

# НАБІР РЕАГЕНТІВ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ІНСУЛІНУ МЕТОДОМ ІФА

## Insulin Test System

Кат. №: 2425-300A

Дата випуску інструкції: 16-07-2019  
Версія: 5



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

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

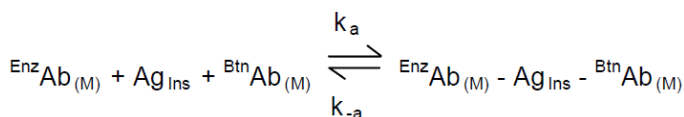
**2.0 ВСТУП** (Див. оригінал інструкції).

### 3.0 ПРИНЦИП МЕТОДУ

#### Імуноферментний аналіз (ТИП 3)

Основні реагенти, необхідні для імуноферментного аналізу, включають антитіла високої спорідненості та специфічності (Ab) (ферментно кон'юговані та іммобілізовані) з різним і чітким розпізнаванням епітопів, у надлишку, та нативний антиген (Ag). У цій процедурі іммобілізація відбувається під час аналізу на поверхні лунки мікропланшета шляхом взаємодії стрептавідину, нанесеного в лунках, та екзогенно доданого біотинильованого моноклонального інсулінового антитіла.

При змішуванні моноклонального біотинильованого антитіла, міченого ферментом антитіла і сироватки, що містить нативний антиген, відбувається реакція між нативним антигеном і антитілами, без конкуренції або стеричних перешкод, з утворенням розчинного сендвіч-комплексу. Взаємодія ілюструється наступним рівнянням:



$\text{B}^{\text{tn}}\text{Ab}_{(M)}$  = Біотинильовані моноклональні антитіла (надлишкова кількість)

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

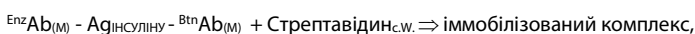
$\text{EnzAb}_{(M)}$  = ферментно-мічене антитіло (надлишкова кількість)

$\text{EnzAb}_{(M)} - \text{Ag}_{\text{ІНСУЛІНУ}} - \text{B}^{\text{tn}}\text{Ab}_{(M)}$  = Сендвіч-комплекс антиген-антитіло (змінна кількість)

$k_a$  = Константа швидкості асоціації

$k_{-a}$  = Константа швидкості дисоціації

Одночасно комплекс депонується в лунку за допомогою високоафінної реакції стрептавідину та біотинильованого антитіла. Ця взаємодія проілюстрована нижче:



Стрептавідин<sub>c.w.</sub> = 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 (мл)/флакон (Висушені)

6 флаконів референсів для антигена Інсуліну з концентраціями 0 (A), 5 (B), 25 (C), 50 (D), 100 (E) і 300 (F) мкМО/мл (μIU/ml). Розчиніть вміст кожного флакона в 2 мл (мл) дистильованої або деіонізованої води. Відновлені калібратори стабільні 3 дні при 2-8 °C (°C). Для більш тривалого зберігання аліквотуйте відновлені калібратори та зберігайте при -20 °C (°C) до 30 днів. **Не заморозуйте/розморозуйте більше одного разу.** Додано консервант.

**Примітка:** Калібратори на основі людської сироватки були відкалібровані з використанням референсного препарату, який аналізували відповідно до 1-го IRP 66/304 ВООЗ.

### B. Ферментний реагент Інсуліну - 13 мл (мл)/флакон

Один флакон, що містить фермент-мічені афінно очищені моноклональні мишачі х-Інсулін IgG, біотинильовані моноклональні мишачі х-Інсулін IgG в буфері, барвник і консервант. Зберігати при 2-8 °C (°C).

### C. Планшет, покритий стрептавідином - 96 лунок

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

### D. Концентрат розчину для промивання - 20 мл (мл)/флакон

Один флакон, що містить ПАР в фосфатному сольовому буфері. Містить консервант. Зберігати при 2-8 °C (°C).

### E. Субстрат А - 7.0 мл (мл)/флакон

Один флакон, що містить ТМБ в буфері. Зберігати при 2-8 °C (°C).

### F. Субстрат В - 7.0 мл (мл)/флакон

Один флакон, що містить перекис водню в буфері (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Зберігати при 2-8 °C (°C).

### G. Стоп-розчин - 8.0 мл (мл)/флакон

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

### H. Інструкція

**Зауваження 1:** Не використовуйте реагенти після закінчення терміну придатності.

**Зауваження 2:** Уникайте впливу тепла і світла. Відкриті реагенти стабільні 60 днів при зберіганні від 2 до 8 °C (°C). Стабільність набору і компонентів вказана на етикетці.

**Зауваження 3:** Всі реагенти призначені для формату одного планшета.

### 4.1 Необхідні матеріали, які не поставляються з набором

1. Дозатор(и), здатний(і) подавати об'єми 0.050 мл (мл) (50 мкл (μl)) і 0.100 мл (мл) (100 мкл (μl)) з точністю, що перевищує 1.5%.
2. Диспенсер(и) для повторюваних внесень 0.100 мл (мл) (100 мкл (μl)) і 0.350 мл (мл) (350 мкл (μl)) з точністю вище 1.5% (опційно).
3. Мікропланшетний вошер або пляшка під тиском (опційно).
4. Мікропланшетний рідер з фільтрами 450 нм (nm) і 620 нм (nm).
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. Матеріали для контролю якості.

### 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, ВГС 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, NHS.

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

## 6.0 ЗБІР І ЗБЕРІГАННЯ ЗРАЗКІВ

Зразками служить сироватка крові, за типом. 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 отримували терапію високими дозами біотину (тобто > 5 мг (mg)/добу), не слід брати зразок до принаймні 8 годин після останнього введення біотину, переважно протягом ночі, щоб забезпечити пробу натще.

Зразки можуть зберігатися при 2-8 °C (°C) до 5 днів. Якщо зразки не можуть бути проаналізовані за цей час, вони можуть бути заморожені до -20 °C (°C) на період до 30 днів. Уникайте використання забруднених пристроїв. Уникайте повторних циклів заморожування-відтавання. Для аналізу в дублях вимагається 0.100 мл (ml) (100 мкл (µl)) зразка.

## 7.0 КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Кожна лабораторія повинна проводити аналіз контролю на рівні низького, нормального та підвищеного діапазону для контролю ефективності аналізу. Ці контролю повинні досліджуватися як невідомі зразки в кожній постановці аналізу. 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 (ml) дистильованою або деіонізованою водою. Зберігайте при кімнатній температурі 2-30 °C (°C) до 60 днів.

### 2. Робочий Субстратний розчин

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 (°C).

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

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

## 9.0 ПРОТОКОЛ АНАЛІЗУ

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

- Виберіть необхідну кількість лунок для калібратора, контролю та зразка пацієнта для постановки в дублях. Поверніть невикористані смужки в алюмінієвий пакет і закрийте його. Зберігайте при 2-8 °C (°C).
- Внесіть піпеткою 0.050 мл (ml) (50 мкл (µl)) відповідних калібраторів, контролю та зразків у призначені лунки.
- Додайте 0.100 мл (ml) (100 мкл (µl)) Ферментного реагенту Інсуліну в кожну лунку. Дуже важливо вносити всі реагенти близько до дна мікролунки.
- Струшуйте мікропланшет обережно протягом 20-30 секунд для перемішування і накрийте його.
- Інкубуйте 120 хвилин при кімнатній температурі (20-27 °C (°C)).
- Видаліть вміст лунок декантациєю або аспірацією. Висушіть планшет на фільтрувальному папері, якщо використовувалася декантация.
- Додайте 0.350 мл (ml) (350 мкл (µl)) 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 пляшка під тиском, наповнити кожну лунку до верху (уникайте повітряних бульбашок). Видаліть вміст і повторіть ще 2 рази.
- Додайте по 0.100 мл (ml) (100 мкл (µl)) Робочого розчину субстрату в кожну лунку (див. «Приготування реагентів»).

### НЕ СТРУШУЙТЕ ПЛАНШЕТ ПІСЛЯ ДОДАВАННЯ СУБСТРАТУ

- Інкубуйте 15 хвилин при кімнатній температурі.
- Зупиніть розвиток забарвлення додаванням в кожну лунку 0.050 мл (ml) (50 мкл (µl)) 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.

- Виміряйте величини поглинання вмісту лунок на довжині хвилі 450 нм (nm) (вимірювання проводити при референсній довжині хвилі 620-630 нм (nm)). Виміри повинні бути проведені протягом 30 хвилин після додавання стоп-розчину.

## 10.0 РЕЗУЛЬТАТИ

Для визначення концентрації Інсуліну в невідомих зразках використовується калібрувальна крива.

- Запишіть значення оптичної щільності для всіх лунок як показано в прикладі 1.
- Для побудови калібрувальної кривої на лінійному графічному папері використовуйте кожну з двох оптичних густин для кожного стандарту залежно від концентрації Інсуліну в мкМО/мл (µIU/ml) (не розраховуйте середнього значення до побудови).
- Проведіть оптимальну калібрувальну криву.
- Щоб визначити концентрацію Інсуліну для невідомого, знайдіть середнє поглинання дублікатів для кожного невідомого на вертикальній осі графіка, знайдіть точку перетину на кривій та зчитайте концентрацію (в мкМО/мл (µIU/ml)) з горизонтальної осі графіка (дублікати невідомого можна усереднювати, як зазначено). У наступному прикладі середнє поглинання 0.624 перетинає криву дозо-відповіді при 66.8 мкМО/мл (µIU/ml) для концентрації інсуліну (див. малюнок 1).

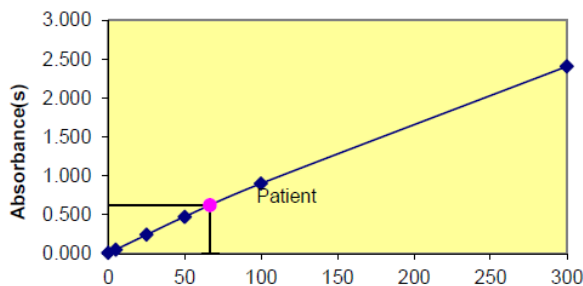
**Примітка:** Програмне забезпечення комп'ютера для обчислення даних, призначене для аналізу ІФА, також може використовуватися для обчислення даних. Якщо таке програмне забезпечення використовується, слід перевірити перевірку програмного забезпечення.

Приклад 1

ID Зразка	Лунка	Абсорбція (A)	Середнє абсорбції (B)	Значення мкМО/мл (µIU/ml)
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		
Пацієнт 1	A3	0.597	0.624	66.8
	B3	0.651		

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

Малюнок 1



Insulin Values in µIU/ml – Значення Інсуліну в мкМО/мл  
Absorbance(s) – Абсорбція(i)  
Patient – Пацієнт

## 11.0 ПАРАМЕТРИ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ

Результати аналізу можна вважати достовірними, якщо дотримуються наступні умови:

1. Оптична щільність калібратора 0 мкМО/мл ( $\mu\text{IU/ml}$ )  $\leq 0.04$ .
2. Оптична щільність калібратора 300 мкМО/мл ( $\mu\text{IU/ml}$ )  $\geq 1.3$ .
3. Чотири з шести контролів якості повинні укладатися у встановлені інтервали.

## 12.0 АНАЛІЗ РИЗИКІВ

MSDS та форма аналізу ризиків для цього продукту доступні за запитом у 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. Важливі є калібрування всього обладнання, тобто, піпеток, рідера, вольера та/або автоматизованих інструментів, які використовуються з даним пристроєм. Також обов'язковим є належний догляд і обслуговування пристрою.
12. Аналіз ризику - відповідно до вимог Директиви IVD 98/79/EC з маркуванням CE - для цього та інших пристроїв, виготовлених Monobind, можна отримати електронною поштою від [Monobind@monobind.com](mailto:Monobind@monobind.com).

### 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 розроблені для усунення максимальної інтерференції; однак потенційна взаємодія між рідкісними зразками сироватки та тест-реагентами може призвести до помилкових результатів. Гетерофільні антитіла часто викликають ці взаємодії і, як відомо, є проблемою для всіх видів імуноаналізів (Boscato LM, Stuart MC. «Гетерофільні антитіла: проблема для всіх імуноаналізів» Clin. Chem. 1988:3427-33). Для діагностичних цілей результати цього аналізу повинні поєднуватися з клінічним оглядом, анамнезом пацієнта та всіма іншими клінічними даними.
4. Для отримання дійсних результатів адекватні контролі 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 мкМО/мл ( $\mu\text{IU/ml}$ ) 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 наште найбільш високі у людей, страждаючих ожирінням, а у тренуваних спортсменів - найнижчі. Хоча проінсулені перекресно реагує з більшістю конкурентних аналізів інсуліну, існує менше 1% перекресної реакції з проінсуліном за допомогою Тест-системи Monobind Insulin AccuBind® ІФА.

На основі клінічних даних, зібраних Monobind відповідно до опублікованої літератури, були призначені наступні діапазони. **Ці діапазони слід використовувати лише як рекомендації:**

Популяція	Діапазон
Діти < 12 років	< 10 мкМО/мл ( $\mu\text{IU/ml}$ )
Дорослі (нормальні значення)	0.7-9.0 мкМО/мл ( $\mu\text{IU/ml}$ )
Діабетики (тип 2)	0.7-25 мкМО/мл ( $\mu\text{IU/ml}$ )

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 Тест-системи Insulin AccuBind® ІФА всередині серії і між серіями визначалася в аналізі пулів сироваток трьох різних рівнів. Кількість, середнє значення, стандартне відхилення і коефіцієнт варіації для цих сироваток наведені в таблицях 2 і 3.

ТАБЛИЦЯ 2

Точність в аналізі (мкМО/мл ( $\mu\text{IU/ml}$ ))

Зразок	N	x	$\delta$	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 (мкМО/мл ( $\mu\text{IU/ml}$ ))

Зразок	N	x	$\delta$	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 виявлення) була визначена шляхом визначення варіабельності калібратора сироватки 0 мкМО/мл ( $\mu\text{IU/ml}$ ) та використання статистики  $2\sigma$  (95% впевненості) для розрахунку мінімальної дози. Було встановлено, що чутливість аналізу становить 0.182 мкМО/мл ( $\mu\text{IU/ml}$ ).

### 14.3 Достовірність

Тест-систему Insulin AccuBind® ІФА порівнювали з референсним радіоімунним аналізом у пробірці з покриттям. Використовували біологічні зразки від популяції (симптоматичні та безсимптомні). Значення коливались від 0.01 мкМО/мл ( $\mu\text{IU/ml}$ ) до 129 мкМО/мл ( $\mu\text{IU/ml}$ ). Загальна кількість таких зразків складала 104. Отримані дані наведено 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 Тест-системи Insulin AccuBind® ІФА і референс-методу була виявлена, що доводять близькі середні значення. Рівняння регресії і коефіцієнт кореляції показують прекрасну узгодженість методів.

### 14.4 Специфічність

Перекресну реактивність Тест-системи Insulin AccuBind® ІФА з вибраними речовинами вивчали додаванням інтерферуючих речовин до сироваткової матриці в різних концентраціях. Перекресна 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 (ng/ml)
С-пептид	Не виявлено	75 нг/мл (ng/ml)
Глюкагон	Не виявлено	150 нг/мл (ng/ml)



#### ВИРОБНИК

<i>MONOBIND INC.</i>	<i>МОНОБАЙНД ІНК</i>
<i>100 North Pointe Dr.</i>	<i>100 Норд Поінт Драйв</i>
<i>Lake Forest, CA 92630 - USA</i>	<i>Лейк Форест, Каліфорнія 92630 - США</i>
<i>Phone: 949.951.2665</i>	<i>Тел.: 949.951.2665</i>
<i>Fax: 949.951.3539</i>	<i>Факс: 949.951.3539</i>
<a href="http://www.monobind.com">www.monobind.com</a>	<a href="http://www.monobind.com">www.monobind.com</a>



#### УПОВНОВАЖЕНИЙ ПРЕДСТАВНИК

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

