



**ELISA** ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY

**Microwell Method**

**Anti-Insulin**

**Cat. No. R97420**

*Pro in vitro diagnostické použití*

P ř í b a l o v ý l e t á k

ELISA souprava pro kvantitativní stanovení protilátek proti hovězímu a prasečímu insulínu a upravenému lidskému insulínu v séru nebo plazmě



---

Microwell Method - 96 jamek  
(12 x 8-jamek potažených antigenem)

Odlamovací

## ZÁKLADNÍ INFORMACE

- **Vlnová délka**  
Měřicí filtr: 450 nm  
Volitelný referenční filtr: 600 - 690 nm
- **Doba inkubace**  
60 minut při LT (30/15/15)
- **Enzyme Conjugate**  
HRP (Křenová peroxidáza)
- **Substrate**  
TMB (3,3',5,5'-tetrametylbenzidin)
- **Vzorek**  
Sérum nebo plazma
- **Stabilita vzorků**  
neředěné: 5 dní ve 2-8°C; až 6 měsíců v - 20 °C
- **Kalibrační rozmezí**  
0 - 100 U/ml
- **Senzitivita**  
0.5 U/ml
- **Doba použitelnosti a stabilita reagensů**  
Souprava: 12 měsíců od data výroby  
Reagencie: viz datum expirace na štítku  
Ředící roztok: stabilní 30 dní po rozpuštění ve 2 to 8°C  
Promývací roztok: stabilní 30 dní po rozpuštění ve 2 to 8°C

### Indikace

- Marker diabetu I. typu (autoprotilátky)
- Inzulinová terapie (protilátky k inzulinu zvířecího původu)

## SLOŽENÍ SOUPRAVY

<b>Microwell plate</b> Mikrotitrační destička	12x <b>8 jamkové stripy</b> s odlamovatelnými jamkami potažené směsí vysoce purifikovaných hovězích, prasečích a rekombinantních lidských inzulinů, <b>k přímému použití.</b>
<b>Positive Control</b> Pozitivní kontrola	1 lahvička, 1,5 ml, <b>(červené víčko), k přímému použití use.</b>  Hodnoty a rozmezí viz Quality Control Certificate
<b>Negative Control</b> Negativní kontrola	1 lahvička, 1,5 ml, <b>(modré víčko), k přímému použití use.</b>  Hodnoty a rozmezí viz Quality Control Certificate
<b>Calibrators</b> Kalibrátory	6 lahviček, každá 1,5 ml, <b>k přímému použití</b>  0, 6.3; 12.5; 25, 50; and 100 U/ml
<b>Enzyme Conjugate</b> Enzym konjugát	1 lahvička s králičím polyklonálním anti-h-IgG-IgG HRP konjugátem, 15 ml, barevně odlišeno <b>růžová, k přímému použití.</b>
<b>Substrate Solution</b> Substrát	1 lahvička TMB, 15 ml, <b>k přímému použití.</b>
<b>Stop Solution</b> Stopovací roztok	1 lahvička kyseliny fosforečné (<5%), 15 ml, <b>k přímému použití.</b>
<b>Sample Diluent</b> Ředící roztok	1 lahvička, 20 ml, <b>koncentrát (5x),</b> barevně odlišeno <b>žlutá.</b>
<b>Wash Buffer</b> Promývací roztok	1 lahvička, 20 ml, <b>koncentrát (50x).</b>

## DALŠÍ POTŘEBNÝ MATERIÁL

- Deionizovaná nebo destilovaná voda
- Odměrné válce a kádinky
- **Makropipety** 5 µl až 1000 µl.
- **Multikanálové mikropipety;**
- **Stepper;**
- **Reader mikrotitračních destiček** s možností nastavení odečítání absorbance pro 450 nm. Pokud je možnost použití dvou vlnových délek, možnost nastavit referenční filtr na 600-690 nm.
- **Automatická promývačka mikrotitračních destiček** s rozplňováním 300 µl.

Fotometry a promývačky jsou v nabídce firmy DIALAB.

**SHRnutí**

Diabetes typu I je charakterizován omezenou nebo zcela chybějící produkcí inzulínu. Morfologické studie prokázaly destrukci beta buněk zvaných Langerhansovy buňky. Množství studií popsaly výskyt protilátek přímo proti ostrůvkům buněk a inzulínu jako přímý důsledek vzniku tohoto onemocnění.

Anti-insulin protilátky se nacházejí u 37 % pacientů, u kterých byl nově diagnostikován diabetes I typu.

Byla prokázána souvislost mezi přítomností anti-insulinu a protilátek proti Langerhansovým buňkám.

Anti-insulin protilátky mohou být prokázány několik měsíců a v některých případech i několik let před plnými klinickými projevy onemocnění. Občas se mohou vyskytnout i autoprotilátky proti Pro-insulinu.

Tabulka ukazuje procentuální výskyt různých autoprotilátek u diabetu typu I v porovnání se kontrolním vzorkem zdravých:

	Diabetes typ I(%)	Zdraví(%)
Protilátky k Langerhansovým buňkám	32	1
Ab k Ag Langerhansových buněk	Cca 50	Cca 2
Protilátky proti anti-insulinu	Až 70	0
Anti-thyroid peroxidáza (Anti-TPO)	18	6
Anti-single stranded DNA (Anti-ssDNA)	85	9

**PRINCIP STANOVENÍ**

ELISA test je prováděn jako nepřímé imunostanovení sendvičového typu na pevné fázi. Na mikrotitrační destičce je vázána směs hovězího, prasečího a upraveného lidského inzulínu, k redukování nespecifických vazeb jsou některé konce zablokovány.

Step 1 Protilátky specifické k inzulínu, které jsou přítomny v kontrolách, kalibrátorech a patientských se navážou na potažený antigen. Komplex antigen-protilátka reaguje s konjugátem (HRP-h-IgG) za vzniku „sendvičů“ mezi protilátkami v pevné fázi a konjugátem.

Step 2 Přidáním substrátu (TMB) dochází k barevné změně.

Step 3 Intenzita zbarvení je přímo úměrná koncentraci protilátek ve vzorku. Tato reakce se následně ukončí přidáním stopovacího roztoku. Optická hustota se změří při 450 nm. Výsledek je vyjádřen v jednotkách na ml (U/ml).

**OČEKÁVANÉ HODNOTY****Normální hodnoty**

Studii vzorků krve zdravých dárců bylo stanoveno toto rozmezí

Interpretace	anti-Insulin [U/ml]
normální:	< 10
zvýšené:	> 10

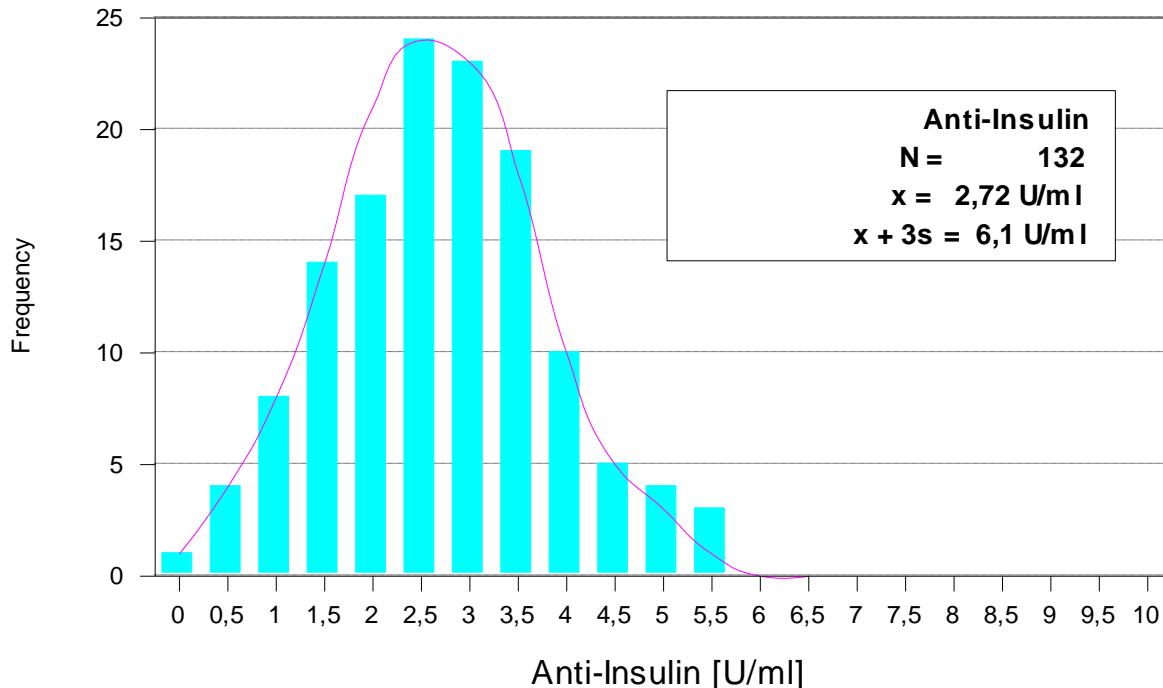
Pozitivní výsledky musí být verifikovány až s posouzením celkového zdravotního stavu pacienta. Stejně tak i každé rozhodnutí o terapii by mělo být přijímáno individuálně. Doporučujeme každé laboratoři stanovit si vlastní rozmezí normálních a

## Anti-Insulin

patologických hodnot.

Níže uvedené hodnoty jsou pouze orientační.

### Hodnoty anti-inzulinu u zdravých dárců krve.



## ČINIDLA

### Skladování

- Všechna činidla skladujte ve 2° - 8°C. Nezamrazujte!

## PŘÍPRAVA

- Potažené stripy jsou použitelné pouze jednou.
- Pozitivní kontrola, negativní kontrola, kalibrátory, enzym konjugát, substrát a stopovací roztok jsou připraveny k přímému použití a nevyžadují ředění.
- Promývací a ředící roztok jsou koncentráty a je potřeba je naředit (viz str. 7)
- K zajištění správných výsledků je nezbytné přesně dodržovat návod k použití.
- Nepotřísněte se **TMB (3,3',5,5'-Tetramethyl-benzidine)**. Pokud si potřísníte kůži, omyjte postižené místo vodou a mýdlem.
- Stopovací roztok obsahuje **kyselinu fosforečnou**. Při potřísnění omyjte vodou a vyhledejte lékařskou pomoc.
- Vyhněte se kontaktu pufovaného roztoku **peroxidu** a snadno oxidujících materiálů, v extrémních teplotách může dojít k samovolnému hoření.
- Nepoužívejte po uplynutí doby použitelnosti.
- Nepoužívejte, pokud nejsou reagentie čisté nebo obsahují usazeniny.
- Nezaměňujte složky soupravy z různých zdrojů, i když mají stejné katalogové číslo DIALAB.

- Pro minimalizaci možnosti mikrobiální nebo křížové kontaminace dodržujte pravidla SLP.
- Všechny složky lidského původu byly testovány na HBsAg, HCV, HIV-1 and 2 and HTLV-I a shledány negativními postupy doporučenými FDA. Přesto je se všemi deriváty lidské krve a se vzorky pacientů třeba zacházet jako s látkami potenciálně infekčními. Dodržujte SLP ve skladování, rozplňování, manipulaci s těmito materiály.

### ODBĚR A MANIPULACE SE VZORKEM

- Pro testování se používají vzorky lidského **séra nebo plazmy**. Při odběru není potřeba být na lačno, ani jiná forma diety.
- Silně hemolyzované, lipemické nebo mikrobiálně kontaminované vzorky mohou se stanovením interferovat, a proto by neměly být použity. Ani bilirubin ani hemolýza nemají na stanovení významný vliv.
- Skladujte ve **2°- 8°C** maximálně **5 dní**. Pro déletrvající skladování zamrazte. Nezmrazujte a nerozmrazujte opakovaně.
- **Příprava vzorku** viz str. 7.

## POSTUP

### Poznámky k postupu

- Před započítáním testu si pečlivě pročtěte návod.
- Před provedením testu je nutné všechny komponenty vytemperovat na laboratorní teplotu. Nepoužité vzorky a reagentie vraťte po použití neprodleně do lednice.
- Odeberte potřebné množství jamek a ihned dobře uzavřete (k zabránění kondenzace). Vraťte do lednice.
- Před stanovením si naředte všechny vzorky pacientů.
- Správná promývací technika je důležitá. Při manuálním promývání naplňte všechny jamky naředěným promývacím roztokem. Odstraňte veškerou tekutinu vyklepnutím a následným vyklepáním na savém povrchu (papírový ručník) nebo odsátím. Při promývání na automatické promývače dodržujte pokyny výrobce.
- K dávkování používejte 8-kanálovou pipetu. Krokování je hladší a inkubační čas stejnoměrný.
- Ve všech krocích je důležité časování. Začátek inkubace je vždy po rozplnění do všech jamek.

### Příprava činidel

Ředící roztok (5x):

Naředte před použitím na celkový objem 100 ml destilovanou vodou.
---

Promývací roztok (50x):

Naředte před použitím na celkový objem 1000 ml destilovanou vodou.
--

### Příprava ředění vzorků

Vzorky séra nebo plazmy: Ředte 1:100 ředícím roztokem. Např.:

10 µl séra nebo plazmy	+ 990 µl ředícího roztoku
------------------------	---------------------------

**Postup**

- Step 1 Připravte ředící a promývací roztok.
- Step 2 Naředte vzorky.
- Step 3 Připravte si protokol s rozmístěním vzorků do jamek podle níže uvedeného schématu. **6 kalibrátorů** (standardů) (SA-SF), **2 pozitivní kontroly** (PC) a **2 negativní kontroly** (NC). Na uživateli je rozhodnutí o umístění vzorků pacienta (P) v dubletu.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Kalibrátor	Konc. U/ml
<b>a</b>	SA	SE	P1										SA	0
<b>b</b>	SA	SE	P1										SB	6.3
<b>c</b>	SB	SF	P2										SC	12.5
<b>d</b>	SB	SF	P2										SD	25
<b>e</b>	SC	PC	P..										SE	50
<b>f</b>	SC	PC	P..										SF	100
<b>g</b>	SD	NC												
<b>h</b>	SD	NC												

- Step 4 Vyjměte odpovídající počet jamek ze sáčku, vraťte nepoužité a dobře uzavřené vraťte do lednice. Jamky opatrně vložte do nosiče.
- Step 5 Pipetujte **100 µl kalibrátorů, kontrol a předředěných vzorků** do jamek.
- Step 6 Inkubujte **30 minut** při laboratorní teplotě. (20-28°C)
- Step 7 Vylijte obsah jamek a promyjte **3x 300 µl** promývacího roztoku. Minimální čas namočení je 25sec. Promývací roztok dobře z jamek odstraňte, nejlépe vyklepáním na savý povrch.
- Step 8 Pipetujte do jamek **100 µl Enzym konjugátu**.
- Step 9 Inkubujte **15 minut** v laboratorní teplotě. (20-28°C)
- Step 10 Promyjte všechny jamky **3 x** jako v kroku 7.
- Step 11 Pipetujte **100 µl Substrátu** do všech jamek ve stejném pořadí a časování jako enzym konjugát.
- Step 12 Inkubujte **15 minut** v laboratorní teplotě. (20-28°C)
- Step 13 Přidejte **100 µl Stopovacího roztoku** do všech jamek ve stejném pořadí a časování jako substrát. Nechte 5 minut odpočívat 5 minut.
- Step 14 Odečtěte absorbanci při **450 nm** nebo při **450/600-690 nm**. Vytvořené zbarvení je stabilní 30 minut. Optickou hustou odečtěte během této doby.



## Kontrola kvality

Součástí každé soupravy je pozitivní a negativní kontrola, které je třeba v dubletu použít při každém stanovení.

## VYHODNOCENÍ TESTU

**Manuální vyhodnocení:** doporučujeme vynesení Lin-Log

Napřed spočítejte průměry OD pro každý kalibrátor. **Standardní křivku** vynesete do grafu jako závislost průměru OD kalibrátorů a odpovídající koncentrace. Proložte nejlépe vyhovující křivku. Neznámé koncentrace vzorků pacientů odečtete z křivky.

**Automatické vyhodnocení:** doporučujeme 4-Parameter-Fit

Naprogramujte 4-Parameter-Fit v lin-log souřadnicích, je doporučeno pro OD a koncentrace. Proložení Spline v log-log souřadnicích také vyhovuje. Vzorky se odečtou přímo z kalibrační křivky.

## Příklad typické kalibrační křivky

Tabulky a graf dole ukazují typické výsledky při stanovení koncentrace anti-inzulinu. Tato data jsou pouze ilustrační, nelze je použít pro výpočet výsledku.

Calibrators									
No	Position	OD 1	OD 2	Mean	Conc. 1	Conc. 2	Mean	decl.Conc.	CV %
STA	A 1/B 1	0.036	0.032	0.034	0.1	0.1	0.1	0.0	8
STB	C 1/D 1	0.354	0.345	0.349	6.3	6.1	6.2	6.3	2
STC	E 1/F 1	0.621	0.602	0.611	12.9	12.4	12.7	12.5	2
STD	G 1/H 1	0.984	1.005	0.994	25	25	25	25	1
STE	A 2/B 2	1.503	1.500	1.502	50	50	50	50	0
STF	C 2/D 2	2.057	2.035	2.046	102	99	100	100	1

**Note:** 0-kalibrátor není vhodný pro počítačové vyhodnocení.

## OMEZENÍ TESTU

Test nesmí být prováděn s vysoce hemolyzovanými, mikrobiálně kontaminovanými nebo lipemickými vzorky. Metoda je určena pouze pro testování vzorků lidského séra.

**HODNOCENÍ FUNKČNÍ ZPŮSOBILOSTI****Sensitivita**

Detekční limit je koncentrace 0,5 U/ml.

**Výtěžnost**

Testovací séra s vysokou koncentrací protilátek byla ředěna ředícím roztokem a testována pomocí Anti.inzulín soupravy.

Vzorek	Ředění	Nalezená [U/ml]	Očekávaná [U/ml]	O/E
1	1:50	77.6		
	1:100	41.7	38.8	107 %
	1:200	21.1	19.4	109 %
	1:400	10.3	9.7	106 %
	1:800	4.7	4.9	96 %
2	1:100	100.7		
	1:200	50.7	50.4	101 %
	1:400	23.7	25.2	94 %
	1:800	11.1	12.6	88 %
	1:1600	5.3	6.3	84 %

**Přesnost**

Při Intra-Assay byly testovány 3 vzorky ve 24 stanoveních. Run-to-run stanovení bylo počítáno z výsledků 5 nezávislých testů se 6 stanoveními:

Intra-Assay		
Vzorek č.	Průměr x [U/ml]	CV [%]
1	11.2	2.5
2	27.6	2.9
3	59.7	4.0

Inter-Assay		
Vzorek č.	Průměr x [U/ml]	CV [%]
1	11.6	6.0
2	31.2	5.2
3	69.5	4.3

## LITERATURA

1. Reeves, W.G. Insulin Antibody Determination: Theoretical and Practical Considerations. *Diabetologia* 24, 399 (1983).
2. Atkinson, M.A., Fisk, D.D., Spillar, R.P. and MacLaren, N.K. Insulin antibodies as markers for Insulin dependend diabetes mellitus (IDD). *Diabetes* 34, 926 - 930 (1985).
3. Willein, T., Nicholson, S. and Casey, C. A Micro Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Insulin Antibodies in Serum. *J. Imm. Methods* 76, 185 (1985).
4. Kobayashi, N. et al. A Solid-Phase Enzyme Immunoassay for Anti-Insulin Antibody in Diabetes Mellitus Patients. *J. Imm. Methods* 84, 245 (1985).
5. Wissllein, T. et al. Value of Insulin Antibodies as Serum marker for Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. *Lancet* 1, 480 (1985).
6. Soeldner, J.S. et al. Insulin-Dependent Diabetes Mellitus and Autoimmunity: islet-cell Autoantibodies and beta-cell failure. *New Engl. J. Med.* 313, 893 (1985).
7. Torfs, C.P. et al. Long Term Frozen Sera for Epidemiological Studies of Antibodies. *Lancet* 1, 503 (1986).
8. Seino, S. et al. Characterization of Circulating Insulin in Insulin Autoimmuno Syndrome. *Clin. Endo. & Metab.* 62, 64 (1986).
9. Boitard, C.H. and McDewitt, H.O. Immunology of insulin-dependend diabetes mellitus. In. Cohen, J.R., (ed.) *Perspectives on autoimmunity*, 39-58 (1987). CRC Press, Boca Raton, FL
10. Nouvo, J.A., Baker, Jr., J.R., Wartowsky, I. et al. Autoantibodies to insulin are present in sera of patients with autoimmune thyroid diseases. *Diabetes*, 37, 317-320 (1988).
11. Witkin, T.J. Insulin Autoantibodies as markers for type I diabetes. *Endocrine Reviews*, 11, 92-104 (1990).

## ELISA Enzyme Linked Immunosorbent Assay



DIALAB Produktion und Vertrieb von chemisch – technischen Produkten  
und Laborinstrumenten Gesellschaft m.b.H.  
A – 2351 Wiener Neudorf, Austria, IZ-NÖ Süd, Hondastrasse, Objekt M55  
Phone: ++43 (0) 2236 660910-0, Fax: ++43 (0) 2236 660910-30  
e-mail: office@dialab.at