



DCM076-8
Ed. 01/2015

INSULIN ELISA

per analisi di routine

Determinazione immunoenzimatica diretta del livello di insulina in siero o plasma umano

IVD



LOT

Vedere etichetta esterna



Σ = 96 test

REF DKO076

DESTINAZIONE D'USO

Il kit Insulin ELISA è un dosaggio immunoenzimatico diretto in fase solida per la determinazione quantitativa dell'insulina in siero o plasma umano.

Il kit Insulin ELISA è destinato al solo uso di laboratorio.

1. SIGNIFICATO CLINICO

L'insulina è un ormone polipeptidico che regola il metabolismo dei carboidrati. Oltre ad avere come principale ruolo l'omeostasi dei carboidrati, ha effetti sul metabolismo dei lipidi e regola il rilascio dei depositi lipidici del fegato.

L'insulina è coinvolta nell'assorbimento del glucosio nel muscolo e nel tessuto adiposo, nell'aumento della replicazione del DNA e nella sintesi proteica, modifica l'attività di numerosi enzimi (effetto allosterico), favorisce la sintesi del glicogeno, degli acidi grassi, l'assorbimento degli aminoacidi, inibisce la proteolisi, la lipolisi, e la gluconeogenesi.

Le cellule Beta rilasciano l'insulina in modo glucosio-dipendente.

I livelli di glucosio nel sangue variano da circa 70 mg/dL a 110 mg/dL (3,9 – 6,1 mmol/L), tranne subito dopo il consumo di un pasto, quando il livello del glucosio nel sangue aumenta temporaneamente. Questo effetto omeostatico è il risultato di molti fattori, di cui la regolazione dell'ormone è il più importante.

Vi sono alcune patologie in cui è coinvolta l'insulina: diabete mellito, insulinoma, sindrome metabolica e sindrome da ovaie policistiche. Ci sono due tipi di diabete mellito: tipo 1 (degradazione autoimmune di insulina prodotta dalle cellule beta del pancreas con conseguente mancanza assoluta dell'insulina) e tipo 2 (sindrome multifattoriale dovuta ad una predisposizione genetica ed influenza dei fattori ambientali, ad esempio obesità, età ed inattività fisica, con conseguente resistenza all'insulina delle cellule che richiedono insulina per l'assorbimento del glucosio. Questa forma di diabete ha una componente fortemente ereditaria). In entrambi i casi la produzione dell'insulina deve essere supportata per via farmacologica di insulina somministrata per via endovenosa.

La determinazione quantitativa dei livelli di insulina nel sangue può aiutare a determinare le dosi.

2. PRINCIPIO DEL METODO

Il test Insulin ELISA è basato sulla cattura simultanea dell'insulina umana da parte di due anticorpi monoclonali, uno immobilizzato nella micropiastre, l'altro coniugato con la perossidasi di rafano (HRP). Dopo un determinato periodo di incubazione, la separazione libero-legato si ottiene mediante semplice lavaggio della fase solida.

Succeivamente, l'enzima HRP presente nella frazione legata catalizza la reazione tra il Substrato (H_2O_2) ed il TMB Substrate, sviluppando una colorazione blu che vira al giallo dopo aggiunta dello Stop Solution (H_2SO_4).

L'intensità del colore sviluppato è proporzionale alla concentrazione di insulina presente nel campione.

La concentrazione dell'insulina nel campione è calcolata in base ad una curva di calibrazione.

3. REATTIVI, MATERIALI E STRUMENTAZIONE

3.1. Reattivi e materiali forniti nel kit

1. Calibrators (6 flaconi)

CAL0 (3 mL)	REF DCE002/7606-0
CAL1 (1 mL)	REF DCE002/7607-0
CAL2 (1 mL)	REF DCE002/7608-0
CAL3 (1 mL)	REF DCE002/7609-0
CAL4 (1 mL)	REF DCE002/7610-0
CAL5 (1 mL)	REF DCE002/7611-0

2. Control (1 flacone, 1 mL)

La concentrazione del Controllo è indicata nel Certificato di Analisi **REF DCE045/7603-0**

3. Conjugate (1 flacone, 13 mL)

Anticorpo monoclonale anti-insulina coniugato a perossidasi di rafano (HRP) **REF DCE002/7602-0**

4. Coated Microplate (1 micropiastre breakable)

Anticorpo monoclonale anti insulina adsorbito sulla micropiastre **REF DCE002/7603-0**

5. TMB Substrate (1 flacone, 15 mL)

H_2O_2 -TMB (0,26 g/L) (evitare il contatto con la pelle) **REF DCE004-0**

6. Stop Solution (1 flacone, 15 mL)

Acido Solforico 0,15 mol/L (evitare il contatto con la pelle) **REF DCE005-0**

7. 50X Conc. Wash Solution (1 flacone, 20 mL)

NaCl 45 g/L; Tween-20 55 g/L **REF DCE006-0**

3.2. Reattivi necessari non forniti nel kit

Acqua distillata.

3.3. Materiale e strumentazione ausiliare

Dispensatori automatici.

Letto per micropiastre (450 nm, 620-630 nm).

Note

Conservare tutti i reattivi a 20±8°C al riparo dalla luce.

Aprire la busta del reattivo 4 (Coated Microplate) solo dopo averla riportata a temperatura ambiente e chiuderla subito dopo il prelievo delle strip da utilizzare; una volta aperta è stabile fino alla data di scadenza del kit.

4. AVVERTENZE

- Questo test kit è per uso in vitro, da eseguire da parte di personale esperto. Non per uso interno o esterno su esseri Umani o Animali.
- Usare i previsti dispositivi di protezione individuale mentre si lavora con i reagenti forniti.
- Seguire le Buone Pratiche di Laboratorio (GLP) per la manipolazione di prodotti derivati da sangue.
- Materiali di origine animale usati per la preparazione di questo kit sono stati ottenuti da animali sani e le proteine bovine sono state ottenute da paesi non affetti da BSE, ma comunque questi materiali dovrebbero essere usati come potenzialmente contagiosi.
- Alcuni reagenti contengono piccole quantità di Proclin 300^R come conservante. Evitare il contatto con la pelle e le mucose.
- Il TMB Substrato contiene un irritante, che può essere dannoso se inalato, ingerito o assorbito attraverso la cute. Per prevenire lesioni, evitare l'inalazione, l'ingestione o il contatto con la cute e con gli occhi.
- La Stop Solution è costituita da una soluzione di acido solforico diluito. L'acido solforico è velenoso e corrosivo e può essere tossico se ingerito. Per prevenire possibili ustioni chimiche, evitare il contatto con la cute e con gli occhi.
- Evitare l'esposizione del reagente TMB/H₂O₂ a luce solare diretta, metalli o ossidanti. Non congelare la soluzione.
- Questo metodo permette la determinazione quantitativa di insulina da 3 a 200 µIU/mL.

5. PRECAUZIONI

- Si prega di attenersi rigorosamente alla sequenza dei passaggi indicata in questo protocollo. I risultati presentati qui sono stati ottenuti usando specifici reagenti elencati in queste Istruzioni per l'Uso.
- Tutti i reattivi devono essere conservati a temperatura controllata di 2-8°C nei loro contenitori originali. Eventuali eccezioni sono chiaramente indicate. I reagenti sono stabili fino alla data di scadenza se conservati e trattati seguendo le istruzioni fornite.
- Prima dell'uso lasciare tutti i componenti dei kit e i campioni a temperatura ambiente (22-28°C) e mescolare accuratamente.

- Non scambiare componenti dei kit di lotti diversi. Devono essere osservate le date di scadenza riportate sulle etichette della scatola e di tutte le fiale. Non utilizzare componenti oltre la data di scadenza.
- Qualora si utilizzi strumentazione automatica, è responsabilità dell'utilizzatore assicurarsi che il kit sia stato opportunamente validato.
- Un lavaggio incompleto o non accurato dei pozzetti può causare una scarsa precisione e/o un'elevato background. Per migliorare le prestazioni del kit su strumentazione automatica, si consiglia di aumentare il numero di lavaggi.
- Per la riproducibilità dei risultati, è importante che il tempo di reazione di ogni pozzetto sia lo stesso. Per evitare il time shifting durante la dispensazione degli reagenti, il tempo di dispensazione dei pozzetti non dovrebbe estendersi oltre i 10 minuti. Se si protrae oltre, si raccomanda di seguire lo stesso ordine di dispensazione. Se si utilizza più di una piastra, si raccomanda di ripetere la curva di calibrazione in ogni piastra.
- L'aggiunta del TMB Substrato dà inizio ad una reazione cinetica, la quale termina con l'aggiunta della Stop Solution. L'aggiunta del TMB Substrato e della Stop Solution deve avvenire nella stessa sequenza per evitare tempi di reazione differenti.
- Osservare le linee guida per l'esecuzione del controllo di qualità nei laboratori clinici testando controlli e/o pool di sieri.
- Osservare la massima precisione nella ricostituzione e dispensazione dei reagenti.
- Non usare campioni microbiologicamente contaminati, altamente lipemici o emolizzati.
- I lettori di micropiastre leggono l'assorbanza verticalmente. Non toccare il fondo dei pozzetti.

6. PROCEDIMENTO

6.1. Preparazione dei Calibratori (C₀...C₅)

I Calibratori sono pronti all'uso ed hanno le seguenti concentrazioni:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅
µIU/mL	0	3	10	30	80	200

Una volta aperti i Calibratori sono stabili per almeno 6 mesi a 2÷8°C.

6.2. Preparazione della Wash Solution

Prima dell'uso, diluire il contenuto di ogni fiala di "50X Conc. Wash Solution" con acqua distillata fino al volume di 1000 mL. Per preparare volumi minori rispettare il rapporto di diluizione di 1:50. La soluzione di lavaggio diluita è stabile a 2÷8°C per almeno 30 giorni.

6.3. Preparazione del campione

Seguire le buone norme di laboratorio nell'utilizzo di prodotti a base di sangue.

Per un accurato confronto al fine di determinare i valori normali, dovrebbero essere prelevati campioni di siero la mattina a digiuno.

Per ottenere il siero, il sangue dovrebbe essere raccolto in un tubo per prelievi senza additivi o

anticoagulanti; permettere al sangue di coagularsi; centrifugare il campione per separare il siero dalle cellule.

I campioni dovrebbero essere refrigerati a 2-8°C per un periodo massimo di 5 giorni. Se non possono essere dosati entro questo tempo, dovrebbero essere conservati a -20°C fino a 30 giorni. Evitare ripetuti cicli di congelamento e scongelamento.

Campioni di pazienti con concentrazioni di insulina al di sopra dei 200 µIU/mL possono essere diluiti (ad esempio 1:10 o superiori) con il Calibratore 0 e testati di nuovo. La concentrazione dei campioni si ottiene moltiplicando il risultato per il fattore di diluizione.

Il Controllo è pronto all'uso.

6.4. Procedimento

- **Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (22-28°C) per almeno 30 minuti.** Al termine del dosaggio riporre immediatamente tutti i reagenti a 2-8°C: evitare lunghi periodi a temperatura ambiente.
- Le strisce di pozzetti non utilizzate devono essere rimesse immediatamente nella busta richiudibile contenente il materiale essicante e conservate a 2-8°C.
- Per evitare potenziali contaminazioni microbiche e/o chimiche non rimettere i reagenti inutilizzati nei flaconi originali.
- Al fine di aumentare l'accuratezza dei risultati del test è necessario operare in doppio, allestendo due pozzetti per ogni punto della curva di calibrazione (C₀-C₅), due per ogni Controllo, due per ogni Campione ed uno per il Bianco.

Reagente	Calibratore	Campione /Controllo	Bianco
Calibratore C ₀ -C ₅	100 µL		
Campione /Controllo		100 µL	
Conjugate	100 µL	100 µL	
Incubare 2 h a temperatura ambiente (22-28°C). Allontanare la miscela di reazione. Lavare i pozzetti 3 volte con 0,3 mL di Wash Solution diluita. Nota importante: ad ogni step di lavaggio, agitare delicatamente la piastra per 5 secondi e successivamente rimuovere l'eccesso di soluzione di lavaggio sbattendo delicatamente la micropiastra capovolta su fogli di carta assorbente. Lavaggi automatici: se si utilizza strumentazione automatica effettuare almeno 5 lavaggi.			
TMB Substrate	100 µL	100 µL	100 µL
Incubare 15 minuti al buio a temperatura ambiente (22-28°C).			

Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL
Agitare delicatamente la piastra. Leggere l'assorbanza (E) a 450 nm contro una lunghezza d'onda di riferimento di 620-630 nm oppure contro il Bianco entro 5 minuti.			

7. CONTROLLO QUALITA'

Ogni laboratorio dovrebbe testare i controlli a valori bassi, medi e alti della curva di calibrazione per monitorare le performance del kit. Questi controlli dovrebbero essere trattati come sconosciuti ed i valori determinati in ogni procedura analitica eseguita. Tabelle di controllo di qualità dovrebbero essere effettuate per seguire le prestazioni dei reagenti forniti. Metodi statistici pertinenti dovrebbero essere usati per accertarne le tendenze. Deviazioni significative dalle prestazioni stabilite possono indicare un inosservato cambiamento nelle condizioni sperimentali o il decadimento dei reattivi del kit. Reattivi freschi dovrebbero essere utilizzati per determinare la causa delle variazioni.

8. RISULTATI

8.1. Note

La densità ottica (O.D.) di alcuni tra calibratori e campioni potrebbe risultare maggiore di 3,0, in questo caso, potrebbero essere fuori dal range di misura del lettore di micropiastra. È quindi necessario, per O.D. maggiori di 3,0, effettuare una lettura 405 nm oltre che a 450 nm e a 620 nm (filtro di riferimento per la sottrazione delle interferenze dovute alla plastica). Per lettori di micropiastre non progettati per leggere la piastra a tre differenti lunghezze d'onda allo stesso tempo, è consigliabile di procedere nel seguente modo:

- Leggere la micropiastra a 450 nm ed a 620 nm.
- Leggere ancora la piastra a 405 nm ed a 620 nm.
- Trovare i pozzetti le quali OD a 450 nm sono maggiori di 2,0
- Selezionare le corrispondenti ODs lette a 405 nm e moltiplicare questi valori a 405 nm per il fattore di conversione 3,0 (dove OD 450/OD 405 = 3,0), che è: $OD_{450\text{ nm}} = OD_{405\text{ nm}} \times 3,0$.

Attenzione: Il fattore di conversione 3,0 è solamente suggerito. Per una migliore accuratezza, l'utente è invitato a calcolarsi il fattore di conversione specifico per il proprio lettore.

8.2. Estinzione Media

Calcolare l'estinzione media (Em) di ciascun punto della curva di calibrazione (C₀-C₅) e di ogni campione.

8.3. Curva di calibrazione – Metodo automatico

Usare la smoothed cubic spline (suggerita) oppure la funzione 4 parametri logistic come algoritmo di calcolo.

8.4. Curva di calibrazione – Metodo manuale

Una curva dose-risposta è usata per determinare la concentrazione di insulina in un campione sconosciuto.

Registrare le OD ottenute dal tabulato del lettore della micropiastra.

Mettere in grafico le OD medie per ogni duplicato dei Calibratori contro le concentrazioni corrispondenti di insulina in $\mu\text{IU/mL}$ su grafico lineare.

Disegnare la migliore curva che fitti i valori attraverso i punti disegnati.

Per determinare la concentrazione di insulina per un campione incognito, localizzare la OD media dei duplicati dei campioni incogniti corrispondenti sull'asse verticale del grafico, trovare il punto di intersezione sulla curva e leggere la concentrazione (in $\mu\text{IU/mL}$) sull'asse orizzontale del grafico (è possibile ricavare la media dei duplicati del campione incognito come indicato).

9. VALORI DI RIFERIMENTO

I livelli di insulina sono consistentemente più alti in plasma che in siero; tuttavia è preferibile usare siero.

I range assegnati da Diametra sono in accordo con i lavori pubblicati in letteratura.

	$\mu\text{IU/mL}$
Bambini <12 yrs	<10
Adulti (Normali)	0.7 – 9.0
Diabetici (Tipo II)	0.7 – 25

È importante tenere presente che la determinazione di un range di valori attesi in un dato metodo per una popolazione "normale" è dipendente da molteplici fattori, quali la specificità e sensibilità del metodo in uso, e la popolazione in esame. Perciò ogni laboratorio dovrebbe considerare i range indicati dal Fabbricante come un'indicazione generale e produrre range di valori attesi propri basati sulla popolazione indigena dove il laboratorio risiede.

10. PARAMETRI CARATTERISTICI

10.1. Precisione

10.1.1. Intra-Assay

La variabilità all'interno dello stesso kit è stata determinata replicando (20x) tre differenti livelli di siero. La variabilità intra-assay è 5,0%.

10.1.2. Inter-Assay

La variabilità tra kit differenti è stata determinata replicando tre differenti livelli di siero con kit appartenenti a lotti diversi. La variabilità inter-assay è 10,0%.

10.2. Specificità

L'anticorpo impiegato presenta le seguenti reazioni crociate, valutata aggiungendo le sostanze interferenti. La cross-reattività è stata calcolata derivando il rapporto tra dose di sostanze interferenti su dose di insulina necessaria per ottenere la stessa assorbanza:

Insulina	100%
Proinsulina	N.D.
C-Peptide	N.D.

10.3. Accuratezza

La prova di recupero condotta su tre campioni arricchiti con 7 - 14 - 28 - 56 IU/mL di antigene ha dato un valore medio (\pm SD) di 101,02% \pm 5,57%.

La prova di diluizione condotta su tre campioni diluiti 2 - 4 - 8 volte ha dato un valore medio (\pm SD) di 96,94% \pm 5,41%.

10.4. Sensibilità

La concentrazione minima di insulina misurabile che può essere distinta dal Calibratore 0 è 0,25 $\mu\text{IU/mL}$.

10.5. Correlazione

Il kit Diametra Insulin ELISA è stato comparato con un metodo di riferimento. Sono stati testati 30 campioni di siero. I dati sono stati confrontati mediante analisi di regressione lineare. La curva di regressione è:

$$(\text{Insulin Diametra}) = 0,88 * (\text{metodo di rif.}) - 0,23$$
$$r^2 = 0,963$$

10.6. Hook Effect

Il kit Diametra Insulin ELISA non presenta effetto Hook fino a 25000 $\mu\text{IU/mL}$.

11. DISPOSIZIONI PER LO SMALTIMENTO

I reagenti devono essere smaltiti in accordo con le leggi locali.

BIBLIOGRAFIA

- Eastham R.D Biochemical Values in Clinical Medicine, 7th Ed. Bristol. England. Jonh Wright & Sons, Ltd (1985).
- Gerbitz, V.K.D., J. Clin. Chem. Biochem. 18, 313-326 (1980)
- Boehm TM, et al Diabetes Care 479-490. (1079)
- Wayne PA National Committee for Clinical Laboratory Standards. Procedure for the collection of diagnostic blood specimens by venipuncture: approved standards. 4th Ed. NCCLS (1988)
- Turkinton RW., et al Archive of Internal Med. 142
- Sacks BD Carbohydrates in Burtis, C.A. and Ashwood, AR (Eds) Tietz Textbook OF Clinical Chemistry. 2nd Ed. Philadelphia w. B. Saunders Co. 1994
- Kahn CR, et al. Diabetes Care 2 283 – 295 (1979)

Ed. 01/2015

DCM076-8

DiaMetra S.r.l. Headquarter: Via Calabria 15, 20090 SEGRATE (MI) Italy

Tel. +39-02-2139184

Fax +39-02-2133354

Manufactory: Via Pozzuolo 14, 06038 SPELLO (PG) Italy

Tel. +39-0742-24851

Fax +39-0742-316197

E-mail: info@diametra.com



DCM076-8
Ed. 01/2015

INSULIN ELISA

for routine analysis

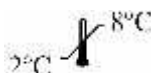
Direct immunoenzymatic determination of insulin level in human serum or plasma

IVD



LOT

See external label



$\Sigma = 96$ tests

REF DKO076

INTENDED USE

Insulin ELISA kit is a direct solid phase enzyme immunoassay for quantitative determination of insulin in human serum or plasma.

Insulin ELISA kit is intended for laboratory use only.

1. CLINICAL SIGNIFICANCE

Insulin is a polypeptide hormone that regulates carbohydrate metabolism. Apart from being the primary effector in carbohydrate homeostasis, it has effects on fat metabolism and it can change the liver's ability to release fat stores.

Insulin is involved in: control of cellular intake of glucose in muscle and adipose tissue, increase of DNA replication and protein synthesis, modification of the activity of numerous enzyme (allosteric effect), increased glycogen, fatty acid synthesis, aminoacid uptake, decreased proteinolysis, lipolysis, gluconeogenesis.

Beta cells release insulin in a glucose-dependent way.

In most humans blood glucose levels vary from about 70 mg/dL to perhaps 110 mg/dL (3.9 to 6.1 mmol/L) except shortly after eating when the blood glucose level rises temporarily. This homeostatic effect is the result of many factors, of which hormone regulation is the most important.

There are several conditions in which insulin disturbance is pathologic: diabetes mellitus, insulinoma, metabolic syndrome and polycystic ovary syndrome. There are two types of diabetes mellitus: type 1 (autoimmune-mediated destruction of insulin producing beta cells in the pancreas resulting in absolute insulin deficiency), and type 2 (multifactor syndrome with combined influence of genetic susceptibility and influence of environmental factors, the best known being obesity, age, and physical inactivity, resulting in insulin resistance in cells requiring insulin for glucose absorption. This form of diabetes is strongly inherited). In both cases the insulin production must be increased by medication or delivering insulin by intravenous method.

The quantitative determination of insulin can help to determinate the dose to delivery.

2. PRINCIPLE

Insulin ELISA test is based on simultaneous binding of human insulin by two monoclonal antibodies, one immobilized on microwell plates and the other conjugates with horseradish peroxidase (HRP).

After incubation, the bound/free separation is performed by a simple solid-phase washing.

Then the enzyme HRP in the bound-fraction reacts with the Substrate (H_2O_2) and the TMB Substrate and develops a blu color that changes into yellow when the Stop Solution (H_2SO_4) is added.

The colour intensity is proportional to the insulin concentration in the sample.

The insulin concentration in the sample is calculated based on a calibration curve.

3. REAGENT, MATERIAL AND INSTRUMENTATION

3.1. Reagent and material supplied in the kit

1. Calibrators (6 vials)

CAL0 (3 mL)	REF DCE002/7606-0
CAL1 (1 mL)	REF DCE002/7607-0
CAL2 (1 mL)	REF DCE002/7608-0
CAL3 (1 mL)	REF DCE002/7609-0
CAL4 (1 mL)	REF DCE002/7610-0
CAL5 (1 mL)	REF DCE002/7611-0

2. Control (1 vial, 1 mL)

Concentration of Control is indicated on the Certificate of analysis

REF DCE045/7603-0

3. Conjugate (1 vial, 13 mL)

Monoclonal antibody anti insulin conjugated with horseradish peroxidase (HRP)

REF DCE002/7602-0

4. Coated Microplate (1 microplate breakable)

Monoclonal antibody anti insulin adsorbed on microplate

REF DCE002/7603-0

5. TMB Substrate (1 vial, 15 mL)

H_2O_2 -TMB 0.26 g/L (avoid any skin contact)

REF DCE004-0

6. Stop Solution (1 vial, 15 mL)

Sulphuric acid 0.15 mol/L (avoid any skin contact)

REF DCE005-0

7. 50X Conc. Wash Solution (1 vial, 20 mL)

NaCl 45 g/L; Tween-20 55 g/L

REF DCE006-0

3.2. Reagents necessary not supplied

Distilled water.

3.3. Auxiliary materials and instrumentation

Automatic dispenser.

Microplates reader (450 nm, 620-630 nm).

Note

Store all reagents between 20-8°C in the dark.

Open the bag of reagent 4 (Coated Microplate) only when it is at room temperature and close it immediately after use; once opened it is stable at 2-8°C until the expiry date of the kit.

4. WARNINGS

- This kit is intended for in vitro use by professional persons only. Not for internal or external use in Humans or Animals.
- Use appropriate personal protective equipment while working with the reagents provided.
- Follow Good Laboratory Practice (GLP) for handling blood products.
- Material of animal origin used in the preparation of the kit has been obtained from animals certified as healthy and the bovine protein has been obtained from countries not infected by BSE, but these materials should be handled as potentially infectious.
- Some reagents contain small amounts of Proclin 300^R as preservative. Avoid the contact with skin or mucosa.
- The TMB Substrate contains an irritant, which may be harmful if inhaled, ingested or absorbed through the skin. To prevent injury, avoid inhalation, ingestion or contact with skin and eyes.
- The Stop Solution consists of a diluted sulphuric acid solution. Sulphuric acid is poisonous and corrosive and can be toxic if ingested. To prevent chemical burns, avoid contact with skin and eyes.
- Avoid the exposure of reagent TMB/H₂O₂ to directed sunlight, metals or oxidants.
- *This method allows the quantitative determination of insulin from 3 to 200 µIU/mL.*

5. PRECAUTIONS

- Please adhere strictly to the sequence of pipetting steps provided in this protocol. The performance data represented here were obtained using specific reagents listed in this Instruction For Use.
- All reagents should be stored refrigerated at 2-8°C in their original container. Any exceptions are clearly indicated. The reagents are stable until the expiry date when stored and handled as indicated.
- Allow all kit components and specimens to reach room temperature (22-28°C) and mix well prior to use.
- Do not interchange kit components from different lots. The expiry date printed on box and vials labels must be observed. Do not use any kit component beyond their expiry date.
- If you use automated equipment is your responsibility to make sure that the kit has been appropriately tested.

- The incomplete or inaccurate liquid removal from the wells could influence the assay precision and/or increase the background. To improve the performance of the kit on automatic systems is recommended to increase the number of washes.
- It is important that the time of reaction in each well is held constant for reproducible results. Pipetting of samples should not extend beyond ten minutes to avoid assay drift. If more than 10 minutes are needed, follow the same order of dispensation. If more than one plate is used, it is recommended to repeat the dose response curve in each plate
- Addition of the TMB Substrate solution initiates a kinetic reaction, which is terminated by the addition of the Stop Solution. Therefore, the TMB Substrate and the Stop Solution should be added in the same sequence to eliminate any time deviation during the reaction.
- Observe the guidelines for performing quality control in medical laboratories by assaying controls and/or pooled sera.
- Maximum precision is required for reconstitution and dispensation of the reagents.
- Samples microbiologically contaminated, highly lipemic or haemolysed should not be used in the assay.
- Plate readers measure vertically. Do not touch the bottom of the wells.

6. PROCEDURE

6.1. Preparation of the Calibrators (C₀...C₅)

The Calibrators are ready to use and have the following concentrations:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅
µIU/mL	0	3	10	30	80	200

Once opened, the Calibrators are stable 6 months at 2÷8°C.

6.2. Preparation of Wash Solution

Dilute the contents of each vial of the "50X Conc. Wash Solution" with distilled water to a final volume of 1000 ml prior to use. For smaller volumes respect the 1:50 dilution ratio. The diluted wash solution is stable for 30 days at 2÷8°C.

6.3. Preparation of the Sample

Follow Good laboratory procedures for handling blood products.

For accurate comparison to establish normal values, a fasting morning serum sample should be obtained. To obtain the serum, the blood should be collected in a venipuncture tube without additives or anti-coagulants; allow the blood to clot; centrifuge the specimen to separate the serum from the cells.

Samples may be refrigerated at 2÷8°C for a maximum period of 5 days. If the specimens cannot be assayed within this time, they may be stored at -20°C for up to 30 days. Avoid repetitive freezing and thawing.

Patient specimens with insulin concentrations above 200 µIU/mL may be diluted (for example 1:10 or higher) with Calibrator zero and re-assayed. The

sample's concentration is obtained by multiplying the result by the dilution factor.
The Control is ready for use.

6.4. Procedure

- **Allow all reagents to reach room temperature (22-28°C) for at least 30 minutes.** At the end of the assay, store immediately the reagents at 2-8°C: avoid long exposure to room temperature.
- Unused coated microwell strips should be released securely in the foil pouch containing desiccant and stored at 2-8°C.
- To avoid potential microbial and/or chemical contamination, unused reagents should never be transferred into the original vials.
- As it is necessary to perform the determination in duplicate in order to improve accuracy of the test results, prepare two wells for each point of the calibration curve (C₀-C₅), two for each Control, two for each sample, one for Blank.

Reagent	Calibrator	Sample/ Control	Blank
Calibrator C ₀ -C ₅	100 µL		
Sample/ Control		100 µL	
Conjugate	100 µL	100 µL	
Incubate 2 h at room temperature (22-28°C). Remove the contents from each well. Wash the wells 3 times with 300 µL of diluted Wash Solution. Important note: during each washing step, gently shake the plate for 5 seconds and remove excess solution by tapping the inverted plate on an absorbent paper towel. Automatic washer: if you use automated equipment, wash the wells at least 5 times.			
TMB Substrate	100 µL	100 µL	100 µL
Incubate 15 minutes in the dark at room temperature (22-28°C).			
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL
Shake the microplate gently. Read the absorbance (E) at 450 nm against a reference wavelength of 620-630 nm or against Blank within 5 minutes.			

7. QUALITY CONTROL

Each laboratory should assay controls at levels in the low, medium and high ranges of the dose response curve for monitoring assay performance. These controls should be treated as unknowns and values determined in every test procedure performed. Quality control charts should be maintained to follow the performance of the supplied reagents. Pertinent statistical methods should be employed to ascertain

trends. Significant deviation from established performance can indicate unnoticed change in experimental conditions or degradation of kit reagents. Fresh reagents should be used to determine the reason for the variations.

8. RESULTS

8.1. Note

The optical densities (O.D.s) of some calibrators and samples may be higher than 3.0, in such a case, they could be out of the measurement range of the microplate reader. It is therefore necessary, for O.D.s higher than 3.0, to perform a reading at 405 nm in addition to 450 nm and 620 nm (reference filter for the subtraction of interferences due to the plastic).

For microplate readers unable to read the plate at 3 wavelengths at the same time,

It is advisable to proceed as follows:

- Read the microplate at 450 nm and at 620 nm.
- Read again the plate at 405 nm and 620 nm.
- Find out the wells whose ODs at 450 nm are higher than 2.0
- Select the corresponding ODs read at 405 nm and multiply these values at 405 nm by the conversion factor 3.0 (where OD 450/OD 405 = 3.0), that is:
 $OD\ 450\ nm = OD\ 405\ nm \times 3.0$.

Warning: The conversion factor 3.0 is suggested only. For better accuracy, the user is advised to calculate the conversion factor specific for his own reader.

8.2. Mean Absorbance

Calculate the mean of the absorbance (Em) for each point of the calibration curve (C₀-C₅) and of each sample.

8.3. Calibration curve – Automatic method

Use the smoothed cubic spline– preferred – or 4 parameters logistic function as calculation algorithm.

8.4. Calibration curve – Manual method

A dose response curve is used to ascertain the concentration of insulin in unknown specimens.

Record the OD obtained from the printout of the microplate reader. Plot the average OD for each duplicate calibrator versus the corresponding insulin concentration in µIU/mL on linear graph paper.

Draw the best-fit curve through the plotted points.

To determine the concentration of insulin for an unknown, locate the average absorbance of the duplicates for each unknown on the vertical axis of the graph, find the intersecting point on the curve, and read the concentration (in µIU/mL) from the horizontal axis of the graph (the duplicates of the unknown may be averaged as indicated).

9. REFERENCE VALUES

Insulin values are consistently higher in plasma than in serum; thus, serum is preferred.

The following ranges have been assigned by Diametra in concordance with the published literature.

	$\mu\text{IU/mL}$
Children <12 yrs	<10
Adult (Normal)	0.7 – 9.0
Diabetic (Type II)	0.7 – 25

Please pay attention to the fact that the determination of a range of expected values for a "normal" population in a given method is dependent on many factors, such as specificity and sensitivity of the method used and type of population under investigation. Therefore each laboratory should consider the range given by the Manufacturer as a general indication and produce their own range of expected values based on the indigenous population where the laboratory works.

10. PERFORMANCE AND CHARACTERISTICS

10.1. Precision

10.1.1. Intra Assay Variation

Within run variation was determined by replicate (20x) determination of three different levels of serum in one assay. The within assay variability is 5.0%.

10.1.2. Inter Assay Variation

Between run variation was determined by replicate measurements of three different level of serum in different lots. The between assay variability is 10.0%.

10.2. Specificity

The cross reaction of the antibody calculated by deriving a ratio between dose of interfering substance to dose of insulin needed to produce the same absorbance:

Insulin	100%
Proinsulin	N.D.
C-Peptide	N.D.

10.3. Accuracy

The recovery on three serum samples spiked with 7 - 14 - 28 - 56 U/mL of antigen gave an average value (\pm SD) of 101.02% \pm 5.57%.

The dilution test performed on three sera diluted 2 - 4 - 8 times gave an average value (\pm SD) of 96.94% \pm 5.41%.

10.4. Sensitivity

The lowest detectable concentration of insulin that can be distinguished from the Calibrator 0 is 0,25 $\mu\text{IU/mL}$.

10.5. Correlation

Diametra Insulin ELISA kit was compared to a reference method Insulin assay. 30 serum samples were compared by linear regression analysis.

The linear regression curve was calculated:
(Insulin Diametra) = 0.88*(Ref. method) - 0.23
 $r^2 = 0.963$

10.6. Hook Effect

Diametra Insulin ELISA assay shows no Hook effect until 25000 $\mu\text{IU/mL}$.

11. WASTE MANAGEMENT

Reagents must be disposed off in accordance with local regulations.

BIBLIOGRAPHY

- Eastham R.D Biochemical Values in Clinical Medicine, 7th Ed. Bristol. England. Jonh Wright & Sons, Ltd (1985).
- Gerbitz, V.K.D., J. Clin. Chem. Biochem. 18, 313-326 (1980)
- Boehm TM, et al Diabetes Care 479-490. (1079)
- Wayne PA National Committee for Clinical Laboratory Standards. Procedure for the collection of diagnostic blood specimens by venipuncture: approved standards. 4th Ed. NCCLS (1988)
- Turkinton RW., et al Archive of Internal Med. 142
- Sacks BD Carbohydrates in Burtis, C.A. and Ashwood, AR (Eds) Tietz Textbook OF Clinical Chemistry, 2nd Ed. Philadelphia w. B. Saunders Co. 1994
- Kahn CR, et al. Diabetes Care 2 283 – 295 (1979)

Ed. 01/2015

DCM076-8

DiaMetra S.r.l. Headquater: Via Calabria 15,
20090 SEGRATE (MI) Italy
Tel. +39-02-2139184
Fax +39-02-2133354

Manufactory: Via Pozzuolo 14,
06038 SPELLO (PG) Italy
Tel. +39-0742-24851
Fax +39-0742-316197
E-mail: info@diametra.com



DCM076-8
Ed. 01/2015

INSULIN ELISA

para análisis de rutina

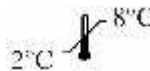
Determinación inmunoenzimática directa de la insulina en suero o plasma humano

IVD



LOT

Ver etiqueta externa



$\Sigma = 96$ ensayos

REF DKO076

USO PREVISTO

El kit Insulin ELISA es un ensayo inmunoenzimático directo en fase sólida para la determinación cuantitativa de insulina en suero o plasma humano.

El kit Insulin ELISA está destinado al uso en laboratorio exclusivamente.

1 IMPORTANCIA CLÍNICA

La insulina es una hormona polipeptídica que regula el metabolismo de los carbohidratos. Además de tener como papel principal la homeostasis de los carbohidratos, tiene efectos sobre el metabolismo de los lípidos y regula la liberación de los depósitos lipídicos del hígado.

La insulina interviene en la absorción de la glucosa en el músculo y el tejido adiposo, en el aumento de la duplicación del ADN y en la síntesis proteica, modifica la actividad de numerosas enzimas (efecto alostérico), favorece la síntesis del glucógeno, de los ácidos grasos, la absorción de los aminoácidos, inhibe la proteólisis, la lipólisis y la gluconeogénesis. Las células beta liberan insulina en manera dependiente del glucosio. El nivel de glucosio en sangre varía entre 70 mg/dL y 110 mg/dL aproximadamente (3,9 a 6,1 mmol/L), excepto inmediatamente después de una comida en que aumenta temporáneamente. Este efecto homeostático es el resultado de muchos factores, de los cuales el más importante es la regulación de la hormona. Existen algunas patologías en que está implicada la insulina: diabetes mellitus, insulinoma, síndrome metabólico y síndrome de ovarios poliquísticos. Hay dos tipos de diabetes mellitus: el tipo 1 (degradación autoinmunitaria de insulina producida por las células beta del páncreas con consiguiente falta total de insulina), y el tipo 2 (síndrome multifactorial debido a una predisposición genética y a la influencia de factores ambientales, por ejemplo obesidad, edad e inactividad física, con consiguiente resistencia a la insulina por parte de las células que requieren insulina para la absorción del glucosio). Esta forma de diabetes tiene un elemento fuertemente hereditario. En ambos casos, la producción de insulina debe ser sostenida administrando insulina por vía endovenosa.

La determinación cuantitativa de los niveles de insulina en sangre puede ser de ayuda a la hora de decidir la dosis más adecuada.

2 PRINCIPIO DEL MÉTODO

El ensayo Insulina ELISA se basa en la captura simultánea de la insulina humana por parte de dos anticuerpos monoclonales, uno inmovilizado en la microplaca, el otro conjugado con peroxidasa (HRP). Después de incubar durante un período establecido, se separan los elementos ligados de los no ligados mediante lavado de la fase sólida.

Por lo último, la enzima HRP presente en la fracción ligada cataliza la reacción entre el sustrato (H_2O_2) y el sustrato TMB, dando lugar a un color azul que se convierte en amarillo al añadir la solución de parada (H_2SO_4).

La intensidad del color desarrollado es proporcional a la concentración de insulina de la muestra.

La concentración de insulina en la muestra se calcula según una serie de Calibradores.

3. REACTIVOS, MATERIALES E INSTRUMENTOS

3.1 Reactivos y materiales incluidos en el kit

1. Calibradores (6 frascos)

CAL0 (3 mL)	REF DCE002/7606-0
CAL1 (1 mL)	REF DCE002/7607-0
CAL2 (1 mL)	REF DCE002/7608-0
CAL3 (1 mL)	REF DCE002/7609-0
CAL4 (1 mL)	REF DCE002/7610-0
CAL5 (1 mL)	REF DCE002/7611-0

2. Control (1 frasco, 1 mL)

La concentración del Control se indica en el certificado de calidad (Certificate of Analysis)

REF DCE045/7603-0

3. Conjugado (1 frasco, 13 mL)

Anticuerpo monoclonal anti insulina conjugado con peroxidasa de rábano (HRP)

REF DCE002/7602-0

4. Microplaca recubierta (1 microplaca divisible)

Anticuerpo monoclonal anti insulina absorbido en la microplaca

REF DCE002/7603-0

5. Sustrato TMB (1 frasco, 15 mL)

H_2O_2 -TMB (0,26 g/L) (evítese el contacto con la piel)

REF DCE004-0

6. Solución de parada (1 frasco, 15 mL)

Ácido sulfúrico 0,15 mol/L (evítese el contacto con la piel)

REF DCE005-0

7. Solución de lavado conc. 50X (1 frasco, 20 mL)

NaCl 45 g/L; Tween-20 55 g/L

REF DCE006-0

3.2 Reactivos necesarios no incluidos en el kit

Agua destilada

3.3 Material e instrumental auxiliar

Dispensadores automáticos

Lector de microplacas (450 nm, 620-630 nm).

Notas

Conservar los reactivos a oscuras, a temperatura entre 2 y 8 °C.

Atemperar a temperatura ambiente la bolsa del reactivo 4 (microplaca recubierta) antes de abrirla; cerrarla de inmediato después de sacar las tiras que se han de utilizar; una vez abierta, permanece estable hasta la fecha de caducidad del kit.

4. ADVERTENCIAS

- Este kit de ensayo está previsto para usarse in vitro y por personal experto. No es para uso interno o externo en humanos o animales.
- Usar los equipos de protección individual previstos al trabajar con los reactivos suministrados.
- Siga las Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP) en el manejo de las muestras sanguíneas y sus derivados.
- Materiales de origen animal utilizados para la elaboración de este kit se obtuvieron a partir de animales sanos y las proteínas de bovino se obtuvieron de los países no afectados por la EEB, aun así estos materiales se deben manejar como potencialmente infecciosos.
- Algunos reactivos contienen pequeñas cantidades de Proclin 300^R como conservante. Evite el contacto con la piel y las mucosas.
- El cromógeno TMB contiene un irritante que puede ser dañino si se inhala, se ingiere o se absorbe a través de la piel. Para prevenir lesiones, evitar la inhalación, la ingestión o el contacto con la piel y con los ojos.
- La solución de parada está formada por una solución de ácido sulfúrico diluido. El ácido sulfúrico es venenoso y corrosivo, y puede ser tóxico si se ingiere. Para prevenir posibles quemaduras químicas, evitar el contacto con la piel y con los ojos.
- Evite la exposición de los reactivos TMB/H₂O₂ a la luz solar directa, metales u oxidantes. No congelar la solución.
- Con este método pueden determinarse cuantitativamente valores de insulina desde 3 hasta 200 µIU/mL.

5. PRECAUCIONES

- Respetar rigurosamente la secuencia de los pasos indicados en este protocolo. Los resultados aquí presentados se han obtenido utilizando los reactivos específicos que figuran en estas instrucciones de uso.
- Todos los reactivos deben conservarse a una temperatura controlada de 2-8 °C en sus recipientes originales. Todas las excepciones están claramente marcados. Los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad cuando se almacenan y manipulan de acuerdo con las instrucciones proporcionadas.

- Antes del uso, esperar hasta que todos los componentes del kit y las muestras se encuentren a temperatura ambiente (22-28°C) y mezclar cuidadosamente.
- No mezclar componentes de kits de lotes distintos. Se debe observar la fecha de caducidad indicada en la etiqueta de la caja y de todas las ampollas. No usar componentes después de la fecha de caducidad.
- Si utiliza un equipo automático, es responsabilidad del usuario asegurar que la metodología aplicada ha sido debidamente validada.
- Un lavado incompleto o impreciso y la aspiración insuficiente del líquido de los micropozos ELISA pueden causar una precisión pobre y/o un elevado fondo. Para mejorar el rendimiento del kit en los sistemas automatizados, se recomienda aumentar el número de lavados.
- Para la reproducibilidad de los resultados, es importante que el tiempo de reacción sea igual para cada pocillo. El tiempo de dispensación de los pocillos no debe superar los 10 minutos; si se prolongara más allá de los 10 minutos, respétese el orden de dispensación. Si utiliza más de una placa, se recomienda repetir la curva de calibración en cada placa.
- Al añadir el sustrato TMB inicia una reacción cinética que termina al agregar la solución de parada. Tanto el sustrato como la solución de parada deben agregarse en la misma secuencia para evitar diferentes tiempos de reacción.
- Observar las directrices para la ejecución del control de calidad en los laboratorios clínicos al comprobar controles y/o pool de sueros.
- Observar la máxima precisión en la reconstitución y dispensación de los reactivos.
- No use muestras con contaminación microbiana, altamente lipémicas o hemolizadas.
- Los lectores de microplacas leen las DO verticalmente, por tanto no debe tocarse el fondo de los pocillos.

6. PROCEDIMIENTO

6.1 Preparación de los Calibradores (C₀...C₅)

Los Calibradores son listo para usar y tienen las siguientes concentraciones:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅
µIU/mL	0	3	10	30	80	200

Una vez abiertos, los Calibradores permanecen estables por lo menos 6 meses conservados a 2-8°C.

6.2 Preparación de la solución de lavado.

Diluir el contenido de la botella de "Solución de lavado conc. 50X" con agua destilada o desionizada hasta obtener un volumen final de 1000 mL. Para preparar volúmenes menores, respetar la relación de dilución de 1:50. La solución de lavado diluida se mantiene estable a 2÷8°C durante al menos 30 días.

6.3 Preparación de la muestra

Respétese las buenas normas de laboratorio al manipular productos a base de sangre.

Las muestras de suero deberían tomarse por la mañana, en ayunas, para una comparación exacta que lleve a determinar los valores normales.

Para obtener el suero, recoja la sangre en tubos vacutainer sin aditivos ni anticoagulantes. Permitir que la sangre se coagule. Centrifugue la muestra para separa el suero de las células.

Conserve las muestras en refrigerador a temperatura entre 2 y 8 °C por no más de 5 días; de lo contrario, se conservan hasta 30 días a -20°C. Evite descongelar y congelar repetidamente las muestras.

Las muestras de pacientes con concentraciones de insulina superiores a 200 µIU/mL pueden diluirse (dilución 1:10 o superior) con el Calibrador 0 y analizadas nuevamente. La concentración de las muestras se obtiene multiplicando el resultado por el factor de dilución.

El control está listo para su uso.

6.4 Procedimiento

- **Esperar hasta que todos los reactivos se encuentren a temperatura ambiente (22-28°C) durante al menos 30 minutos.** Al final del ensayo inmediatamente poner todos los reactivos a 2-8°C para evitar largos periodos a temperatura ambiente.
- Las tiras de pocillos no utilizados se deben guardar de inmediato en la bolsa desechable que contiene desecantes y almacenarse a 2-8°C.
- Para evitar la contaminación microbiana y/o química no regrese porciones de reactivos no usados en los viales originales.
- Para aumentar la precisión de los resultados de la prueba es necesario trabajar en duplicado: preparar dos pocillos para cada punto de la curva de calibración (C₀-C₅), dos para cada control, dos para cada muestra, uno para el blanco.

Reactivo	Calibrador	Muestra/ Control	Blanco
Calibrador C ₀ -C ₅	100 µL		
Muestra/ Control		100 µL	
Conjugado	100 µL	100 µL	

Incubar 2 h a temperatura ambiente (22±28°C). Retirar la mezcla de reacción. Lave los pozos 3 veces con 0,3 mL de solución de lavado diluida.

Nota importante: agite suavemente la placa durante 5 segundos en cada paso del lavado. Después del último lavado asegúrese haber eliminado completamente la solución de lavado de los pozos, invierta la placa y golpéela repetidas veces contra una servilleta de papel absorbente.

Lavados automático: si está utilizando una lavadora automática, lavar los pocillos al menos 5 veces.

TMB Substrato	100 µL	100 µL	100 µL
Incubar 15 minutos a temperatura ambiente (22±28°C), protegida de la luz.			
Solución de parada	100 µL	100 µL	100 µL
Agitar suavemente la placa. Leer la absorbancia (E) a 450 nm frente una segunda lectura de referencia a 620-630 nm o frente al blanco dentro de los 5 minutos.			

7 CONTROL DE CALIDAD

Cada laboratorio analizará los controles a valores bajos, medios y altos de la curva de calibración para controlar el comportamiento del kit. Estos controles se tratarán como desconocidos y los valores se determinarán en cada análisis efectuado. Se prepararán tablas de control de calidad para controlar el comportamiento de los reactivos. Se usarán métodos estadísticos adecuados para verificar las tendencias. Desviaciones importantes de las prestaciones establecidas podrían indicar un cambio no advertido en las condiciones experimentales o la caducidad de los reactivos del kit. Se han de utilizar reactivos nuevos para determinar la causa de las variaciones.

8 RESULTADOS

8.1 Notas

La densidad óptica (DO) de algunos calibradores y muestras podría ser superior a 3,0; en este caso, podrían estar fuera de los límites de medición del lector de microplacas. Por tanto, para DO superiores a 3,0, es necesario efectuar una lectura a 405 nm además de 450 nm y 620nm (filtro de referencia para la eliminación de interferencias debidas al plástico). Para los lectores que no tengan capacidad de leer la placa en tres longitudes diferentes de onda al mismo tiempo, se aconseja proceder del siguiente modo:

- Leer la microplaca a 450 nm y a 620 nm.
- Leer nuevamente la placa a 405 nm y a 620 nm.
- Identificar los pocillos en que la DO a 450 nm es superior a 2,0.
- Seleccionar las correspondientes DO leídas a 405 nm y multiplicar estos valores a 405 por el factor de conversión 3,0 (donde DO 450/DO 405 = 3,0), que es: $DO_{450\text{ nm}} = DO_{405\text{ nm}} \times 3,0$.

Atención: el factor de conversión 3,0 es meramente indicativo. Para mayor precisión, se invita al usuario a calcular su propio factor de conversión específico para el lector que utiliza.

8.2 Extinción media

Calcular la extinción media (Em) de cada punto de la curva de calibración(C₀-C₅) y de cada muestra.

8.3 Curva estándar. Método automático

Como algoritmo de cálculo, se aconseja utilizar la función de splines cúbicos suavizados, o bien la logística de 4 parámetros.

8.4 Curva estándar. Método manual

Se utiliza una curva de calibración para determinar la concentración de insulina en muestras desconocidas. Registrar las DO obtenidas del listado del lector de microplaca.

Trazar en papel milimetrado el gráfico de las DO medias de cada Calibrador duplicado frente a sus concentraciones de insulina expresadas en $\mu\text{IU/mL}$. Unir los puntos con la curva más adecuada.

Para determinar la concentración de insulina de una muestra desconocida, identificar la DO promediada de los duplicados de las muestras desconocidas correspondientes en el eje vertical del gráfico, encontrar el punto de intersección en la curva y leer la concentración (expresada en $\mu\text{IU/mL}$) en el eje horizontal del gráfico (se puede obtener el promedio de los duplicados de la muestra desconocida como indicado).

9 VALORES DE REFERENCIA

Los valores de insulina son notablemente más altos en el plasma que en el suero; por tanto, para el análisis es preferible utilizar suero.

Los límites se establecieron sobre la base de datos clínicos recogidos por el fabricante de conformidad con las publicaciones de la literatura específica.

Niños <12 años	<10 $\mu\text{IU/mL}$
Adultos (sanos)	0,7 – 9,0 $\mu\text{IU/mL}$
Diabéticos (tipo II)	0,7 – 25 $\mu\text{IU/mL}$

Es importante señalar que la determinación de un rango de valores esperados en un método dado para una población "normal" depende de muchos factores, tales como la especificidad y sensibilidad del método en uso, y la población en estudio. Por lo tanto, cada laboratorio debe considerar el intervalo especificado por el fabricante como una guía general y producir su propio rango de valores calculados en base al estadístico obtenido por el laboratorio, donde reside la población local.

10 CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

10.1 Precisión

10.1.1 Intra ensayo

La variabilidad dentro del mismo kit se determinó repitiendo (20x) tres niveles diferentes de sueros de control. La variabilidad dentro del ensayo es 5.0%.

10.1.2 Entre ensayos

La variabilidad entre kits diferentes se determinó repitiendo tres niveles diferentes de suero de control con dos kit de lotes diferentes. La variabilidad entre ensayos es 10.0%.

10.2 Especificidad

El anticuerpo utilizado presenta las reacciones cruzadas que se indican a continuación, evaluadas añadiendo las sustancias interferentes. La reactividad cruzada se calculó derivando la relación entre dosis de sustancias interferentes y dosis de insulina necesaria para obtener la misma absorbancia.

Insulina	100%
Proinsulina	N.D.
Péptido C	N.D.

10.3 Exactitud

La prueba de recuperación realizada en muestras enriquecidas con 7 - 14 - 28 - 56 $\mu\text{IU/mL}$ de antígeno ha dado un valor medio ($\pm\text{SE}$) de 101,02% \pm 5,57%.

La prueba de dilución a cabo en tres muestras diluidas 2 - 4 - 8 veces dio una media (\pm DE) de 96,94% \pm 5,41%.

10.4 Sensibilidad

La concentración mínima de insulina detectable que se puede distinguir de Calibrador 0 es de 1.03 $\mu\text{IU/mL}$ con un límite de confianza del 95%.

10.5 Correlación

El kit Insulin ELISA (Diametra) se comparó con un kit de referencia. Se analizaron 30 muestras de suero.

La curva de regresión es:

$$Y = 0,88 * X - 0,23$$

$$r^2 = 0,963$$

10.6 Efecto "Hook"

Este método no afecta "Hook" se observó hasta 25000 $\mu\text{IU/mL}$.

11. INDICACIONES PARA LA ELIMINACIÓN

Eliminar los reactivos conforme con la normativa local sobre la materia.

BIBLIOGRAFÍA

- Eastham R.D Biochemical Values in Clinical Medicine, 7th Ed. Bristol. England. Jonh Wright & Sons, Ltd (1985).
- Gerbitz, V.K.D., J. Clin. Chem. Biochem. 18, 313-326 (1980)
- Boehm TM, et al Diabetes Care 479-490. (1079)
- Wayne PA National Committee for Clinical Laboratory Standards. Procedure for the collection of diagnostic blood specimens by venipuncture: approved standards. 4th Ed. NCCLS (1988)
- Turkinton RW., et al Archive of Internal Med. 142
- Sacks BD Carbohydrates in Burtis, C.A. and Ashwood, AR (Eds) Tietz Textbook OF Clinical Chemistry. 2nd Ed. Philadelphia w. B. Saunders Co. 1994
- Kahn CR, et al. Diabetes Care 2 283 – 295 (1979)

Ed. 01/2015

DCM076-8

DiaMetra S.r.l. Headquater: Via Calabria 15,
20090 SEGRATE (MI) Italy

Tel. +39-02-2139184

Fax +39-02-2133354

Manufactory: Via Pozzuolo 14,
06038 SPELLO (PG) Italy

Tel. +39-0742-24851

Fax +39-0742-316197

E-mail: info@diametra.com

	DE ES FR GB IT PT	In vitro Diagnostikum Producto sanitario para diagnóstico In vitro Dispositif medical de diagnostic in vitro In vitro Diagnostic Medical Device Dispositivo medico-diagnostico in vitro Dispositivos medicos de diagnostico in vitro		DE ES FR GB IT PT	Hergestellt von Elaborado por Fabriqué par Manufacturer Produttore Produzido por
	DE ES FR GB IT PT	Achtung, Begleitdokumente Precaución, consulte los documentos adjuntos Attention, veuillez consulter les documents d'accompagnement Caution, consult accompanying documents Attenzione, consultare la documentazione allegata Atenção, consultar os documentos de acompanhamento	 yyyy-mm	DE ES FR GB IT PT	Herstellungs datum Fecha de fabricacion Date de fabrication Date of manufacture Data di produzione Data de produção
 yyyy-mm-dd	DE ES FR GB IT PT	Verwendbar bis Estable hasta (usar antes de último día del mes) Utiliser avant (dernier jour du mois indiqué) Use by (last day of the month) Utilizzare prima del (ultimo giorno del mese) Utilizar (antes ultimo dia do mês)		DE ES FR GB IT PT	Biogefährdung Riesco biológico Risque biologique Biological risk Rischio biologico Risco biológico
	DE ES FR GB IT PT	Gebrauchsanweisung beachten Consultar las instrucciones Consulter le mode d'emploi Consult instructions for use Consultare le istruzioni per l'uso Consultar instruções para uso	LOT	DE ES FR GB IT PT	Chargenbezeichnung Codigo de lote Numero de lot Batch code Codice del lotto Codigo do lote
 $\Sigma = xx$	DE ES FR GB IT PT	Ausreichend für "n" Tests Contenido suficiente para "n" tests Contenu suffisant pour "n" tests Contains sufficient for "n" tests Contenuto sufficiente per "n" saggi Contém o suficiente para "n" testes	CONT	DE ES FR GB IT PT	Inhalt Contenido del estuche Contenu du coffret Contents of kit Contenuto del kit Conteúdo do kit
 Max Min	DE ES FR GB IT PT	Temperaturbereich Límitación de temperatura Limites de température de conservation Temperature limitation Limiti di temperatura Temperaturas limites de conservação	REF	DE ES FR GB IT PT	Bestellnummer Número de catálogo Références du catalogue Catalogue number Numero di Catalogo Número do catálogo
	DE ES FR GB IT PT	Vor direkter Sonneneinstrahlung schützen Mantener alejado de la luz solar Tenir à l'écart de la lumière du soleil Keep away from sunlight Tenere lontano dalla luce solare Mantenha longe da luz solar			

SUGGERIMENTI PER LA RISOLUZIONE DEI PROBLEMI/TROUBLESHOOTING**ERRORE CAUSE POSSIBILI/ SUGGERIMENTI****Nessuna reazione colorimetrica del saggio**

- mancata dispensazione del coniugato
- contaminazione del coniugato e/o del Substrato
- errori nell'esecuzione del saggio (es. Dispensazione accidentale dei reagenti in sequenza errata o provenienti da flaconi sbagliati, etc.)

Reazione troppo blanda (OD troppo basse)

- coniugato non idoneo (es. non proveniente dal kit originale)
- tempo di incubazione troppo breve, temperatura di incubazione troppa bassa

Reazione troppo intensa (OD troppo alte)

- coniugato non idoneo (es. non proveniente dal kit originale)
- tempo di incubazione troppo lungo, temperatura di incubazione troppa alta
- qualità scadente dell'acqua usata per la soluzione di lavaggio (basso grado di deionizzazione,)
- lavaggi insufficienti (coniugato non completamente rimosso)

Valori inspiegabilmente fuori scala

- contaminazione di pipette, puntali o contenitori- lavaggi insufficienti (coniugato non completamente rimosso)

CV% intrasaggio elevato

- reagenti e/o strip non portate a temperatura ambiente prima dell'uso
- il lavatore per micropiastre non lava correttamente (suggerimento: pulire la testa del lavatore)

CV% intersaggio elevato

- condizioni di incubazione non costanti (tempo o temperatura)
- controlli e campioni non dispensati allo stesso tempo (con gli stessi intervalli) (controllare la sequenza di dispensazione)
- variabilità intrinseca degli operatori

ERROR POSSIBLE CAUSES / SUGGESTIONS**No colorimetric reaction**

- no conjugate pipetted reaction after addition
- contamination of conjugates and/or of substrate
- errors in performing the assay procedure (e.g. accidental pipetting of reagents in a wrong sequence or from the wrong vial, etc.)

Too low reaction (too low ODs)

- incorrect conjugate (e.g. not from original kit)
- incubation time too short, incubation temperature too low

Too high reaction (too high ODs)

- incorrect conjugate (e.g. not from original kit)
- incubation time too long, incubation temperature too high
- water quality for wash buffer insufficient (low grade of deionization)
- insufficient washing (conjugates not properly removed)

Unexplainable outliers

- contamination of pipettes, tips or containers
- insufficient washing (conjugates not properly removed) too high within-run
- reagents and/or strips not pre-warmed to CV% Room Temperature prior to use
- plate washer is not washing correctly (suggestion: clean washer head)
- too high between-run - incubation conditions not constant (time, CV % temperature)
- controls and samples not dispensed at the same time (with the same intervals) (check pipetting order)
- person-related variation

ERROR / POSIBLES CAUSAS / SUGERENCIAS**No se produce ninguna reacción colorimétrica del ensayo**

- no se ha dispensado el conjugado
- contaminación del conjugado y/o del sustrato
- errores en la ejecución del ensayo (p. ej., dispensación accidental de los reactivos en orden incorrecto o procedentes de frascos equivocados, etc.)

Reacción escasa (DO demasiado bajas)

- conjugado no idóneo (p. ej., no procedente del kit original)
- tiempo de incubación demasiado corto, temperatura de incubación demasiado baja

Reacción demasiado intensa (DO demasiado altas)

- conjugado no idóneo (p. ej., no procedente del kit original)
- tiempo de incubación demasiado largo, temperatura de incubación demasiado alta
- calidad escasa del agua usada para la solución de lavado (bajo grado de desionización)
- lavados insuficientes (el conjugado no se ha retirado completamente)

Valores inexplicablemente fuera de escala

- contaminación de pipetas, puntas o contenedores- lavados insuficientes (el conjugado no se ha retirado completamente)

CV% intraensayo elevado

- los reactivos y/o tiras no se encontraban a temperatura ambiente antes del uso
- el lavador de microplacas no funciona correctamente (sugerencia: limpiar el cabezal del lavador)

CV% interensayo elevado

- condiciones de incubación no constantes (tiempo o temperatura)
- controles y muestras no dispensados al mismo tiempo (con los mismos intervalos) (controlar la secuencia de dispensación)
- variación en función de los operadores

ERREUR CAUSES POSSIBLES / SUGGESTIONS**Aucune réaction colorimétrique de l'essai**

- non distribution du conjugué
- contamination du conjugué et/ou du substrat
- erreurs dans l'exécution du dosage (par ex., distribution accidentelle des réactifs dans le mauvais ordre ou en provenance des mauvais flacons, etc.)

Réaction trop faible (DO trop basse)

- conjugué non approprié (par ex., ne provenant pas du coffret original)
- temps d'incubation trop court, température d'incubation trop basse

Réaction trop intense (DO trop élevée)

- conjugué non approprié (par ex., ne provenant pas du coffret original)
- temps d'incubation trop long, température d'incubation trop élevée
- mauvaise qualité de l'eau utilisée pour la solution de lavage (bas degré de déionisation)
- lavages insuffisants (conjugué non entièrement éliminé)

Valeurs inexplicablement hors plage

- contamination des pipettes, embouts ou récipients - lavages insuffisants (conjugué non entièrement éliminé)

CV% intra-essai élevé

- les réactifs et/ou les bandes n'ont pas atteint la température ambiante avant usage
- le laveur de microplaques ne lave pas correctement (suggestion : nettoyer la tête du laveur)

CV% inter-essai élevé

- conditions d'incubation non constantes (temps ou température)
- contrôles et échantillons non distribués en même temps (avec les mêmes intervalles) (contrôler l'ordre de distribution)
- variabilité intrinsèque des opérateurs