ»
вул. Чорновола, 97
м. Івано-Франківськ, 76005
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com

