

## НАБОР ИНСУЛИН [I-125] IRMA (Номер по каталогу: RK-400CT)

Система инсулин [<sup>125</sup>I] предназначена для количественного определения инсулина в сыворотке крови человека. Количественное определение инсулина может проводиться в диапазоне от 0 до 500 мкМЕ/мл (0-17,5 нг/мл). Каждый набор содержит количество материалов достаточное для анализа 100 пробирок, позволяя составить одну стандартную кривую и проанализировать 42 неизвестных и 1 контрольный образец в двух экземплярах.

### Введение

Инсулин представляет собой легкий полипептидный гормон с молекулярной массой 6000. Он синтезируется в бета-клетках поджелудочной железы из своего предшественника проинсулина. Проинсулин ферментативно расщепляется на инсулин и С-пептид, которые аккумулируются в поджелудочной железе и затем в эквивалентных количествах секретируются в кровеносную систему. Инсулин состоит из двух полипептидных цепочек: А (21 аминокислота) и В (30 аминокислот), которые связаны двумя дисульфидными мостиками. Если аминокислотная последовательность С-пептида у различных типов млекопитающих значительно различается, то в случае инсулина подобные различия незначительны: напр., свиной и бычий инсулин отличаются от человеческого только по одной и трем аминокислотам соответственно.

Инсулин представляет собой важный метаболический гормон, который оказывает прямое и косвенное воздействие на организм. Его основное влияние заключается в стимуляции синтеза и накопления макромолекул, играющих роль в обеспечении энергией и в регуляции метаболических процессов. Инсулин повышает транспорт глюкозы через клеточные мембраны, помогает прохождению других моносахаридов, аминокислот, ионов калия и магния в клетки.

Инсулин способствует утилизации и окислению глюкозы, гликогенезу, липогенезу, а также образованию АТФ, ДНК и РНК. Инсулин стимулирует эти процессы в мышцах, печени и жировой ткани, но не оказывает такого воздействия на клетки крови и головного мозга, не стимулирует реабсорбцию глюкозы в почечных канальцах и слизистой оболочке кишечника. Симптомы сахарного диабета могут быть связаны с неадекватной реакцией инсулина на концентрацию глюкозы. В то время, как при явно выраженном сахарном диабете понижается инсулиновый ответ, то на начальных стадиях диабета уровень инсулина у пациентов может быть нормальным или даже повышенным и различная степень повышения может быть определена при помощи стимулирующих тестов.

Гипергликемия натощак у пациентов, не страдающих избыточным весом, как правило, сопровождается нормальным уровнем инсулина в кровотоке, в то время как у пациентов с ожирением уровень инсулина повышен пропорционально степени ожирения.

### Принцип метода

Технология, применяемая в системе иммуно-радиометрического количественного определения (IRMA), предполагает использование двух высокоафинных моноклональных антител. Сигнальное антитело, меченое <sup>125</sup>I, связывается с эпитопом молекулы инсулина, которая пространственно отличается от молекулы которая распознается биотин-иммобилизованным антителом. Два антитела одновременно реагируют с антигеном, который присутствует в стандарте или в образце, что приводит к образованию комплекса иммобилизованное антитело – антиген – сигнальное антитело, также известного как "сандвич".

В течение 2-часового инкубационного периода иммуно-комплекс иммобилизуется на реактивной поверхности пробирок, покрытых стрептавидином. После инкубации реакционная смесь удаляется, пробирки тщательно промываются и после этого измеряют радиоактивность в гамма-счетчике.

Концентрация антигена прямо пропорциональна уровню радиоактивности в пробирках. Путем построения калибровочной кривой, в которой отражаются полученные значения в сравнении с серией калибраторов, содержащих известное количество инсулина, может быть определена искомая концентрация инсулина в образцах пациента.

### Содержание набора

- 1 флакон МЕТКИ, готовой к использованию. 21 мл на флакон, содержащий < 980 кБк <sup>125</sup>I-сигнальные молекулы и иммобилизованные антитела в буфере с красным красителем и 0,1% NaN<sub>3</sub>.
- 6 флаконов СТАНДАРТОВ (S0-S5), лиофилизированных. 1,0 мл сыворотки лошадей, содержащей 0,1% NaN<sub>3</sub>. Концентрация сывороток (S0-S5): 0, 5, 15, 50, 150, 500 мкМЕ/мл.
- 1 флакон КОНТРОЛЬНОЙ СЫВОРОТКИ, лиофилизированной. 1,0 мл сыворотки крови человека, содержащей 0,1% NaN<sub>3</sub>. Концентрация контрольной сыворотки указана в сертификате качества, который прилагается.
- 2 упаковки ПРОБИРОК С ПОКРЫТИЕМ, готовых к использованию. 2x50 пробирки, 12 x 75 мм, упакованные в пластиковые коробки.

- 1 флакон КОНЦЕНТРАТА ПРОМЫВОЧНОГО БУФЕРА (20 мл), содержащего 0,2% NaN<sub>3</sub>. *Смотрите «Приготовление реактивов».*

Сертификат качества  
Листок-вкладыш.

### Необходимые материалы, инструменты и оборудование

Полистироловые или полипропиленовые пробирки с закругленным дном, около 12 x 75 мм, автоматические пипетки (50 мкл, 100 мкл и 500 мкл), вихревой смеситель, круговой шейкер, гамма-счетчик

**Рекомендуемые инструменты и оборудование:**

автоматические пипетки.

### Сбор и хранение образцов

Образцы сыворотки могут быть подготовлены в соответствии с общей процедурой, которая обычно используется в клинической лабораторной практике. Образцы можно хранить при температуре 2-8 °С в случае, если анализ будет проводиться в течение 48 часов, иначе аликвоты должны быть сохранены в условиях глубокого замораживания (-20 °С). Перед анализом образцы необходимо разморозить и тщательно перемешать. Следует избегать повторного замораживания и оттаивания. Не используйте липемические, гемолизированные или мутные образцы.

### Приготовление и хранение реактивов

Добавьте к *лиофилизированному стандарту и контрольной сыворотке* 1,0 мл дистиллированной воды и аккуратно перемешайте встряхиванием или вихревыми движениями (следует избегать образования пены). Убедитесь, что содержимое полностью растворилось и уравновесьте раствор при комнатной температуре в течение как минимум 20 минут. Для повторного использования оставшегося реактива его можно хранить при температуре -20°C в течение двух месяцев.

Добавьте концентрат промывочного буфера (20 мл) к 1000 мл дистиллированной воды, чтобы получить 1020 мл промывочного раствора. Разбавленный раствор можно хранить при температуре 2-8 °С до истечения срока годности.

Хранить реактивы после вскрытия следует при температуре от 2°C до 8°C. При такой температуре реактив (кроме восстановленного стандарта и контроля) стабилен до истечения срока годности. Фактический срок годности указан на этикетке и в сертификате качества.

### ВНИМАНИЕ!

Уравновесьте все реагенты и образцы сыворотки при комнатной температуре. Перед использованием тщательно перемешайте все реактивы и образцы. Избегайте чрезмерного пенообразования.

## Процедура количественного определения

(Краткое описание процедуры см. в Таблице 1.)

1. Перед использованием уравновесьте реагенты и образцы до комнатной температуры.
2. Промаркируйте в двух экземплярах пробирки с покрытием для каждого стандарта, контрольной сыворотки и образца.
3. Аккуратным перемешиванием гомогенизируйте все реактивы и образцы, избегая вспенивания.
4. Внесите в предварительно промаркированную пробирку по 100 мкл стандартов, контроля и образцов. Для поддержания пробирок используйте штатив. Не трогайте и не царапайте наконечником пипетки внутреннюю поверхность дна пробирок.
5. С помощью пипетки поместите в каждую из пробирок 200 мкл метки. (Для общего количества отложите 2 пробирки.)
6. Прочно зафиксируйте штатив на шейкере. Включите шейкер и настройте скорость, подходящую для того, чтобы жидкость в каждой пробирке постоянно вращалась и перемешивалась (рекомендуемая скорость 600 об/мин).
7. Помешивайте пробирки в течение 2 часов при комнатной температуре.
8. Добавьте в каждую пробирку по 2,0 мл разбавленного промывочного буфера. Слейте супернатант из всех пробирок путем переворачивания штатива. Поместите штатив на фильтровальную бумагу в перевернутом состоянии на 2 минуты.
9. Верните штатив в первоначальное положение и повторите шаг-8 дважды.
10. Рассчитайте радиоактивность каждой пробирки в гамма-счетчике в течение как минимум 60 секунд.
11. Рассчитайте концентрацию инсулина.

**Таблица 1. Протокол количественного определения**

(все объемы указаны в микролитрах)

Пробирки	Общее	Стандарт	Образец	Контроль
Стандарт		100		
Образец			100	
Контроль				100
Метка	(200)	200	200	200
Перемешивать в течение 2 часов при комнатной температуре.				
Промывочный буфер		2000	2000	2000
Слить жидкость и поместить на фильтровальную бумагу.				
Промывочный буфер		2000	2000	2000
Слить жидкость и поместить на				

фильтровальную бумагу.				
Промывочный буфер		2000	2000	2000
Слить жидкость и поместить на фильтровальную бумагу.				
Рассчитать радиоактивность (60 сек/пробирка).				
Рассчитать результаты.				

## Расчет результатов

Расчет результатов представлен с использованием репрезентативных данных. Полученные данные должны быть схожими с данными, представленными в Таблице 2.

Рассчитайте среднее значение в минуту (cpm) для каждой из пар анализируемых пробирок. Рассчитайте нормализованный процент связывания для каждого стандарта, контроля и образца соответственно, используя следующую формулу:

$$B/T(\%) = \frac{S_{1-5} / C / M_x (\text{cpm}) - S_0 (\text{cpm})}{T(\text{cpm})} \times 100$$

Используя логарифмическую миллиметровую бумагу постройте график B/T(%) для каждого стандарта относительно соответствующей концентрации инсулина. Определите концентрацию инсулина в контроле и неизвестном образце методом интерполяции по калибровочной кривой. Так же доступна автоматизированная система обработки данных.

**Таблица 2. Типичные данные количественного определения**

Пробирки	Количество cpm	Среднее cpm	B/T %	мкМЕ/мл
T	384407 380750 379270	381475		
S0	141 114 117	124	0	
S1	497 470 483	484	0.1	
S2	1663 1662 1624	1650	0.4	
S3	9028 8961 8975	8988	2.4	
S4	44420 43739 44724	44294	11.6	
S5	173001 167052 167520	169191	44.4	
C	6708 6601 6724	6678		40.1

## Типичная стандартная кривая



## Характеристика количественного определения

### Калибровка

Стандарты откалиброваны согласно международному стандарту NIBSC 66/304.

### Аналитическая чувствительность

Аналитическая чувствительность количественного определения, рассчитанная из 2хСО значения при нулевом стандарте и из наклона кривой при нулевой дозировке, составляет 0.6 мкМЕ/мл.

### Ожидаемые значения

Рекомендуется, чтобы каждая лаборатория определяла собственный диапазон эталонных значений. Была проведена оценка у пациентов с нормальным уровнем глюкозы натощак и у практически здоровых доноров. Значения, представленные ниже должны рассматриваться только с информационной целью.

	Кол-во образцов	Медиана (мкМЕ/мл)	95% диапазон (мкМЕ/мл)
Натощак	100	5.15	1 – 30
После еды	120	14.15	3 - 67

Полученные результаты следует интерпретировать только в контексте общей клинической картины. Ни один из диагностических наборов не может быть использован в качестве единственного доказательства наличия какого-либо заболевания либо нарушения.

**Преобразование СИ значений** может быть выполнено в соответствии со следующей формулой:

$$1 \text{ мкМЕ/мл} = 5,99 \text{ пмоль/л}$$

$$1 \text{ нг/мл} = 28,7 \text{ мкМЕ/мл}$$

### Специфичность

Перекрестная реактивность с человеческим проинсулином составляет 40%. На основании соотношения проинсулин/инсулин в обычных физиологических условиях (около 5%) возможная ошибка, обусловленная проинсулином должна быть менее 2%.

## Внутрисубъектная вариабельность

Среднее значение мкМЕ/мл	CV %	Кол-во повторов
5.4	4.2	15
13.8	2.4	15
45	0.8	15
89	4.4	15
149	0.8	15

## Межсубъектная вариабельность

Среднее значение мкМЕ/мл	CV %	Кол-во повторов
4.7	17.1	16
20.9	4.5	16
40.5	2.4	16
65.0	2.4	16
102.1	3.2	16
152.6	3.2	16

## Высокодозный «эффект крючка»

При концентрациях инсулина до 2500 мкМЕ/мл высокодозный «эффект крючка» отсутствовал.

## Восстановление

Под восстановлением понималось зафиксированное увеличение, выраженное в процентах от ожидаемого роста пиков в образцах сыворотки крови с известным количеством инсулина. Для 6 образцов сыворотки крови с инсулином на 3 уровнях было получено следующее значение:  $95.1\% \pm 6.4\%$ .

## Линейность

32 индивидуальных образца сыворотки были двукратно разведены с нулевым стандартом и измерены согласно протоколу набора. Следующее уравнение, полученное для фактической (Y) относительно ожидаемой (X) концентрации демонстрирует хорошую линейность:

$$Y = 0.9182X - 0.5741 \quad R^2 = 0.9933$$

## Дополнительная информация

Не следует смешивать или заменять компоненты из различных партий или наборов разных производителей.

## Меры предосторожности

### Радиоактивность

Данный продукт содержит радиоактивный материал. Пользователь несет ответственность за соблюдение местных законов или правил по использованию радиоактивных материалов.

### Биологическая опасность

Продукты человеческой крови, которые используются в наборе, были получены от здоровых доноров. Они были подвергнуты индивидуальным исследованиям с использованием утвержденных методик (иммуноферментный анализ), по результатам которых были получены отрицательные результаты на наличие антител к вирусу иммунодефицита

человека (анти-ВИЧ-1/2), антител к вирусу гепатита С (anti-HCV), антитрепонемных антител и поверхностных антигенов вируса гепатита В (HBsAg).

При работе с образцами, полученными от человека, которые подлежат исследованию с использованием диагностических наборов, необходимо всегда соблюдать осторожность. Даже если пациент прошел необходимые обследования, ни один из методов не может дать полной гарантии отсутствия инфекционных агентов. Следовательно, с образцами крови человека необходимо обращаться как с *потенциально инфекционно опасным материалом*.

Все продукты животного происхождения и их производные были получены у здоровых животных. Тем не менее, части набора, содержащие компоненты животного происхождения, должны рассматриваться как *потенциально инфекционно опасный материал*.

## Химическая опасность

В качестве антибактериального агента компоненты содержат азид натрия. При утилизации отходы следует смывать большим количеством воды, чтобы предотвратить накопление взрывоопасных азидов металлов в системе водопровода, который может содержать части из меди и свинца. Содержание азидов в каждой упаковке составляет 68 мг.

## Условия хранения и срок годности

Хранить при температуре 2-8°C

Срок годности: 67 дней с момента готовности.

	Использовано		Номер партии
	Температурный предел		Контроль
	Внимание, обратитесь к сопроводительным документам		Стандарт
	Биологическая опасность		Метка
	Обратитесь к инструкции по использованию		Промывочный буфер
	Номер по каталогу		Пробирка с покрытием
	Производитель		Радиоактивный материал
	Медицинское устройство для проведения диагностики <i>in vitro</i>		

Коммерческий e-mail: [commerce@izotop.hu](mailto:commerce@izotop.hu)



ООО «Институт изотопов»  
H-1121 Budapest, Konkoly Thege M. út 29-33.

☒ H-1535 Будапешт, Р.О.В. 851 Венгрия  
Phone: + 36 1 3959081  
Fax: + 36 1 395924

Обновлено: март 2021

Вебсайт: <http://www.izotop.hu>

Технический e-mail: [immuno@izotop.hu](mailto:immuno@izotop.hu)