

# НАБІР РЕАГЕНТІВ ДЛЯ ШВИДКОГО ВИЗНАЧЕННЯ ІНСУЛІНУ МЕТОДОМ ІФА

## Rapid Insulin Test System

Кат. №: 5825-300A

Дата випуску інструкції: 16-07-2019  
Версія: 4



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

### 1.0 ПРЕДСТАВЛЕННЯ

**Застосування за призначенням:** Кількісне визначення рівня Інсуліну в сироватці крові людини за допомогою мікропланшетного імуноферментного аналізу, колориметричний.

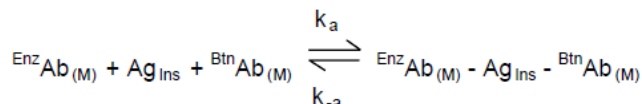
**2.0 ВСТУП** (Див. оригінал інструкції).

### 3.0 ПРИНЦИП МЕТОДУ

#### Імуноферментний аналіз (ТИП 3)

Реагенти, необхідні для імуноферментного визначення, включають в надлишку високоафінні і специфічні антитіла (Ab), (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 моноклональні антитіла Інсуліну.

При змішуванні моноклональних біотинильованих антитіл, ферментного кон'югата і сироватки, що містить природний антиген, між нативним антигеном і антитілами відбувається реакція без конкуренції або просторових утруднень з утворенням розчинного сендвіч-комплексу. Взаємодія ілюструється наступним рівнянням:



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

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

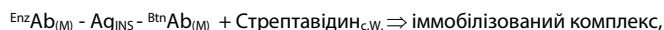
$\text{EnzAb}$  = ферментно-мічене моноклональне антитіло (надлишкова кількість)

$\text{EnzAb} - \text{Ag}_{\text{INS}} - \text{BtAb}_{(M)}$  = Комплекс антиген-антитіло

$k_a$  = Константа швидкості асоціації

$k_{-a}$  = Константа швидкості дисоціації

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



Стрептавідин<sub>c.w.</sub> = Стрептавідин, нанесений в лунки

Імобілізований 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 (сухі)

6 флаконів референсного матеріалу для антигена Інсуліну з концентраціями 0 (A), 5 (B), 25 (C), 50 (D), 100 (E) і 300 (F) мкМО/мл (μIU/ml). Розвести кожен флакон з 2 мл (мл) дистильованої або деіонізованої води. Відновлені калібратори стабільні протягом 3 днів

при 2-8 °C (°C). Щоб зберігати протягом більш тривалого періоду часу, аликвотуйте відновлені калібратори і зберігайте при -20 °C (°C) до 30 днів. Не заморожуйте/розморозьте більше одного разу. Додано консервант.

**Примітка:** Калібратори на основі сироватки людини були відкалібровані при використанні референсного препарату, аналізованого проти 1-го Міжнародного референсного препарату (IRP № 66/304).

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

Один (1) флакон, що містить фермент-мічений очищений моноклональний мишачий IgG x-інсуліну, біотинильований моноклональний мишачий IgG x-інсуліну в буфері, з барвником і консервантом. Зберігати при температурі 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 сурфактант в фосфатному сольовому буфері. Містить консервант. Зберігати при 2-8 °C (°C).

##### E. Субстратний Розчин - 12 мл (мл)/флакон

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

##### F. Стоп-розчин - 8 мл (мл)/флакон

Один флакон, що містить сильну кислоту (0.5M (M) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Зберігати при 2-8 °C (°C).

##### G. Інструкція

**Зауваження 1:** Не використовуйте реагенти з вичерпаним терміном придатності.

**Зауваження 2:** Уникайте тривалого впливу тепла та світла. Відкриті реагенти стабільні протягом шістдесяти (60) днів при зберіганні при 2-8 °C (°C). Стабільність набору і компонентів ідентифікована на етикетці.

**Зауваження 3:** Перераховані реагенти для одного 96-лунового мікропланшета.

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

1. Дозатор, здатний подавати об'єми 0.050 мл (мл) (50 мкл (μl)) з точністю, що перевищує 1.5%.
2. Диспенсер(и) для повторних подач об'ємом 0.100 мл (мл) (100 мкл (μl)) з точністю, що перевищує 1.5%.
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 для зберігання промивного буфера.
10. Дистильована або деіонізована вода.
11. Контрольні матеріали.

#### 5.0 ЗАУВАЖЕННЯ ТА ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

**Набір призначений 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 проводитись у відповідності з місцевими нормативно-законодавчими вимогами.

#### 6.0 ЗБІР І ЗБЕРІГАННЯ ЗРАЗКІВ

Зразками служить кров, сироватка за типом, дотримуватися звичайних застережних заходів при зборі зразків крові методом венепункції. 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 (mg)/добу), не слід брати зразки принаймні до 8 годин після останнього введення біотину, бажано на ніч для забезпечення зразка 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 повторних циклів заморожування/розморожування. Для аналізу в дублях вимагається 0.100 мл (ml) зразка.

## 7.0 КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Кожна лабораторія повинна перевіряти контролі на рівнях в низькому, середньому і високому діапазоні для моніторингу проведення тесту. Ці контролі 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 буфер

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

**Зауваження 1:** Не використовуйте робочий 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, калібратори та контролі повинні досягнути кімнатної температури (20-27 °C (°C)).

**\*\*Процедура випробування повинна виконуватися кваліфікованим фахівцем\*\***

- Виберіть необхідну кількість лунок для зразків, калібраторів і контролів для постановки в дублях. Поверніть невикористані смужки в алюмінієвий пакет і закрийте його. Зберігайте при 2-8 °C (°C).
- Додайте піпеткою по 50 мкл (µl) калібраторів, контролів та досліджуваних зразків у відповідні лунки.
- Додайте 0.100 мл (ml) (100 мкл (µl)) Ферментного реагенту Інсуліну в кожну лунку. Дуже важливо вносити всі реагенти близько до дна лунки.
- Струшуйте мікропланшет обережно протягом 20-30 секунд для перемішування. Накрити пластиковою плівкою.
- Інкубувати протягом 60 хвилин при кімнатній температурі (20-27 °C (°C)).
- Видаліть вміст лунок декантацією або аспірацією. Висушіть планшет на фільтрувальному папері, якщо використовувалася декантація.
- Додайте 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 100 мкл (µl) Робочого розчину субстрату в кожну лунку.  
**НЕ СТРУШУЙТЕ ПЛАНШЕТ ПІСЛЯ ДОДАВАННЯ СУБСТРАТУ**
- Інкубуйте 15 хвилин при кімнатній температурі.
- Зупиніть розвиток забарвлення додаванням в кожну лунку 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 15 хвилин після додавання стоп-розчину.

## 10.0 РЕЗУЛЬТАТИ

Для визначення концентрації Інсуліну в невідомих зразках використовується калібрувальна крива.

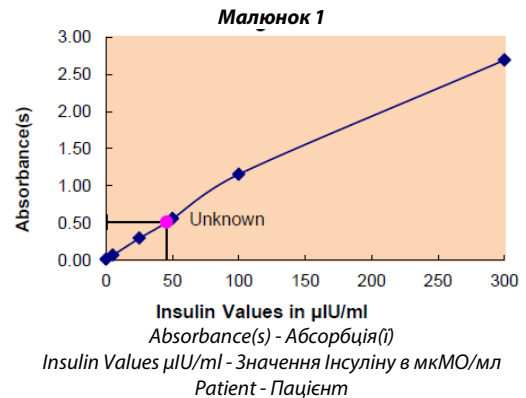
- Запишіть поглинання, отримане з роздруківки зчитувача мікропланшетів, як зазначено в Прикладі 1.
- Для побудови калібрувальної кривої на лінійному графічному папері використовуйте кожну з двох оптичних густин для кожного стандарту залежно від концентрації Інсуліну в мкМО/мл (µIU/ml) (не розраховуйте середнього значення до побудови).
- Проведіть оптимальну калібрувальну криву.
- Визначте концентрації Інсуліну в контролях і зразках, використовуючи калібрувальну криву і середні значення оптичної щільності для кожного зразка. У наведеному нижче прикладі середня абсорбція 0.514 перетинає стандартну криву при 45.5 мкМО/мл (µIU/ml) (див. мал.1)

**Примітка:** Для аналізу даних може використовуватися комп'ютерне програмне забезпечення, розроблене для аналізу ІФА. Якщо таке програмне забезпечення використовується, слід виконати перевірку програмного забезпечення.

Приклад 1

Зразок	Лунка	Абсорбція (A)	Середнє абсорбції (B)	Концентрація мкМО/мл (µIU/ml)
Калібратор А	A1	0.019	0.019	0
	B1	0.019		
Калібратор В	C1	0.071	0.071	5
	D1	0.070		
Калібратор С	E1	0.284	0.296	25
	F1	0.311		
Калібратор D	G1	0.548	0.562	50
	H1	0.576		
Калібратор E	A2	1.155	1.160	100
	B2	1.166		
Калібратор F	C2	2.635	2.694	300
	D2	2.752		
Невідомий	E2	0.513	0.514	45.5
	F2	0.515		

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



## 11.0 ПАРАМЕТРИ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ

Результати аналізу можна вважати достовірними, якщо дотримуються наступні умови:

- Оптична щільність Калібратора 0 мкМО/мл (µIU/ml) повинна бути  $\leq 0.04$ .
- Оптична щільність Калібратора 300 мкМО/мл (µIU/ml) повинна бути  $\geq 1.3$ .
- Чотири з шести контрольних пулів повинні укладатися у встановлені інтервали.

## 12.0 АНАЛІЗ РИЗИКІВ

MSDS і форма аналізу ризику для цього продукту доступні за запитом від компанії Monobind Inc.

### 12.1. Якість роботи набору

- Для відтворюваності результатів важливо, щоб час реакції підтримувався постійним в кожній лунці.
- Піпетування зразків не повинно перевищувати 10 хвилин.

- Не використовувати високо ліпемічні, гемолізовані або забруднені зразки.
- Якщо використовується більше, ніж один планшет, рекомендується повторювати калібрувальну криву.
- 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.
- Вимірювання оптичної щільності на рідері проходить вертикально. Не торкайтеся до дна мікролунок.
- Погана промивка лунок (неповне видалення розчину під час аспірації) може призводити до невідтворюваних і недостовірних результатів.
- Використовуйте компоненти тільки з одного лота. Не змішуйте реагенти з різних партій.
- Зразки пацієнтів з концентраціями Інсуліну вище 300 мкМО/мл ( $\mu\text{U/ml}$ ) можуть бути розведені з нульовим калібратором і знову аналізовані. Концентрація зразка отримується шляхом множення результату на коефіцієнт розведення.
- 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.
- Дотримуватись всіх встановлених норм роботи лабораторної практики для забезпечення нормальної роботи пристрою.
- Важливим є калібрування всього обладнання, тобто, дозаторів, рідера, вошера та/або автоматизованих інструментів, які використовуються з даним пристроєм. Також обов'язковим є належний догляд і обслуговування пристрою.
- Аналіз ризиків - відповідно до вимог Директиви 98/79/ЄС IV маркованих IVD - для цього та інших пристроїв, виготовлених Monobind, можна надіслати запит електронною поштою з [Monobind@monobind.com](mailto:Monobind@monobind.com).

## 12.2 Інтерпретація результатів

- Вимірювання та інтерпретація результатів повинні бути виконані кваліфікованим або навченим професіоналом.**
- Лабораторні результати не можуть бути єдиним критерієм для визначення лікування, особливо, якщо отримані результати не співпадають з іншими дослідженнями.
- Реагенти для процедур з використанням AccuBind® ІФА були розроблені для максимального усунення перешкод; однак, потенціальна взаємодія між деякими зразками сироватки та реагентами можуть привести до помилкових результатів тесту. Гетерофільні антитіла часто викликають ці взаємодії і, як відомо, є проблемою для всіх видів імунологічних досліджень. Для діагностичних цілей, результати цього аналізу повинні бути використані в поєднанні з клінічним обстеженням пацієнта, історією і всіма іншими клінічними даними.
- Для отримання дійсних результатів адекватні контролю та інші параметри повинні знаходитись в межах встановлених норм.
- 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.
- Якщо для обробки результатів тесту використовується комп'ютер, то розраховувані значення стандартів не повинні відхилятися більш, ніж на 10% від приписаних значень концентрації.

## 13.0 ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ

Значення інсуліну постійно вище в плазмі, ніж у сироватці; таким чином, кращим зразком є сироватка. У порівнянні зі значеннями зразків, отриманих натще в осіб з ожирінням без діабету, рівень інсуліну вище у огрядних, які не страждають діабетом і нижче у тренуваних спортсменів. Хоча проінсулін перехресно реагує з більшістю конкурентних аналізів інсуліну, виявлено менше 1% перехресної реакції за допомогою даного аналізу.

На підставі клінічних даних, зібраних Monobind відповідно до опублікованої літератури, наступні діапазони були призначені. **Ці діапазони повинні використовуватися тільки як рекомендації:**

ПОПУЛЯЦІЯ	ДІАПАЗОН
Діти <12 років	< 10 мкМО/мл ( $\mu\text{U/ml}$ )
Дорослі (Нормальні)	0.7-9.0 мкМО/мл ( $\mu\text{U/ml}$ )
Діабетики (тип II)	0.7 - 25 мкМО/мл ( $\mu\text{U/ml}$ )

Важливо мати на увазі, що встановлення діапазону значень, які можна очікувати за певним методом для сукупності «нормальних» осіб, залежить від безлічі факторів: специфічності методу, сукупності перевірених і точності методу в руках аналітика. З цих причин кожна лабораторія повинна залежати

від діапазону очікуваних значень, встановлених виробником, до тих пір, поки аналітики не зможуть визначити внутрішній діапазон, використовуючи метод із популяцією, корінною для району, в якому знаходиться лабораторія.

## 14.0 ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРУ

### 14.1 Точність

Точність Тест-системи Rapid Insulin AccuBind® ІФА всередині серії і між серіями визначалася в аналізі контрольних об'єднаних сироваток трьох різних рівнів. Кількість (N), середнє значення (x), стандартне відхилення ( $\delta$ ) і коефіцієнт варіації (C.V.) для цих сироваток наведені в таблицях 2 і 3.

**ТАБЛИЦЯ 2**  
Точність в аналізі (мкМО/мл ( $\mu\text{U/ml}$ ))

Зразок	N	x	$\sigma$	C.V., %
Пул 1	20	11.6	0.93	8.0
Пул 2	20	39.8	1.96	4.9
Пул 3	20	117.8	6.00	5.1

**ТАБЛИЦЯ 3**  
Точність між аналізами\* (мкМО/мл ( $\mu\text{U/ml}$ ))

Зразок	N	x	$\sigma$	C.V., %
Рівень 1	10	10.3	1.01	9.8
Рівень 2	10	41.5	2.32	5.6
Рівень 3	10	122.1	8.32	6.8

\*Вимірювання проводились в 10 експериментах в дублях протягом семи днів.

### 14.2 Чутливість

Чутливість (межа виявлення) оцінюється при визначенні варіабельності 0 мкМО/мл ( $\mu\text{U/ml}$ ) калібратора сироватки і з використанням  $2\sigma$  (95% точності) для розрахунку мінімальної дози. Чутливість аналізу становить 0.75 мкМО/мл ( $\mu\text{U/ml}$ ).

### 14.3 Достовірність

Тест-систему Rapid Insulin AccuBind® ІФА порівнювали з референсним радіоімунним методом з пробірками з покриттям. Біологічні зразки від населення (симптоматичні і безсимптомні) були використані. Загальна кількість таких зразків була 104. Значення варіювалися від 0.01 до 129 мкМО/мл ( $\mu\text{U/ml}$ ). Отримані дані представлені 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 незначні розбіжності між даним аналізом і референсним методом свідчать про близькість середніх значень. Рівняння регресії найменших квадратів і коефіцієнт кореляції показують відмінну узгодженість методів.

### 14.4 Специфічність

Перехресна реактивність даного аналізу з вибраними речовинами оцінювалася шляхом додавання додаткових речовин в матрицю сироватки в наступних концентраціях. Перехресна реактивність була обчислена шляхом отримання відношення між дозою додаткової речовини і дозою інсуліну, необхідного для отримання такої ж абсорбції.

Субстанція	Перехресна реактивність	Концентрація
Інсулін	1.0000	-
Проінсулін	0.0078	100 нг/мл (ng/ml)
С-Пептид	Н/В	75 нг/мл (ng/ml)
Глюкагон	Н/В	150 нг/мл (ng/ml)



#### ВИРОБНИК

MONOBIND INC.  
100 North Pointe Dr.  
Lake Forest, CA 92630 - USA  
Phone: 949.951.2665  
Fax: 949.951.3539  
[www.monobind.com](http://www.monobind.com)

МОНОБАЙНД ІНК  
100 Норд Поінт Драйв  
Лейк Форест, Каліфорнія 92630 - США  
Тел.: 949.951.2665  
Факс: 949.951.3539  
[www.monobind.com](http://www.monobind.com)



#### 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)

