



INS - IRMA

KIP1251 – KIP1254

History

Summary of change:

Previous Version: 150305-3	Current Version: 200224-1
	Addition of the following sentence at the end of the English IFU: "Other translations of this Instruction for Use can be downloaded from our website: https://www.diasource-diagnostics.com/ "



Read entire protocol before use.

INS-IRMA

I. INTENDED USE

Immunoradiometric assay kit for the in vitro quantitative measurement of human Insulin (INS) in serum.

II. GENERAL INFORMATION

- A. **Proprietary name :** DIAsource INS-IRMA Kit
- B. **Catalog number :** KIP1251 : 96 tests
KIP1254 : 4 x 96 tests
- C. **Manufactured by :** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

For technical assistance or ordering information contact :
Tel : +32 (0)10 84.99.11 Fax : +32 (0)10 84.99.91

III. CLINICAL BACKGROUND

A. Biological activities of insulin

Insulin, a polypeptide hormone with a molecular weight of 5800, is secreted by the beta cells of the islets of Langerhans from the pancreas. Insulin possesses a wide spectrum of biological actions. It stimulates cellular glucose uptake, glucose oxydation, glycogenesis, lipogenesis, proteogenesis and the formation of DNA and RNA. Insulin plays a key role in the regulation of plasma glucose levels (hepatic output inhibition, stimulation of peripheral glucose utilisation). The resulting hypoglycemic effects of insulin are counterbalanced by hormones with hyperglycemic effects (glucagon, growth hormone, cortisol, epinephrine). Insulin secretion is mainly controlled by the plasma glucose levels : hyperglycemia induces a prompt and important increase in circulating insulin levels. Neural influences, as well as various metabolic and hormonal factors (amino acids, glucagon, gastro intestinal hormone) also participate to the control of insulin secretion. Type I (insulin dependent : "juvenile") diabetes is due to a destruction of the beta cells, with a consequence of absolute lack of insulin. In type II (non-insulin-dependent : "maturity onset") diabetes, insulin resistance may play an important role; however after several years of evolution, beta-cells failure may occur, leading to a relative insulinopenia requiring, in some cases, insulin administration. Insulin resistance is associated with high circulation levels of the hormone. The most common case of insulin resistance is represented by obesity. Various endocrinopathies (acromegaly, Cushing syndrome) as well as rare cases of insulin receptor defects or cases with anti-insulin receptor antibodies are associated with glucose intolerance or even diabetes due to insulin resistance. The determination of plasma insulin levels is an important parameter in the diagnosis of hypoglycemia. Insulin levels are high in cases of insulinoma (beta-cell tumor). Functional postprandial hypoglycemia may also be associated with inappropriate insulin release to carbohydrate intake. Insulin levels are determined either in the fasting state or during dynamic test :

- stimulation test : carbohydrate rich meal, oral glucose tolerance test (OGTT), arginin infusion, tolbutamide or other sulfonylureas administration.
- inhibition test : fasting, somatostatine infusion


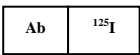
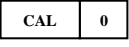
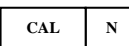
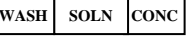

B. Clinical application of insulin determination

- . Determination of the beta-cell reserve during glucose tolerance test or after a carbohydrate rich meal, as a guide for the instauration of insulin therapy;
- . Contribution to the diagnosis of insulin and non-insulin-dependent diabetes;
- . Characterisation and follow-up of states of glucose intolerance;
- . Diagnosis and study of cases of insulin resistance;
- . Diagnosis of insulinoma and other causes of hypoglycemia.

IV. PRINCIPLES OF THE METHOD

The DIASource INS-Irma is an immunoradiometric assay based on coated-tube separation. Mabs1, the capture antibodies, are attached to the lower and inner surface of the plastic tube. Calibrators or samples added to the tubes will at first show low affinity for Mabs1. Addition of Mab2, the signal antibody labelled with ¹²⁵I, will complete the system and trigger the immunological reaction. After washing, the remaining radioactivity bound to the tube reflects the antigen concentration. The use of several distinct Mabs avoids hyperspecificity, common to two-site IRMA, as well as a need of a shaker or incubation at 37°C.

V. REAGENTS PROVIDED

Reagents	96 tests Kit	4x96 tests Kit	Colour Code	Reconstitution
 Tubes coated with anti INS (monoclonal antibodies)	2 x 48	8 x 48	dark red	Ready for use
 TRACER: ¹²⁵ Iodine labelled anti-INS (monoclonal antibodies) in HEPES buffer with bovine serum albumin, azide (<0.1%), EDTA and an inert red dye	1 vial 5.5 ml 350 kBq	4 vials 5.5 ml 350 kBq	red	Ready for use
 Zero calibrator in human plasma and thymol	1 vial lyophilized	2 vials lyophilized	yellow	Add 2.0 ml distilled water
 Calibrator N = 1 to 5 (see exact values on vial labels) in human plasma and thymol	5 vials lyophilized	2 x 5 vials lyophilized	yellow	Add 0.5 ml distilled water
 Wash Solution (Tris-HCl)	1 vial 10 ml	4 vials 10 ml	brown	Dilute 70 x with distilled water (use a magnetic stirrer).
 Controls - N = 1 or 2 in human plasma with thymol	2 vials lyophilized	2 x 2 vials lyophilized	silver	Add 0.5 ml distilled water

Note: 1. Use the zero calibrator for sample dilutions.
2. 1 µIU of the calibrator preparation is equivalent to 1 µIU of WHO 66/304.

VI. SUPPLIES NOT PROVIDED

The following material is required but not provided in the kit:

- Distilled water
- Pipettes for delivery of: 50 µl, 500 µl and 2 ml (the use of accurate pipettes with disposable plastic tips is recommended)
- Vortex mixer
- Magnetic stirrer
- 5 ml automatic syringe (Cornwall type) for washing
- Aspiration system (optional)
- Any gamma counter capable of measuring ¹²⁵I may be used (minimal yield 70%).

VII. REAGENT PREPARATION

- Calibrators** : Reconstitute the zero calibrator with 2.0 ml distilled water and other calibrators with 0.5 ml distilled water.
- Controls** : Reconstitute the controls with 0.5 ml distilled water.

- Working Wash solution** : Prepare an adequate volume of Working Wash solution by adding 69 volumes of distilled water to 1 volume of Wash Solution (70x). Use a magnetic stirrer to homogenize. Discard unused Working Wash solution at the end of the day.

VIII. STORAGE AND EXPIRATION DATING OF REAGENTS

- Before opening or reconstitution, all kits components are stable until the expiry date, indicated on the vial label, if kept at 2 to 8°C.
- After reconstitution, calibrators and controls are stable for 3 days at 2 to 8°C. For longer storage periods, aliquots of calibrators and controls should be made and kept at -20°C for maximum 3 months.
- Freshly prepared Working Wash solution should be used on the same day.
- After its first use, tracer is stable until expiry date, if kept in the original well closed vial at 2 to 8°C.
- Alterations in physical appearance of kit reagents may indicate instability or deterioration.

IX. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

- Serum must be kept at 2 - 8°C.
- If the test is not run within 24 hours, storage at -20°C is recommended
- Avoid subsequent freeze thaw cycles.
- Do not use haemolysed samples.

X. PROCEDURE

A. Handling notes

Do not use the kit or components beyond expiry date. Do not mix materials from different kit lots. Bring all the reagents to room temperature prior to use.

Thoroughly mix all reagents and samples by gentle agitation or swirling. In order to avoid cross-contamination, use a clean disposable pipette tip for the addition of each reagent and sample.

High precision pipettes or automated pipetting equipment will improve the precision. Respect the incubation times.

Prepare a calibration curve for each run, do not use data from previous runs.

B. Procedure

- Label coated tubes in duplicate for each calibrator, sample, control. For the determination of total counts, label 2 normal tubes
- Briefly vortex calibrators, samples and controls and dispense 50 µl of each into respective tubes.
- Dispense 50 µl of tracer into each tube.
- Shake the rack containing the tubes gently by hand to liberate any trapped air bubbles.
- Incubate for 2 hours at room temperature.
- Aspirate (or decant) the content of each tube (except total counts). Be sure that the plastic tip of the aspirator reaches the bottom of the coated tube in order to remove all the liquid.
- Wash tubes with 2 ml Working Wash solution (except total counts). Avoid foaming during the addition of the Working Wash solution.
- Aspirate (or decant) the content of each tube (except total counts).
- Wash tubes again with 2 ml Wash solution (except total counts) and aspirate (or decant).
- After the last washing, let the tubes stand upright for two minutes and aspirate the remaining drop of liquid.
- Count tubes in a gamma counter for 60 seconds.

XI. CALCULATION OF RESULTS

- Calculate the mean of duplicate determinations.
- On semilogarithmic or linear graph paper plot the c.p.m. (ordinate) for each calibrator against the corresponding concentration of INS (abscissa) and draw a calibration curve through the calibrator points, reject the obvious outliers.
- Read the concentration for each control and sample by interpolation on the calibration curve.
- Computer assisted data reduction will simplify these calculations. If automatic result processing is used, a 4 parameter logistic function curve fitting is recommended.

XII. TYPICAL DATA

The following data are for illustration only and should never be used instead of the real time calibration curve.

INS-IRMA		cpm	B/T (%)
Total count		129481	100
Calibrator	0.0 µIU/ml	197	0.15
	5.7 µIU/ml	529	0.41
	13.5 µIU/ml	1277	0.99
	46.0 µIU/ml	4796	3.70
	144.0 µIU/ml	16436	12.69
	440.0 µIU/ml	44090	34.05

XIII. PERFORMANCE AND LIMITATIONS

A. Detection Limit

Twenty zero calibrators were assayed along with a set of other calibrators. The detection limit, defined as the apparent concentration two standard deviations above the average counts at zero binding, was 1 µIU/ml.

B. Specificity

Cross-reactive hormones were added to a high value calibrator (100 µIU/ml or 4 ng/ml). The apparent INS response was measured. As shown hereafter, animal insulins (except rat insulin) cross-react whereas human, pork and beef proinsulins present no cross-reaction.

Added analyte to a high value serum	Theoretical INS values (ng/ml)	Observed INS values (ng/ml)	Cross-reaction (%)
Porcine insulin	8 ng/ml	4.2	> 100
Bovine insulin	8 ng/ml	3.8	> 100
Dog insulin	16 ng/ml	4.2	81
Rabbit insulin	16 ng/ml	4.2	62
Rat insulin	16 ng/ml	3.8	0.6
Human proinsulin	32 ng/ml	4.3	0.3
Porcine proinsulin	16 ng/ml	4.3	2.5
Bovine proinsulin	16 ng/ml	4.3	0.6

C. Precision

INTRA ASSAY				INTER ASSAY			
Serum	N	<X> ± SD (µIU/ml)	CV (%)	Serum	N	<X> ± SD (µIU/ml)	CV (%)
A	10	6.6 ± 0.1	2.1	A	20	14.4 ± 0.9	6.5
B	10	53.3 ± 0.8	1.5	B	20	100.4 ± 6.1	6.1

SD : Standard Deviation; CV: Coefficient of variation

D. Accuracy

RECOVERY TEST

Sample	Added INS (µIU/ml)	Recovered INS (µIU/ml)	Recovery (%)
Serum 1	245.0	264	107.8
Serum 2	76	73.5	96.7
Serum 3	24.5	24.4	99.6
Serum 4	6.75	6.5	96.3

DILUTION TEST

Sample	Dilution	Theoretical Concent. (µIU/ml)	Measured Concent. (µIU/ml)
Serum 1	1/1	-	101
	1/2	50.5	46
	1/4	25.3	21
	1/8	12.6	11
	1/16	6.3	6.2
Serum 2	1/1	-	328
	1/2	164	152
	1/4	82	76
	1/8	41	36
	1/16	20.5	18

Samples were diluted with zero calibrator.

E. Time delay between last calibrator and sample dispensing

As shown hereafter, assay results remain accurate even when a sample is dispensed 30 minutes after the calibrators have been added to the coated tubes.

	TIME DELAY	
	0' (µIU/ml)	30' (µIU/ml)
Serum 1	8	7
Serum 2	16	17
Serum 3	37	42
Serum 4	81	82

F. Hook effect

A sample spiked with INS up to 125000 µIU/ml gives higher counts than the last calibrator point.

XIV. LIMITATIONS

- Specimens from patients who have received preparations of mouse monoclonal antibodies for diagnosis or therapy may contain human anti-mouse antibodies (HAMA). Such specimens may show either falsely elevated or depressed values when tested with assay kits which employ mouse monoclonal antibodies.
- The same kind of interferences in the immunoassay can be induced by the presence of heterophilic antibodies, rheumatoid factors and/or AIA (anti-insulin autoantibodies).
- If results are not consistent with other clinical observations, additional information should be required before diagnosis.

XV. INTERNAL QUALITY CONTROL

- If the results obtained for Control 1 and/or Control 2 are not within the range specified on the vial label, the results cannot be used unless a satisfactory explanation for the discrepancy has been given.
- If desirable, each laboratory can make its own pools of control samples, which should be kept frozen in aliquots. Do not freeze-thaw more than twice.
- Acceptance criteria for the difference between the duplo results of the samples should rely on Good Laboratory Practises

XVI. REFERENCE INTERVALS

The range of insulin levels in 55 subjects with normal oral glucose tolerance tests, was 4 to 16 µIU/ml

These values are given only for guidance; each laboratory should establish its own normal range of values.

XVII. PRECAUTIONS AND WARNINGS

Safety

For in vitro diagnostic use only.

This kit contains ¹²⁵I (half-life: 60 days), emitting ionizing X (28 keV) and γ (35.5 keV) radiations.

This radioactive product can be transferred to and used only by authorized persons; purchase, storage, use and exchange of radioactive products are subject to the legislation of the end user's country. In no case the product must be administered to humans or animals.

All radioactive handling should be executed in a designated area, away from regular passage. A log book for receipt and storage of radioactive materials must be kept in the lab. Laboratory equipment and glassware, which could be contaminated with radioactive substances should be segregated to prevent cross contamination of different radioisotopes.

Any radioactive spills must be cleaned immediately in accordance with the radiology procedures. The radioactive waste must be disposed of following the local regulations and guidelines of the authorities holding jurisdiction over the

laboratory. Adherence to the basic rules of radiation safety provides adequate protection.

The human blood components included in this kit have been tested by European approved and/or FDA approved methods and found negative for HBsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 and 2. No known method can offer complete assurance that human blood derivatives will not transmit hepatitis, AIDS or other infections. Therefore, handling of reagents, serum or plasma specimens should be in accordance with local safety procedures.

All animal products and derivatives have been collected from healthy animals. Bovine components originate from countries where BSE has not been reported. Nevertheless, components containing animal substances should be treated as potentially infectious.

Avoid any skin contact with reagents (sodium azide as preservative). Azide in this kit may react with lead and copper in the plumbing and in this way form highly explosive metal azides. During the washing step, flush the drain with a large amount of water to prevent azide build-up.

Do not smoke, drink, eat or apply cosmetics in the working area. Do not pipette by mouth. Use protective clothing and disposable gloves.

XVIII. BIBLIOGRAPHY

- FLIER, J.S., KAHN, C.R. and ROTH, J. (1979).
Receptors, antireceptor antibodies and mechanisms of insulin resistance.
N. Engl. J. Med., 300; 8:413-419.
- FRIER, B.M., ASHBY, J.P., NAIRN, I.M. and BAIRS, J.D. (1981).
Plasma insulin, C-peptide and glucagon concentrations in patients with insulin-dependent diabetes treated with chlorpropamide.
Diab. Metab., 7;1:45-49.
- JUDZEWITSCH, R.G., PFEIFER, M.A., BEST, J.D., BEARD, J.C., HALTER, J.B. and PORTE D.Jr. (1982).
Chronic chlorpropamide therapy of non-insulin-dependent diabetes augments basal and stimulated insulin secretion by increasing islet sensitivity to glucose.
J.Clin. End. and Metab., 55;2:321-328.
- KOSAKA, K., HAGURA, R. and KUZUYA, T. (1977).
Insulin responses in equivocal and definite diabetes, with special reference to subjects who had mild glucose intolerance but later developed definite diabetes.
Diabetes, 26;10:944-952.
- STARR, J.I., MAKO, M.E., JUHN, D. and RUBENSTEIN, A.H. (1978).
Measurement of serum proinsulin-like material : cross-reactivity of porcine and human proinsulin in the insulin radioimmunoassay.
J. Lab. Clin. Med., 91;4:691-692.

- TEMPLE, R.C., CARRINGTON, C.A., LUZIO, S.D., OWENS, D.R., SCHNEIDER, A.E., SOBEY, W.J., HALES, C.N. (1989).
Insulin deficiency in non-insulin-dependent diabetes.
The Lancet, Feb.11:293-295.
- TEMPLE, R.C., CLARK, P.M., NAGI, D.K., SCHNEIDER, A.E., YUDKIN, J.S., HALES, C.N. (1990).
Clin. Endocrin., 32:689-693.
- TEMPLE, R.C., CLARK, P.M., HALES, C.N. (1992).
Measurement of insulin secretion in type 2 diabetes : problems and pitfalls.
Diabetic medicine, 9:503-512.
- CLARK, P. (1993)
Evaluation of Medgenix Insulin-Irma.
Addenbrooke's Hospital Cambridge, UK.

XIX. SUMMARY OF THE PROTOCOL

	TOTAL COUNTS (ml)	CALIBRATORS (ml)	SAMPLE(S) (ml)
Calibrators (0-5)	-	0.05	-
Samples	-	-	0.05
Tracer	0.05	0.05	0.05
Incubation	2 hours at room temperature		
Separation	-	aspirate (or decant)	
Working wash solution	-	2.0	
Separation	-	aspirate (or decant)	
Working wash solution	-	2.0	
Separation	-	aspirate (or decant)	
Counting	Count tubes for 60 seconds		

Other translations of this Instruction for Use can be downloaded from our website: <https://www.diasource-diagnostics.com/>

DIAsource Catalogue Nr : KIP1251 – KIP1254	Revision nr : 200224-1
---	---------------------------

Revision date : 24/02/2020

Lire entièrement le protocole avant utilisation.

INS-IRMA

I. BUT DU DOSAGE

Trousse de dosage radio-immunométrique pour la mesure quantitative *in vitro* de l'Insuline humaine (INS) dans le sérum humain.

II. INFORMATIONS GENERALES

- A. Nom du produit :** DIAsource INS-IRMA kit
- B. Numéro de catalogue :** KIP1251 : 96 tests
KIP1254 : 4 x 96 tests
- C. Fabriqué par :** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

Pour une assistance technique ou une information sur une commande :

Tel : +32 (0)10 84.99.11

Fax : +32 (0)10 84.99.91

III. CONTEXTE CLINIQUE

A. Activités biologiques de l'insuline

L'insuline, une hormone polypeptidique avec un poids moléculaire de 5800, est sécrétée par les cellules β des îlots de Langerhans dans le pancréas. L'insuline possède un large spectre d'actions biologiques. Elle stimule la prise de glucose cellulaire, l'oxydation du glucose, la glycogénèse, la lipogénèse, la protéogénèse et la formation de l'ADN et de l'ARN. L'insuline joue un rôle clef dans la régulation des niveaux de glucose dans le plasma (Inhibition de production hépatique, stimulation d'utilisation de glucose périphérique). Les effets hypoglycémiques résultant de l'insuline sont contrebalancés par des hormones avec des effets de hyperglycémie (glucagon, l'hormone de croissance, cortisol, l'adrénaline). La sécrétion d'insuline est principalement contrôlée par les niveaux de glucose dans le plasma : l'hyperglycémie incite une augmentation prompte et importante du niveau d'insuline circulante. Des influences neurales, aussi bien que des facteurs métaboliques et hormonaux divers (des acides aminés, glucagon, l'hormone gastro-intestinale) participent aussi au contrôle de sécrétion d'insuline. Le diabète de Type I (insuline dépendant : "juvénile") est provoqué par la destruction des cellules β , avec pour conséquence l'absence totale d'insuline. Dans le diabète de type II (non-insulino-dépendant : "Début de la maturité"), la résistance à l'insuline peut jouer un rôle important; toutefois après plusieurs années d'évolution, un manque de cellules β peut arriver, conduisant à une demande relative d'insulinopénie, dans certains cas, à l'administration d'insuline. La résistance à l'insuline est associée à des niveaux de circulation élevés de l'hormone. Le cas le plus répandu de résistance à l'insuline est représenté par l'obésité. De nombreuses maladies endocrinologiques (acromégalie, le syndrome de Cushing) aussi bien que les rares cas de défaut de récepteur d'insuline ou les cas impliquant les anticorps anti-récepteur à insuline sont associés à une intolérance au glucose ou même au diabète en raison de la résistance à l'insuline. La détermination de niveaux d'insuline dans le plasma est un paramètre important dans le diagnostic de l'hypoglycémie. Les niveaux d'insuline sont élevés dans les cas d'« insulinoma » (tumeur des cellules β). L'hypoglycémie fonctionnelle postprandiale peut aussi être associée à une libération inappropriée d'insuline et à la consommation d'hydrates de carbone. Les niveaux d'insuline sont déterminés soit à jeun soit pendant un essai dynamique:

- test de stimulation: repas riche en hydrates de carbone, test de tolérance de glucose oral (OGTT), infusion d'arginine, administration de tolbutamide ou autres sulfonylurées.
- test d'inhibition : diète, infusion de somatostatine

B. Application clinique du dosage de l'insuline

- Détermination des réserves des cellules β pendant le test de tolérance au glucose ou après un repas riche en hydrates de carbone, comme référence pour l'établissement de la thérapie à l'insuline;
- Contribution au diagnostic des diabètes d'insuline et non-insulino-dépendant;
- Caractérisation et suivi des états d'intolérance au glucose;
- Diagnostic et étude des cas de résistance à l'insuline;
- Diagnostic de "l'insulinoma" et des autres causes d'hypoglycémie.

IV. PRINCIPE DU DOSAGE

La trousse DIAsource INS-Irma est une trousse de dosage radio-immunométrique basée sur la séparation en tube recouvert d'anticorps. Mabs1, les anticorps de capture, sont attachés sur la surface basse et interne du tube plastique. Les calibrateurs ou les échantillons ajoutés dans les tubes présenteront dans un premier temps une faible affinité pour Mabs1. L'addition de Mab2, l'anticorps signal marqué avec l'¹²⁵I, complètera le système et déclenchera la réaction immunologique. Suite au lavage, la radioactivité restante liée au tube reflètera la concentration de l'antigène. L'utilisation de plusieurs Mabs différents évite l'hyperspécificité, commune aux IRMA deux-sites, aussi bien que la nécessité d'un agitateur ou d'une incubation à 37°C.

V. REACTIFS FOURNIS

Reactifs	96 tests Kit	4x96 tests Kit	Code Couleur	Reconstitution			
Tubes recouverts avec l'anti INS (anticorps monoclonal)	2 x 48	8 x 48	rouge foncé	Prêt à l'emploi			
<table border="1" style="display: inline-table; vertical-align: middle;"><tr><td>Ab</td><td>¹²⁵I</td></tr></table> TRACEUR: INS marquée à l' ¹²⁵ Iodine (grade HPLC) dans un tampon HEPES avec de l'albumine bovine, de l'azide de sodium (<0,1%), EDTA et un colorant rouge inactif	Ab	¹²⁵ I	1 flacon 5,5 ml 350 kBq	4 flacons 5,5 ml 350 kBq	Rouge	Prêt à l'emploi	
Ab	¹²⁵ I						
<table border="1" style="display: inline-table; vertical-align: middle;"><tr><td>CAL</td><td>0</td></tr></table> Calibrateur zéro dans du plasma humain et du thymol	CAL	0	1 flacon lyophilisé	2 flacons lyophilisés	Jaune	Ajouter 2,0 ml d'eau distillée	
CAL	0						
<table border="1" style="display: inline-table; vertical-align: middle;"><tr><td>CAL</td><td>N</td></tr></table> Calibrateur N = 1 à 5 (cfr. Valeurs exactes sur chaque flacon) dans du plasma humain et du thymol	CAL	N	5 flacons lyophilisés	2 x 5 flacons lyophilisés	Jaune	Ajouter 0,5 ml d'eau distillée	
CAL	N						
<table border="1" style="display: inline-table; vertical-align: middle;"><tr><td>WASH</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table> Solution de Lavage (Tris-HCl)	WASH	SOLN	CONC	1 flacon 10 ml	4 flacons 10 ml	Brun	Diluer 70 x avec de l'eau distillée (utiliser un agitateur magnétique).
WASH	SOLN	CONC					
<table border="1" style="display: inline-table; vertical-align: middle;"><tr><td>CONTROL</td><td>N</td></tr></table> Contrôles - N = 1 ou 2 dans du plasma humain et du thymol	CONTROL	N	2 flacons lyophilisés	2 x 2 flacons lyophilisés	Gris	Ajouter 0,5 ml d'eau distillée	
CONTROL	N						

Note: 1. Utiliser le calibrateur zéro pour la dilution des échantillons.
2. 1 µIU de la préparation du calibrateur est équivalent à 1 µIU de WHO 66/304.

VI. MATERIEL NON FOURNI

Le matériel mentionné ci-dessous est requis mais non fourni avec la trousse:

- Eau distillée
- Pipettes pour distribuer: 50 µl, 500 µl et 2 ml (l'utilisation de pipettes précises et de pointes jetables en plastique est recommandée)
- Agitateur vortex
- Agitateur magnétique
- Seringue automatique de 5 ml (type Cornwall) pour les lavages
- Système d'aspiration (optionnel)
- Tout compteur gamma capable de mesurer l'¹²⁵I peut être utilisé (rendement minimum 70%).

VII. PREPARATION DES REACTIFS

- Calibrateurs** : Reconstituer le calibrateur zéro avec 2,0 ml d'eau distillée et les autres calibrateurs avec 0,5 ml d'eau distillée.
- Contrôles** : Reconstituer les contrôles avec 0,5 ml d'eau distillée.
- Solution de Lavage** : Préparer un volume adéquat de Solution de Lavage en ajoutant 69 volumes d'eau distillée à 1 volume de Solution de Lavage (70x). Utiliser un agitateur magnétique pour homogénéiser. Eliminer la Solution de Lavage non utilisée à la fin de la journée.

VIII. STOCKAGE ET DATE D'EXPIRATION DES REACTIFS

- Avant l'ouverture ou la reconstitution, tous les composants de la trousse sont stables jusqu'à la date d'expiration, indiquée sur l'étiquette, si la trousse est conservée entre 2 et 8°C.
- Après reconstitution, les calibrateurs et les contrôles sont stables pendant 3 jours entre 2 et 8°C. Pour de plus longues périodes de stockage, des aliquots devront être réalisés et ceux-ci seront gardés à -20°C pour 3 mois maximum.
- La Solution de Lavage préparée doit être utilisée le jour même.
- Après la première utilisation, le traceur est stable jusqu'à la date d'expiration, si celui-ci est conservé entre 2 et 8°C dans le flacon d'origine correctement fermé.
- Des altérations dans l'apparence physique des réactifs de la trousse peuvent indiquer une instabilité ou une détérioration.

IX. PREPARATION ET STABILITE DE L'ECHANTILLON

- Les échantillons de sérum doivent être gardés entre 2 et 8°C.
- Si le test n'est pas réalisé dans les 24 heures, un stockage à -20°C est recommandé.
- Eviter des cycles de congélation et décongélation successifs.
- Ne pas utiliser d'échantillons hémolysés.

X. MODE OPERATOIRE

A. Notes de manipulation

Ne pas utiliser la trousse ou ses composants après avoir dépassé la date d'expiration. Ne pas mélanger du matériel provenant de trousses de lots différents. Mettre tous les réactifs à température ambiante avant utilisation. Mélangez tous les réactifs et les échantillons sous agitation douce. Pour éviter toute contamination croisée, utiliser une nouvelle pointe de pipette pour l'addition de chaque réactif et échantillon. Des pipettes de haute précision ou un équipement de pipetage automatique permettent d'augmenter la précision. Respecter les temps d'incubation. Préparer une courbe de calibration pour chaque nouvelle série d'expériences, ne pas utiliser les données d'expériences précédentes.

B. Mode opératoire

- Identifier les tubes recouverts fournis dans la trousse, en double pour chaque calibrateur, échantillon, contrôle. Pour la détermination de l'activité totale, identifier 2 tubes non recouverts d'anticorps.
- Agiter au vortex brièvement les calibrateurs, les échantillons et les contrôles. Puis distribuer 50 µl de chacun d'eux dans leurs tubes respectifs. Distribuer 50 µl de traceur dans chaque tube.
- Agiter légèrement le portoir de tube manuellement pour libérer toute bulle d'air emprisonnée.
- Incuber pendant 2 heures à température ambiante.
- Aspirer (ou décanter) le contenu de chaque tube (à l'exception des tubes utilisés pour la détermination de l'activité totale). Assurez-vous que la pointe utilisée pour aspirer le liquide des tubes atteint le fond de chacun d'eux pour éliminer toute trace de liquide.
- Laver les tubes avec 2 ml de Solution de Lavage (à l'exception des tubes utilisés pour la détermination de l'activité totale) et aspirer. Eviter la formation de mousse pendant l'addition de la Solution de Lavage.
- Aspirer (ou décanter) le contenu de chaque tube (à l'exception des tubes utilisés pour la détermination de l'activité totale).
- Laver les tubes à nouveau avec 2 ml de Solution de Lavage (à l'exception des tubes utilisés pour la détermination de l'activité totale) et aspirer (ou décanter).
- Après le dernier lavage, laisser les tubes droits pendant 2 minutes et aspirer (ou décanter) le reste de liquide.
- Placer les tubes dans un compteur gamma pendant 60 secondes pour quantifier la radioactivité.

XI. CALCUL DES RESULTATS

- Calculer la moyenne de chaque détermination réalisée en double.
- Dessiner sur un graphique linéaire ou semi-logarithmique les cpm (ordonnées) pour chaque calibrateur contre la concentration correspondante en INS (abscisses) et dessiner une courbe de calibration à l'aide des points de calibration, écarter les valeurs aberrantes.
- Lire la concentration pour chaque contrôle et échantillon par interpolation sur la courbe de calibration.

4. L'analyse informatique des données simplifiera les calculs. Si un système d'analyse de traitement informatique des données est utilisé, il est recommandé d'utiliser la fonction « 4 paramètres » du lissage de courbes.

XII. DONNEES TYPES

Les données représentées ci-dessous sont fournies pour information et ne peuvent jamais être utilisées à la place d'une courbe de calibration.

INS-IRMA		cpm	B/T (%)
Activité totale		129481	100
Calibrateur	0,0 µIU/ml	197	0,15
	5,7 µIU/ml	529	0,41
	13,5 µIU/ml	1277	0,99
	46,0 µIU/ml	4796	3,70
	144,0 µIU/ml	16436	12,69
	440,0 µIU/ml	44090	34,05

XIII. PERFORMANCE ET LIMITES DU DOSAGE

A. Sensibilité

Vingt calibrateurs zéro ont été testés en parallèle avec un assortiment d'autres calibrateurs. La limite de détection, définie comme la concentration apparente située 2 déviations standards au-dessus de la moyenne déterminée à la fixation zéro, était de 1 µIU/ml.

B. Spécificité

Des hormones cross-réactives ont été ajoutées à un calibrateur de valeur élevée (100 µIU/ml ou 4 ng/ml). La réponse INS apparente a été mesurée. Comme montrée ci-dessous, Les insulines animales (à l'exception de l'insuline de rat) cross-réagissent tandis que les pro-insulines humaines, porcine et de boeuf ne présentent aucune réaction croisée.

Analyte ajouté au sérum de valeur élevée	Concentration théorique (ng/ml)	Valeurs INS observées (ng/ml)	Réactivité Croisée (%)
Insuline porcine 8 ng/ml	4,2	17,4	> 100
Insuline bovine 8 ng/ml	3,8	17,8	> 100
Insuline canine 16 ng/ml	4,2	17,2	81
Insuline de lapin 16 ng/ml	4,2	14,1	62
Insuline de rat 16 ng/ml	3,8	3,7	0,6
Pro-insuline humaine 32 ng/ml	4,3	4,4	0,3
Pro-insuline porcine 16 ng/ml	4,3	4,7	2,5
Pro-insuline de boeuf 16 ng/ml	4,3	4,4	0,6

C. Précision

INTRA-ESSAI				INTER-ESSAI			
Sérum	N	<X> ± SD (µIU/ml)	CV (%)	Sérum	N	<X> ± SD (µIU/ml)	CV (%)
A	10	6,6 ± 0,1	2,1	A	20	14,4 ± 0,9	6,5
B	10	53,3 ± 0,8	1,5	B	20	100,4 ± 6,1	6,1

SD : Déviation Standard; CV: Coefficient de variation

D. Exactitude

TEST DE RECUPERATION

Echantillon	INS ajoutée (µIU/ml)	INS récupérée (µIU/ml)	Récupération (%)
Serum 1	245.0	264	107.8
Serum 2	76	73.5	96.7
Serum 3	24.5	24.4	99.6
Serum 4	6.75	6.5	96.3

TEST DE DILUTION

Echantillon	Dilution	Concent. théorique (µIU/ml)	Concent. Mesurée (µIU/ml)
Serum 1	1/1	-	101
	1/2	50.5	46
	1/4	25.3	21
	1/8	12.6	11
	1/16	6.3	6.2
Serum 2	1/1	-	328
	1/2	164	152
	1/4	82	76
	1/8	41	36
	1/16	20.5	18

Les échantillons ont été dilués avec le calibrateur zéro.

E. Délai entre la distribution du dernier calibrateur et celle de l'échantillon

Comme montré ci-dessous, les résultats d'un essai restent précis même quand un échantillon est distribué 30 minutes après que le calibrateur a été ajouté aux tubes avec l'anticorps.

	DELAI	
	0' (µIU/ml)	30' (µIU/ml)
Serum 1	8	7
Serum 2	16	17
Serum 3	37	42
Serum 4	81	82

F. Effet crochet

Un échantillon dopé avec de l'INS jusqu'à 125000 µIU/ml donne des cpm supérieurs au dernier point de calibration.

XIV. LIMITATIONS

- Les échantillons de patients ayant reçu des préparations d'anticorps monoclonaux de souris pour un diagnostic ou comme traitement peuvent contenir des anticorps humains anti-souris (HAMA). De tels échantillons peuvent montrer des valeurs soit faussement élevées soit faussement basses lorsqu'ils sont analysés avec des trousse d'analyses utilisant des anticorps monoclonaux de souris.
- Le même genre d'interférences peuvent être induites par la présence d'anticorps hétérophiles, de facteurs rhumatoïdes et/ou d'AIA (auto-anticorps anti-insuline).
- Si les résultats ne sont pas cohérents avec les autres observations cliniques, des informations supplémentaires doivent être demandées avant de poser le diagnostic.

XV. CÔNTROLE QUALITE INTERNE

- Si les résultats obtenus pour le(s) contrôle(s) 1 et/ou 2 ne sont pas dans l'intervalle spécifié sur l'étiquette du flacon, les résultats ne peuvent pas être utilisés à moins que l'on ait donné une explication satisfaisante de la non-conformité.
- Chaque laboratoire est libre de faire ses propres stocks d'échantillons contrôles, lesquels doivent être congelés aliquotés. Ne pas congeler – décongeler plus de deux fois.
- Les critères d'acceptation pour les écarts des valeurs en doublet des échantillons doivent être basés sur les pratiques de laboratoire courantes.

XVI. VALEURS ATTENDUES

Les niveaux d'insuline pour 55 sujets avec des tests de tolérance de glucose normaux, étaient de 4 à 16 µIU/ml
Les valeurs sont données à titre d'information; chaque laboratoire doit établir ses propres écarts de valeurs.

XVII. PRECAUTIONS ET AVERTISSEMENTS

Sécurité

Pour utilisation en diagnostic *in vitro* uniquement.

Cette trousse contient de ^{125}I (demi-vie: 60 jours), une matière radioactive émettant des rayonnements ionisants X (28 keV) et γ (35.5 keV).

Ce produit radioactif peut uniquement être reçu, acheté, possédé ou utilisé par des personnes autorisées; l'achat, le stockage, l'utilisation et l'échange de produits radioactifs sont soumis à la législation du pays de l'utilisateur final. Ce produit ne peut en aucun cas être administré à l'homme ou aux animaux.

Toutes les manipulations radioactives doivent être exécutées dans un secteur désigné, éloigné de tout passage. Un journal de réception et de stockage des matières radioactives doit être tenu à jour dans le laboratoire. L'équipement de laboratoire et la verrerie, qui pourrait être contaminée avec des substances radioactives, doivent être isolés afin d'éviter la contamination croisée de plusieurs isotopes.

Toute contamination ou perte de substance radioactive doit être réglée conformément aux procédures de radio sécurité. Les déchets radioactifs doivent être placés de manière à respecter les réglementations en vigueur. L'adhésion aux règles de base de sécurité concernant les radiations procure une protection adéquate.

Les composants de sang humain inclus dans ce kit ont été évalués par des méthodes approuvées par l'Europe et/ou la FDA et trouvés négatifs pour HBsAg, l'anti-HCV, l'anti-HIV-1 et 2. Aucune méthode connue ne peut offrir l'assurance complète que des dérivés de sang humain ne transmettront pas d'hépatite, le sida ou toute autre infection. Donc, le traitement des réactifs, du sérum ou des échantillons de plasma devront être conformes aux procédures locales de sécurité.

Tous les produits animaux et leurs dérivés ont été collectés d'animaux sains. Les composants bovins proviennent de pays où l'ESB n'a pas été détectée. Néanmoins, les composants contenant des substances animales devront être traités comme potentiellement infectieux.

L'azide de sodium est nocif s'il est inhalé, avalé ou en contact avec la peau (l'azide de sodium est utilisé comme agent conservateur). L'azide dans cette trousse pouvant réagir avec le plomb et le cuivre dans les canalisations et donner des composés explosifs, il est nécessaire de nettoyer abondamment à l'eau le matériel utilisé.

Ne pas fumer, ni boire, ni manger ni appliquer de produits cosmétiques dans les laboratoires où des produits radioactifs sont utilisés. Ne pas pipeter avec la bouche. Utiliser des vêtements protecteurs et des gants à usage unique.

XVIII. BIBLIOGRAPHIE

- FLIER, J.S., KAHN, C.R. and ROTH, J. (1979).
Receptors, antireceptor antibodies and mechanisms of insulin resistance.
N. Engl. J. Med., 300; 8:413-419.
- FRIER, B.M., ASHBY, J.P., NAIRN, I.M. and BAIRS, J.D. (1981).
Plasma insulin, C-peptide and glucagon concentrations in patients with insulin-dependent diabetes treated with chlorpropamide.
Diab. Metab., 7;1:45-49.
- JUDZEWITSCH, R.G., PFEIFER, M.A., BEST, J.D., BEARD, J.C., HALTER, J.B. and PORTE D.Jr. (1982).
Chronic chlorpropamide therapy of non-insulin-dependent diabetes augments basal and stimulated insulin secretion by increasing islet sensitivity to glucose.
J.Clin. End. and Metab., 55;2:321-328.
- KOSAKA, K., HAGURA, R. and KUZUYA, T. (1977).
Insulin responses in equivocal and definite diabetes, with special reference to subjects who had mild glucose intolerance but later developed definite diabetes.
Diabetes, 26;10:944-952.
- STARR, J.I., MAKO, M.E., JUHN, D. and RUBENSTEIN, A.H. (1978).
Measurement of serum proinsulin-like material : cross-reactivity of porcine and human proinsulin in the insulin radioimmunoassay.
J. Lab. Clin. Med., 91;4:691-692.
- TEMPLE, R.C., CARRINGTON, C.A., LUZIO, S.D., OWENS, D.R., SCHNEIDER, A.E., SOBEY, W.J., HALES, C.N. (1989).
Insulin deficiency in non-insulin-dependent diabetes.
The Lancet, Feb.11:293-295.
- TEMPLE, R.C., CLARK, P.M., NAGI, D.K., SCHNEIDER, A.E., YUDKIN, J.S., HALES, C.N. (1990).
Clin. Endocrin., 32:689-693.

- TEMPLE, R.C., CLARK, P.M., HALES, C.N. (1992).
Measurement of insulin secretion in type 2 diabetes : problems and pitfalls.
Diabetic medicine, 9:503-512.
- CLARK, P. (1993)
Evaluation of Medgenix Insulin-Irma.
Addenbrooke's Hospital Cambridge, UK.

XIX. RESUME DU PROTOCOLE

	ACTIVITE TOTALE (ml)	CALIBRATEURS (ml)	ECHANTILLON(S) (ml)
Calibrateurs (0-5)	-	0,05	-
Echantillons	-	-	0,05
Traceur	0,05	0,05	0,05
Incubation	2 heures à température ambiante		
Séparation	-	Aspiration	
Solution de Lavage	-	2,0	
Séparation	-	aspiration	
Solution de Lavage	-	2,0	
Séparation	-	aspiration	
Comptage	Temps de comptage des tubes: 60 secondes		

Numéro de catalogue DIAsource : KIP1251 – KIP1254	Numéro de révision : 200224-1
--	----------------------------------

Date de révision : 24/02/2020

Lees het hele protocol vóór gebruik.

INS-IRMA

I. *BEOOGD GEBRUIK*

Immunoradiometrische testkit voor de in vitro kwantitatieve bepaling van humaan insuline (INS) in serum.

II. *ALGEMENE INFORMATIE*

A. **Gedeponoerd handelsmerk:** DIAsource INS-IRMA kit

B. **Catalogusnummer:** KIP1251: 96 testen
KIP1254: 4 x 96 testen

C. **Geproduceerd door:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, België.

Voor technische assistentie of voor bestelinformatie kunt u contact opnemen met:

Tel.: +32 (0)10 84 99 11 - Fax: +32 (0)10 84 99 91

III. *KLINISCHE ACHTERGROND*

A. *Biologische werkingsmechanismen van insuline*

Insuline, een polypeptide hormoon met een moleculair gewicht van 5800 Da, wordt uitgescheiden door de bètacellen van de eilandjes van Langerhans van de pancreas. Insuline beschikt over een breed spectrum van biologische werkingsmechanismen. Insuline stimuleert glucoseopname door de cellen, oxidatie van glucose, glycogenese, lipogenese, eiwitsynthese en de vorming van DNA en RNA. Insuline speelt een belangrijke rol bij de regulering van de plasmaglucozespiegels (inhibitie van de output van de lever, stimulering van het perifere glucosegebruik). De daaruit voortvloeiende hypoglycaemische werking van insuline wordt geneutraliseerd door hormonen met een hypoglycaemische werking (glucagon, groeihormoon, cortisol, epinefrine). Insulinesecretie wordt hoofdzakelijk geregeld door de plasmaglucozespiegels: hypoglycaemie induceert een onmiddellijke en een belangrijke verhoging van het circulerende insulinegehalte. Neurale invloeden alsook verscheidene metabole en hormonale factoren (aminozuren, glucagon, gastrointestinaal hormoon) spelen ook een rol bij de regulering van insulinesecretie. Type-1-diabetes (insuline-afhankelijke oftewel "juvenile" diabetes) is te wijten aan een vernietiging van de bètacellen, waardoor insuline totaal ontbreekt. Bij type-2-diabetes (niet-insuline-afhankelijke ofwel "ouderdomsdiabetes") kan insulineresistentie een belangrijke rol spelen. Echter, na een jarenlange evolutie is het mogelijk dat de bètacellen falen, wat leidt tot een relatieve insulinopenie waardoor in sommige gevallen toediening van insuline noodzakelijk is. Insulineresistentie wordt geassocieerd met een hoog circulerend gehalte van het hormoon. Veelal komt insulineresistentie tot uiting in de vorm van obesitas. Verscheidene endocrinopathieën (acromegalie, het Cushing-syndroom) alsook zeldzame gevallen van insulinerceptordefecten of gevallen met anti-insulinerceptorantilichamen worden geassocieerd met glucose-intolerantie of zelfs diabetes naar aanleiding van insulineresistentie. De bepaling van de insulinespiegel in het plasma is een belangrijke parameter bij de diagnose van hypoglycaemie. Insulinespiegels zijn hoog ingeval van een insulinoom (tumor aan de bètacellen). Ook functionele postprandiale hypoglycaemie kan worden geassocieerd met een onjuiste insulineafgifte bij opname van koolhydraten. Insulinespiegels worden bepaald met ofwel een test wanneer men nuchter is ofwel een dynamische test:

- stimulatietest: maaltijd rijk aan koolhydraten, orale glucosetolerantietest (OGTT), infuus met arginine, toediening van tolbutamide of andere sulfonyleurea.
- inhibitietest: nuchter, infuus met somatostatine.

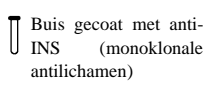
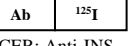
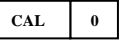
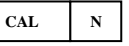

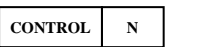
B. *Klinische toepassing van insulinebepaling*

- Bepaling van de reserve van bètacellen tijdens een glucosetolerantietest of na een maaltijd rijk aan koolhydraten, als richtlijn voor de aanvang van een behandeling met insuline;
- Bijdrage tot de diagnose van insuline-afhankelijke en niet-insuline-afhankelijke diabetes;
- Karakterisering en opvolging van gevallen van glucose-intolerantie;
- Diagnose en bestudering van gevallen van insulineresistentie;
- Diagnose van insulinoom en andere oorzaken van hypoglykemie.

IV. BESCHRIJVING VAN DE METHODE

INS-Irma van DIASource is een immunoradiometrische bepaling die gebaseerd is op een scheiding aan de hand van een gecoate tube. Mabs1, de invangantilichamen, zijn onderaan aan het binnenoppervlak van de plastic tube gehecht. Kalibrators of monsters die toegevoegd worden aan de tubes zullen aanvankelijk een lage affiniteit vertonen voor Mabs1. Toevoeging van Mab2, het signaalgenererend antilichaam dat gelabeld werd met ¹²⁵I, zal het systeem vervollledigen en de immunologische reactie teweegbrengen. Na de wasfase geeft de overblijvende radioactiviteit, gebonden aan de buis, de antigeenconcentratie weer. Door het gebruik van meerdere verschillende Mabs wordt hyperspecificiteit vermeden, die gebruikelijk is voor IRMA met 2 Mabs, en is een schudder of een incubatie bij 37°C niet nodig.

V. GELEVERDE REAGENTIA

Reagentia	Kit met 96 testen	Kit met 4 x 96 testen	Kleur-code	Reconstitutie
	2 x 48	8 x 48	donker rood	Klaar voor gebruik
 TRACER: Anti-INS (monoklonale antilichamen) gelabeld met ¹²⁵ Jood in HEPES buffer met bovien serumalbumine, azide (< 0,1%), EDTA en een inerte rode kleurstof	1 flacon 5,5 ml 350 kBq	4 flacons 5,5 ml 350 kBq	rood	Klaar voor gebruik
 Nulkalibrator in humaan plasma en thymol	1 flacon, gevries-droogd	2 flacons, gevries-droogd	geel	2,0 ml gedestilleerd water toevoegen
 Kalibrator - N = 1 tot 5 (raadpleeg de flaconetiketten voor de exacte waarden) in humaan plasma en thymol	5 flacons, gevries-droogd	2 x 5 flacons, gevries-droogd	geel	0,5 ml gedestilleerd water toevoegen
 Wasoplossing (Tris-HCl)	1 flacon 10 ml	4 flacons 10 ml	bruin	70 x met gedestilleerd water verdunnen (gebruik een magnetische roerder).
 Controles - N = 1 of 2 in humaan plasma en thymol	2 flacons, gevries-droogd	2 x 2 flacons, gevries-droogd	zilver	0,5 ml gedestilleerd water toevoegen

Opmerking: 1. Gebruik de nulkalibrator voor monsterverdunningen.
2. 1 µIE van de kalibratorbereiding is gelijk aan 1 µIE van WHO 66/304.

VI. NIET MEEGELEVERDE MATERIALEN

De volgende materialen zijn noodzakelijk maar worden niet meegeleverd met de kit:

- Gedestilleerd water.
- Pipetten voor een volume van 50 µl, 500 µl en 2 ml (het gebruik van nauwkeurige pipetten met plastic wegwerptips wordt aanbevolen).
- Automatische spuit van 5 ml (type Cornwall) voor de wasfase.
- Afzuigsysteem (facultatief).
- Vortexmenger.
- Magnetische roerder.
- Een gammateller die geschikt is voor de bepaling van ¹²⁵I (rendement van ten minste 70%).

VII. BEREIDING VAN HET REAGENS

- Kalibrators:** Reconstitueer de nulkalibrator met 2,0 ml gedestilleerd water en andere kalibrators met 0,5 ml gedestilleerd water.
- Controles:** Reconstitueer de controles met 0,5 ml gedestilleerd water.

- Werk-wasoplossing:** Bereid een voldoende hoeveelheid werk-wasoplossing door 69 eenheden gedestilleerd water toe te voegen aan 1 eenheid wasoplossing (70 x).

Gebruik een magnetische roerder voor de homogenisering. Op het eind van de dag moet de ongebruikte werk-wasoplossing afgevoerd worden.

VIII. OPSLAG EN VERVALDATUM VAN REAGENTIA

- Vóór opening of reconstitutie zijn alle kitcomponenten houdbaar tot de vervaldatum, zoals vermeld op het etiket, indien zij bewaard werden bij 2 tot 8°C.
- Na reconstitutie zijn de kalibrators en controles gedurende 3 dagen houdbaar bij 2 tot 8°C. Voor een langere bewaartermijn moeten aliquots gemaakt worden, die bij -20°C bewaard moeten worden voor maximaal 3 maanden.
- Een vers bereide werk-wasoplossing moet op dezelfde dag nog gebruikt worden.
- Na het eerste gebruik is de tracer houdbaar tot de vervaldatum, indien bewaard bij 2 tot 8°C in de oorspronkelijke, goed afgesloten flacon.
- Wijzigingen in het fysieke aspect van kitreagentia kunnen wijzen op instabiliteit of op een kwaliteitsvermindering.

IX. MONSTERAFNAME EN MONSTERBEREIDING

- Serum moeten bij 2 tot 8°C bewaard worden.
- Indien de bepaling niet binnen 24 uur uitgevoerd wordt, dan wordt aanbevolen om ze bij -20°C te bewaren.
- Vermijd opeenvolgende cycli van bevriezen en ontdooien
- Gebruik geen gehemolyseerde monsters.

X. PROCEDURE

A. Opmerkingen bij de procedure

Gebruik de kit of de componenten niet langer dan de aangegeven vervaldatum. Materialen van kits van verschillende loten mogen niet gemengd worden. Laat alle reagentia op kamertemperatuur komen vóór gebruik.

Meng alle reagentia en monsters goed door ze voorzichtig te bewegen of door er voorzichtig mee te draaien. Om kruisbesmetting te vermijden, moet een propere wegwerpbare pipettip gebruikt worden voor toevoeging van elk reagens en monster.

Pipetten met een grote precisie of geautomatiseerde pipetteerapparatuur zullen de precisie verhogen. Respecteer de incubatietijden. Bereid een kalibratiecurve voor elke run; men mag geen gegevens gebruiken van voorafgaande runs.

B. Procedure

- Etiket de gecoate buisjes in duplo voor elke kalibrator, voor elk monster, voor elke controle. Etiket 2 normale tubes voor de bepaling van de totaal tellingen.
- Vortex de kalibrators, monsters en controles gedurende korte tijd en pipetteer 50 µl van elk in de desbetreffende tube.
- Pipetteer 50 µl van de tracer in elke tube.
- Schud het rek met de buizen voorzichtig met de hand zodat eventueel ingesloten luchtballen vrijkomen.
- Incubeer gedurende 2 uur bij kamertemperatuur.
- Zuig de inhoud van elke buis (met uitzondering van de totaal tellingen) op (of decanteer). Zorg ervoor dat de plastic tip van de aspirator tot aan de bodem van de gecoate tube komt zodat alle vloeistof verwijderd wordt.
- Was de buizen met 2 ml werk-wasoplossing (met uitzondering van de totaal tellingen). Vermijd schuimvorming tijdens toevoeging van de werk-wasoplossing.
- Zuig de inhoud van elke buis (met uitzondering van de totaal tellingen) op (of decanteer).
- Was de buizen nogmaals met 2 ml werk-wasoplossing (met uitzondering van de totaal tellingen) en zuig op (of decanteer).
- Na de laatste wasfase moeten de buizen gedurende twee minuten rechtop blijven staan en zuig daarna de overblijvende vloeistof op.
- Tel de buizen in een gammateller gedurende 60 seconden.

XI. BEREKENING VAN DE RESULTATEN

- Bereken het gemiddelde voor de bepalingen in duplo.
- Zet de cpm (ordinaat) uit voor elke kalibrator tegen de overeenkomstige INS-concentratie (abscis) op semi-logaritmisch of lineair millimeterpapier

en teken een kalibratiecurve door de kalibratiepunten, waarbij de duidelijke uitschieters verworpen worden.

- Lees door interpolatie de concentratie voor elke controle en voor elk monster op de kalibratiecurve.
 - Door computergestuurde gegevensreductie worden deze berekeningen vereenvoudigd.
- Indien de resultaten automatisch verwerkt worden, wordt de 4 parameter logistische functie aanbevolen voor de gepaste curve.

XII. KENMERKENDE GEGEVENS

De volgende gegevens dienen enkel ter illustratie en mogen in geen geval gebruikt worden ter vervanging van de real time kalibratiecurve.

INS-IRMA		cpm	B/T (%)
Totaaltelling		129481	100
Kalibrator	0,0 µIE/ml	197	0,15
	5,7 µIE/ml	529	0,41
	13,5 µIE/ml	1277	0,99
	46,0 µIE/ml	4796	3,70
	144,0 µIE/ml	16436	12,69
	440,0 µIE/ml	44090	34,05

XIII. EIGENSCHAPPEN EN GRENZEN

A. Detectielimiet

Twintig nulkalibrators werden bepaald, samen met een reeks andere kalibrators. De detectielimiet, omschreven als de schijnbare concentratie van twee standaarddeviaties boven de gemiddelde tellingen bij nulbinding, bedroeg 1 µIE/ml.

B. Specificiteit

Kruisreagerende hormonen werden toegevoegd aan een kalibrator met hoge waarde (100 µIE/ml of 4 ng/ml). De schijnbare respons van INS werd gemeten.

Zoals hieronder getoond wordt, is er een kruisreactie bij insuline van dieren (met uitzondering van insuline van de rat), terwijl pro-insuline van de mens, van het varken en van het rund geen kruisreactie vertonen.

Toegevoegd analyt aan een serum met hoge waarde		Theoretische INS waarden (ng/ml)	Waargenomen INS waarden (ng/ml)	Kruis reactie (%)
Insuline van het varken	8 ng/ml	4,2	17,4	> 100
Insuline van het rund	8 ng/ml	3,8	17,8	> 100
Insuline van de hond	16 ng/ml	4,2	17,2	81
Insuline van het konijn	16 ng/ml	4,2	14,1	62
Insuline van de rat	16 ng/ml	3,8	3,7	0,6
Pro-insuline van de mens	32 ng/ml	4,3	4,4	0,3
Pro-insuline van het varken	16 ng/ml	4,3	4,7	2,5
Pro-insuline van het rund	16 ng/ml	4,3	4,4	0,6

C. Precisie

BINNEN EEN TEST				TUSSEN TESTEN			
Serum	N	<X> ± SD (µIE/ml)	VC%	Serum	N	<X> ± SD (µIE/ml)	VC (%)
A	10	6,6 ± 0,1	2,1	A	20	14,4 ± 0,9	6,5
B	10	53,3 ± 0,8	1,5	B	20	100,4 ± 6,1	6,1

SD: standaarddeviatie; VC: variatiecoëfficiënt

D. Nauwkeurigheid

RECOVERY –TEST

Monster	Toegevoegd INS (µIE/ml)	Recovery van INS (µIE/ml)	Recovery (%)
Serum 1	245.0	264	107.8
Serum 2	76	73.5	96.7
Serum 3	24.5	24.4	99.6
Serum 4	6.75	6.5	96.3

VERDUNNINGSTEST

Monster	Verdunning	Theoretische concentratie (µIE/ml)	Concentratie die bepaald werd (µIE/ml)
Serum 1	1/1	-	101
	1/2	50.5	46
	1/4	25.3	21
	1/8	12.6	11
	1/16	6.3	6.2
Serum 2	1/1	-	328
	1/2	164	152
	1/4	82	76
	1/8	41	36
	1/16	20.5	18

De stalen zijn verdund met de nulkalibrator.

F. Tijdsperiode tussen de laatste kalibrator en distributie van het monster

Zoals hieronder weergegeven wordt, blijven de resultaten van de bepaling nauwkeurig, zelfs wanneer een monster 30 minuten na toevoeging van de kalibrator in de gecoate tubes gepipetteerd wordt.

	TIJDSPANNE	
	0' (µIE/ml)	30' (µIE/ml)
Serum 1	8	7
Serum 2	16	17
Serum 3	37	42
Serum 4	81	82

G. "Hook"-effect

Een monster, dat met INS gespiket werd tot 125000 µIE/ml, levert hogere tellingen op dan het laatste kalibratiepunt.

XIV. BEPERKINGEN

- Specimens van patiënten die voor de diagnose of behandeling preparaten hebben gekregen van monoklonale antilichamen van muizen kunnen humane anti-muis-antilichamen (HAMA) bevatten. Dergelijke specimens kunnen ofwel vals-verhoogde of vals-verlaagde waarden vertonen wanneer ze met testkits worden getest waarbij gebruik wordt gemaakt van monoklonale antilichamen van muizen.
- Het zelfde soort storingen in de immunoassay kan worden opgewekt door de aanwezigheid van heterofiele antilichamen, reumatoïde factoren en/of AIA (anti-insuline autoantilichamen).
- Als de resultaten niet overeenstemmen met andere klinische waarnemingen moet bijkomende informatie worden verkregen voordat de diagnose wordt gesteld.

XV. INTERNE KWALITEITSCONTROLE

- Indien de resultaten, die verkregen werden voor controle 1 en/of controle 2, niet binnen het bereik vallen zoals vermeld op het faconetiket, dan mogen de resultaten niet gebruikt worden tenzij een bevredigende uitleg gegeven wordt voor de discrepantie.
- Indien gewenst, kan elk laboratorium zijn eigen pools voor controlemonsters maken, die dan in aliquots bewaard moeten worden in de diepvriezer. Gelieve niet meer dan twee keer in te vriezen en te ontdoien.
- Aanvaardingscriteria voor het verschil tussen de resultaten in duplo van stalen moeten steunen op gangbare laboratoriumpraktijken.

XVI. REFERENTIE-INTERVALS

De insulineconcentratie van 55 personen met een normale orale glucosetolerantietest was 4 tot 16 µIE/ml.

Deze waarden worden slechts als leidraad gegeven; elk laboratorium moet zijn eigen normaal bereik van waarden uitmaken.

XVII. VOORZORGSMAATREGELEN EN WAARSCHUWINGEN

Veiligheid

Uitsluitend voor in vitro diagnostisch gebruik.

Deze kit bevat ¹²⁵I (halfwaardetijd: 60 dagen), dat ioniserende X- (28 keV) en γ-stralen (35.5 keV) uitzendt.

Dit radioactieve product mag enkel overhandigd worden aan en gebruikt worden door bevoegd personeel; ontvangst, opslag, gebruik en overdracht van radioactieve producten zijn onderworpen aan de wetgeving van het land van de eindgebruiker. In geen geval mag het product toegediend worden aan mensen of dieren.

Alle handelingen met radioactief materiaal moeten plaatsvinden in een daartoe bestemde ruimte, waar uitsluitend bevoegd personeel toegelaten wordt. Een logboek met ontvangst en opslag van radioactieve materialen moet worden bijgehouden in het laboratorium. Laboratoriumapparatuur en glaswerk, dat eventueel gecontamineerd werd met radioactieve bestanddelen, moeten worden gesegregeerd om kruisbesmetting van verschillende radioisotopen te vermijden.

Als radioactief materiaal gemorst werd, dan moet dat onmiddellijk gereinigd worden in overeenstemming met de procedure voor stralingsveiligheid. Het radioactieve afval moet worden weggegooid in overeenstemming met de plaatselijke voorschriften en richtlijnen van de autoriteiten waaronder het laboratorium valt. Naleving van de basisregels van stralingsveiligheid zorgt voor een juiste bescherming.

De componenten, afkomstig van menselijk bloed, in deze kit werden getest door in Europa goedgekeurde en/of door de Amerikaanse FDA goedgekeurde methoden op aanwezigheid van HBsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 en 2 en gaven een negatief resultaat. Geen enkele bekende methode kan echter volledige garantie bieden dat derivaten van menselijk bloed geen hepatitis, aids of andere infecties overdragen. Daarom moet men reagentia, serum- of plasmamonsters behandelen in overeenstemming met de plaatselijke veiligheidsprocedures.

Alle producten en derivaten van dierlijke oorsprong zijn afkomstig van gezonde dieren. Boviene componenten komen uit landen waar BSE niet gerapporteerd werd. Toch moeten componenten die bestanddelen van dierlijke oorsprong bevatten, behandeld worden als potentieel infectieus materiaal.

Vermijd dat de reagentia (natriumazide als conserveermiddel) in contact komen met de huid. Azide in deze kit kan reageren met lood en koper in de afvoerleidingen en op die manier zeer explosieve metaalaziden vormen. Tijdens de wasfase moeten de afvoerleidingen ruimschoots met water nagespoeld worden om ophoping van azide te vermijden.

Niet roken, drinken, eten of cosmetica aanbrengen in de werkruimte. Niet met de mond pipetteren. Draag beschermende kleding en gebruik wegwerphandschoenen.

XVIII. BIBLIOGRAFIE

- FLIER, J.S., KAHN, C.R. and ROTH, J. (1979).
Receptors, antireceptor antibodies and mechanisms of insulin resistance.
N. Engl. J. Med., 300; 8:413-419.
- FRIER, B.M., ASHBY, J.P., NAIRN, I.M. and BAIRS, J.D. (1981).
Plasma insulin, C-peptide and glucagon concentrations in patients with insulin-dependent diabetes treated with chlorpropamide.
Diab. Metab., 7;1:45-49.
- JUDZEWITSCH, R.G., PFEIFER, M.A., BEST, J.D., BEARD, J.C., HALTER, J.B. and PORTE D.Jr. (1982).
Chronic chlorpropamide therapy of non-insulin-dependent diabetes augments basal and stimulated insulin secretion by increasing islet sensitivity to glucose.
J.Clin. End. and Metab., 55;2:321-328.
- KOSAKA, K., HAGURA, R. and KUZUYA, T. (1977).
Insulin responses in equivocal and definite diabetes, with special reference to subjects who had mild glucose intolerance but later developed definite diabetes.
Diabetes, 26;10:944-952.
- STARR, J.I., MAKO, M.E., JUHN, D. and RUBENSTEIN, A.H. (1978).
Measurement of serum proinsulin-like material : cross-reactivity of porcine and human proinsulin in the insulin radioimmunoassay.
J. Lab. Clin. Med., 91;4:691-692.

- TEMPLE, R.C., CARRINGTON, C.A., LUZIO, S.D., OWENS, D.R., SCHNEIDER, A.E., SOBEY, W.J., HALES, C.N. (1989).
Insulin deficiency in non-insulin-dependent diabetes.
The Lancet, Feb.11:293-295.
- TEMPLE, R.C., CLARK, P.M., NAGI, D.K., SCHNEIDER, A.E., YUDKIN, J.S., HALES, C.N. (1990).
Clin. Endocrin., 32:689-693.
- TEMPLE, R.C., CLARK, P.M., HALES, C.N. (1992).
Measurement of insulin secretion in type 2 diabetes : problems and pitfalls.
Diabetic medicine, 9:503-512.
- CLARK, P. (1993)
Evaluation of Medgenix Insulin-Irma.
Addenbrooke's Hospital Cambridge, UK.

XIX. SAMENVATTING VAN HET PROTOCOL

	TOTAAL- TELLINGEN (ml)	KALIBRA- TORS (ml)	MONSTER(S) (ml)
Kalibrators (0 -5)	-	0,05	-
Monsters	-	-	0,05
Tracer	0,05	0,05	0,05
Incubatie	2 uur bij kamertemperatuur		
Scheiding	-	opzuigen (of decanteren)	
Werk-wasoplossing	-	2,0	
Scheiding	-	opzuigen (of decanteren)	
Werk-wasoplossing	-	2,0	
Scheiding	-	opzuigen (of decanteren)	
Telling	Tel de buisjes gedurende 60 seconden		

DIAsource catalogusnummer: KIP1251 – KIP1254	Revisienummer: 200224-1
--	----------------------------

Revisiedatum : 24/02/2020

Vor Gebrauch des Kits lesen Sie bitte diese Packungsbeilage.

INS-IRMA

I. VERWENDUNGSZWECK

Ein Radio-Immunoassay für die quantitative *in vitro* Bestimmung von humanem Insulin (INS) in Serum.

II. ALLGEMEINE INFORMATION

- A. **Handelsbezeichnung :** DIAsource INS-IRMA Kit
- B. **Katalognummer :** KIP1251 : 96 Tests
KIP1254 : 4 x 96 Tests
- C. **Hergestellt von:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgien.

Für technische Unterstützung oder Bestellungen wenden Sie sich bitte an:

Tel : +32 (0)10 84.99.11 Fax : +32 (0)10 84.99.91

Für Deutschland : Kostenfreie Rufnummer : 0800 1 00 85 74 - Kostenfreie Faxnummer : 0800 1 00 85 75
E-mail Ordering : ordering@diasource.be

III. KLINISCHER HINTERGRUND

A. *Biologische Aktivitäten von Insulin*

Insulin, ein Polypeptidhormon mit einem Molekulargewicht von 5800, wird von den Betazellen der Langerhansschen Inseln der Bauchspeicheldrüse sezerniert. Insulin besitzt ein weites Spektrum biologischer Aktivitäten. Es stimuliert die zelluläre Glucoseaufnahme, die Oxidation von Glucose, die Glykogenese, die Lipogenese, die Proteogenese und die Bildung von DNA und RNA. Insulin spielt eine Schlüsselrolle in der Regulation des Plasmaglucoosespiegels (Hemmung der Freisetzung aus der Leber, Stimulation der peripheren Glucoseverbrennung). Die daraus resultierenden hypoglykämischen Effekte von Insulin werden von Hormonen mit hyperglykämischer Wirkung kompensiert (Glukagon, Wachstumshormon, Cortisol, Adrenalin). Die Insulinsekretion wird hauptsächlich über den Plasmaglucoosespiegel kontrolliert: Hyperglykämie induziert einen sofortigen und wichtigen Anstieg des Insulinspiegels im Blutkreislauf. Neuronale Einflüsse sowie verschiedene metabolische und hormonelle Faktoren (Aminosäuren, Glukagon, Gastrointestinales Hormon) spielen ebenfalls eine Rolle in der Regulation der Insulin Sekretion. Typ I (insulinabhängiger : "juveniler") Diabetes resultiert aus einer Zerstörung der Betazellen, was ein absolutes Fehlen von Insulin zur Folge hat. Bei Typ II (nicht-insulin-abhängiger : "Alters-") Diabetes, kann eine Insulinresistenz eine wichtige Rolle spielen; jedoch kann nach einigen Jahren Krankengeschichte eine Zerstörung der Betazellen erfolgen, die zu einer relativen Insulinopenie führt und in einigen Fällen Insulingabe benötigt. Insulinresistenz ist mit einem hohen Blutspiegel dieses Hormons gekoppelt. Am häufigsten kommt Insulinresistenz bei Fettsucht vor. Verschiedene Endokrinopathien (Akromegalie, Cushing Syndrom), sowie seltene Fälle von Insulinrezeptordefekten oder Fälle mit Anti-Insulin-Rezeptorantikörpern sind mit Glukoseintoleranz oder sogar Diabetes aufgrund einer Insulinresistenz gekoppelt. Die Bestimmung des Plasmainsulinspiegels ist ein wichtiger Parameter bei der Diagnose der Hypoglykämie. Der Insulinspiegel ist hoch bei einem Insulinom (Betazelltumor). Eine funktionelle postprandiale Hypoglykämie kann ebenfalls zu einer unangemessenen Insulinausschüttung nach Kohlenhydrataufnahme führen. Insulinspiegel werden entweder nüchtern oder mithilfe eines dynamischen Tests bestimmt :

- a) Stimulationstest: Kohlenhydratreiche Nahrung, oraler Glucosetoleranztest (OGTT), Arginin-Infusion, Einnahme von Tolbutamid oder anderen Sulfonylharnstoffen.
- b) Inhibitionstest : Fasten, Somatostatin-Infusion

B. *Klinische Anwendung der Insulinbestimmung*

- . zur Bestimmung der Betazellreserve bei einem Glucosetoleranztest oder nach einem kohlenhydratreichen Mahl, als Leitlinie für die Etablierung einer Insulintherapie;
- . als Beitrag zur Diagnose des Insulin- und nicht-Insulin-abhängigen Diabetes;
- . zur Charakterisierung und Weiterverfolgung von Stadien der Glukoseintoleranz;
- . zur Diagnose und Untersuchung bei Fällen von Insulinresistenz;
- . zur Diagnose des Insulinoms und anderer Ursachen der Hypoglykämie.

IV. GRUNDSÄTZLICHES ZUR DURCHFÜHRUNG

Der DIASource INS-IRMA ist ein Radioimmuno-Assay in beschichteten Röhrchen. Mab1, die Fänger-Antikörper, haften an der unteren inneren Oberfläche des Plastikröhrchens. In die Röhrchen zugegebene Kalibratoren oder Proben zeigen zuerst eine niedrige Affinität zu Mab1. Zugabe von Mab2, des mit ¹²⁵I markierten Signalantikörpers, vervollständigt das System und triggert die immunologische Reaktion. Nach dem Waschen gibt die verbleibende, an den Röhrchen haftende Radioaktivität die Antigenkonzentration wieder. Die Verwendung einiger unterschiedlicher Mabs und auch die Inkubation bei 37°C auf einem Schüttler verhindert die sonst bei zweiseitigem IRMA auftretende Hyperspezifität.

V. MITGELIEFERTE REAGENZIEN

Reagenzien	96 Test Kit	4x96 Test Kit	Farb Code	Rekonstitution			
Mit anti INS-beschichtete Röhrchen (monoklonale Antikörper)	2 x 48	8 x 48	dunkel rot	gebrauchsfertig			
<table border="1" style="display: inline-table; vertical-align: middle;"> <tr> <td>Ab</td> <td>¹²⁵I</td> </tr> </table> TRACER: ¹²⁵ Iodmarkierter Anti-INS (monoklonale Antikörper) in HEPES-puffer mit Rinderserumalbumin, Azid (<0.1%), EDTA und inertem roten Farbstoff	Ab	¹²⁵ I	1 Gefäß 5,5 ml 350 kBq	4 Gefäß 5,5 ml 350 kBq	rot	gebrauchsfertig	
Ab	¹²⁵ I						
<table border="1" style="display: inline-table; vertical-align: middle;"> <tr> <td>CAL</td> <td>0</td> </tr> </table> Null Kalibrator in Humanplasma und Thyrol	CAL	0	1 Gefäß lyophilisiert	2 Gefäße lyophil.	gelb	2.0 ml dest. Wasser zugeben	
CAL	0						
<table border="1" style="display: inline-table; vertical-align: middle;"> <tr> <td>CAL</td> <td>N</td> </tr> </table> Kalibrator - N = 1 to 5 (genaue Werte auf Gefäß-Etiketten) in Humanplasma und Thyrol	CAL	N	5 Gefäße lyophilisiert	2 x 5 Gefäße lyophil.	gelb	0.5 ml dest. Wasser zugeben	
CAL	N						
<table border="1" style="display: inline-table; vertical-align: middle;"> <tr> <td>WASH</td> <td>SOLN</td> <td>CONC</td> </tr> </table> Waschlösung (Tris-HCl)	WASH	SOLN	CONC	1 Gefäß 10 ml	4 Gefäß 10 ml	braun	70 x mit dest. Wasser verdünnen (Magnetrührer benutzen).
WASH	SOLN	CONC					
<table border="1" style="display: inline-table; vertical-align: middle;"> <tr> <td>CONTROL</td> <td>N</td> </tr> </table> Kontrollen - N = 1 or 2 Humanplasma und Thyrol	CONTROL	N	2 Gefäße lyophilisiert	2 x 2 Gefäße lyophil.	silber	0.5 ml dest. Wasser zugeben	
CONTROL	N						

Bemerkung: 1. Benutzen Sie den Null-Kalibrator zur Probenverdünnung.
2. 1 µIU der Standardzubereitung ist äquivalent zu 1 µIU WHO 66/304.

VI. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL

Folgendes Material wird benötigt, aber nicht mit dem Kit mitgeliefert:

1. Dest. Wasser
2. Pipetten: 50 µl, 500 µl und 2 ml (Verwendung von Präzisionspipetten mit Wegwerf-Plastikspitzen wird empfohlen)
3. 5 ml automatische Spritze (Cornwall Typ) zum Waschen
4. Absaugsystem (optional)
5. Vortex Mixer
6. Magnetrührer
7. Jegl. Gamma-Counter, der 125I messen kann, kann verwendet werden. (minimal Yield 70%)

VII. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- A. Kalibratoren:** Rekonstituieren Sie den Nullstandard mit 2.0 ml dest. Wasser, die anderen Standards mit 0.5 ml dest. Wasser.
- B. Kontrollen:** Rekonstituieren Sie die Kontrollen mit 0.5 ml dest. Wasser.
- C. Waschlösung:** Bereiten Sie ein angemessenes Volumen Waschlösung aus einem Anteil Waschlösung (70x) mit 69 Anteilen dest. Wasser zu. Verwenden Sie einen Magnetrührer zum gleichmäßigen Durchmischen. Verwerfen Sie die nicht benutzte Waschlösung am Ende des Tages.

VIII. AUFBEWAHRUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Vor dem Öffnen oder Rekonstitution sind die Reagenzien des Kits bis zum Ablaufdatum (Angaben auf Etikett) bei Lagerung bei 2°C bis 8°C stabil.
- Nach der Rekonstitution sind die Kalibratoren und Kontrollen bei 2°C bis 8°C 3 Tage stabil. Aliquots müssen bei längerer Aufbewahrung bei -20°C eingefroren werden für maximal 3 Monate.
- Frisch zubereitete Waschlösung sollte am selben Tag benutzt werden.
- Nach der ersten Benutzung ist der Tracer bei Aufbewahrung im Originalgefäß und bei 2° bis 8° C bis zum Ablaufdatum stabil.
- Veränderungen im Aussehen der Kitkomponenten können ein Anzeichen für Instabilität oder Zerfall sein.

IX. PROBENSAMMLUNG UND -VORBEREITUNG

- Serumproben müssen bei 2-8°C aufbewahrt werden.
- Falls der Test nicht innerhalb von 24 Std. durchgeführt wird, ist die Aufbewahrung bei -20°C erforderlich.
- Vermeiden Sie wiederholtes Einfrieren und Auftauen.
- Keine hämolytischen Proben benutzen

X. DURCHFÜHRUNG

A. Bemerkungen zur Durchführung

Verwenden Sie den Kit oder dessen Komponenten nicht nach Ablaufdatum. Vermischen Sie Materialien von unterschiedlichen Kit-Chargen nicht. Bringen Sie alle Reagenzien vor der Verwendung auf Raumtemperatur. Mischen Sie alle Reagenzien und Proben gründlich durch sanftes Schütteln oder Rühren. Verwenden Sie saubere Wegwerf-Pipettenspitzen, um Kreuzkontamination zu vermeiden. Präzisionspipetten oder ein automatisches Pipettiersystem erhöhen die Präzision. Achten Sie auf die Einhaltung der Inkubationszeiten. Erstellen Sie für jeden Durchlauf eine Standardkurve, verwenden Sie nicht die Daten von früheren Durchläufen.

B. Durchführung

1. Beschriften Sie je 2 beschichtete Röhrchen für jeden Kalibrator, jede Probe und Kontrolle. Zur Bestimmung der Gesamtaktivität, beschriften Sie 2 normale Röhrchen.
2. Vortexen Sie Kalibratoren, Proben und Kontrollen kurz und geben Sie jeweils 50 µl in ihre Röhrchen.
3. Geben Sie 50 µl des Tracers in jedes Röhrchen.
4. Schütteln Sie vorsichtig die Halterung mit den Röhrchen um Blasen zu entfernen.
5. Inkubieren Sie 2 Stunden bei Raumtemperatur.
6. Saugen Sie den Inhalt jedes Röhrchens ab (oder dekantieren Sie) (außer Gesamtaktivität). Vergewissern Sie sich, dass die Plastikspitze des Absaugers den Boden des beschichteten Röhrchens erreicht, um die gesamte Flüssigkeit zu entfernen.
7. Waschen Sie die Röhrchen mit 2 ml Waschlösung (außer Gesamtaktivität) und saugen Sie ab (oder dekantieren Sie). Vermeiden Sie Schaumbildung bei Zugabe der Waschlösung.
8. Saugen Sie den Inhalt jeden Röhrchens (außer Gesamtaktivität) ab.
9. Waschen Sie die Röhrchen mit 2 ml Waschlösung (außer Gesamtaktivität) und saugen Sie ab (oder dekantieren Sie).
10. Lassen Sie nach dem letzten Waschen die Röhrchen 2 Minuten aufrecht stehen und saugen Sie den verbleibenden Flüssigkeitstropfen ab.
11. Werten Sie die Röhrchen in einem Gamma-Counter 60 Sekunden aus.

XI. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

1. Berechnen Sie den Durchschnitt aus den Doppelbestimmungen.
2. Tragen Sie auf semilogarithmischem oder linearem Millimeterpapier den c.p.m. (Ordinate) für jeden Standard gegen die entsprechende Konzentration INS (Abszisse) und zeichnen Sie eine Standardkurve durch die Standardpunkte, schließen Sie offensichtliche „Ausreißer“ aus.
3. Berechnen Sie die Konzentration für jede Kontrolle und Probe durch Interpolation aus der Standardkurve.
4. Computergestützte Methoden können ebenfalls zur Erstellung der Kalibrationskurve verwendet werden. Falls die Ergebnisberechnung mit dem Computer durchgeführt wird, empfehlen wir die Berechnung mit einer „4 Parameter“-Kurvenfunktion.

XII. TYPISCHE WERTE

Die folgenden Daten dienen nur zu Demonstrationszwecken und können nicht als Ersatz für die Echtzeitstandardkurve verwendet werden.

INS-IRMA		cpm	B/T (%)
Gesamtaktivität		129481	100
Kalibrator	0,0 µIU/ml	197	0,15
	5,7 µIU/ml	529	0,41
	13,5 µIU/ml	1277	0,99
	46,0 µIU/ml	4796	3,70
	144,0 µIU/ml	16436	12,69
	440,0 µIU/ml	44090	34,05

XIII. LEISTUNGSMERKMALE UND GRENZEN DER METHODIK

A. Nachweisgrenze

Zwanzig Null-Kalibratoren wurden zusammen mit einem Satz anderer Kalibratoren gemessen.

Die Nachweisgrenze, definiert als die scheinbare Konzentration bei zwei Standardabweichungen über dem gemessenen Durchschnittswert bei Nullbindung, entsprach 1 µIU/ml.

B. Spezifität

Kreuzreaktive Hormone wurden zu einem hochwertigen Kalibrator (100 µIU/ml oder 4 ng/ml) zugegeben. Das scheinbare INS Ergebnis wurde gemessen. Wie unten angegeben, kreuzreagieren tierische Insuline (außer Ratteninsulin) während Human-, Schweine- und Rinder Proinsulin keine Kreuzreaktivität zeigen.

Zugeg. Analysat zu Serum	hochwert. Serum	Theoretische Konzent. (ng/ml)	Gemess. INS Werte (ng/ml)	Kreuzreaktivität (%)
Schweineinsulin	8 ng/ml	4,2	17,4	> 100
Rinderinsulin	8 ng/ml	3,8	17,8	> 100
Hundeinsulin	16 ng/ml	4,2	17,2	81
Kanincheninsulin	16 ng/ml	4,2	14,1	62
Ratteninsulin	16 ng/ml	3,8	3,7	0,6
Humanproinsulin	32 ng/ml	4,3	4,4	0,3
Schweineproinsulin	16 ng/ml	4,3	4,7	2,5
Rinderproinsulin	16 ng/ml	4,3	4,4	0,6

C. Präzision

INTRA ASSAY

INTER ASSAY

Serum	N	<X> ± SD (µIU/ml)	CV (%)	Serum	N	<X> ± SD (µIU/ml)	CV (%)
A	10	6,6 ± 0,1	2,1	A	20	14,4 ± 0,9	6,5
B	10	53,3 ± 0,8	1,5	B	20	100,4 ± 6,1	6,1

SD : Standardabweichung; CV: Variationskoeffizient

D. Genauigkeit

WIEDERFINDUNGSTEST

Probe	Zugeg. INS (µIU/ml)	Wiedergef. INS (µIU/ml)	Wiedergefunden (%)
Serum 1	245,0	264	107,8
Serum 2	76	73,5	96,7
Serum 3	24,5	24,4	99,6
Serum 4	6,75	6,5	96,3

VERDÜNNUNGSTEST

Probe	Verdünn.	Theoret. Konzent. (µIU/ml)	Gemess. Konzent. (µIU/ml)
Serum 1	1/1	-	101
	1/2	50,5	46
	1/4	25,3	21
	1/8	12,6	11
	1/16	6,3	6,2
Serum 2	1/1	-	328
	1/2	164	152
	1/4	82	76
	1/8	41	36
	1/16	20,5	18

Die Proben wurden mit Null-Kalibrator verdünnt.

E. Zeitverzögerung zwischen letzter Kalibrator- und Probenzugabe

Es wird im folgenden gezeigt, dass die Genauigkeit der Tests selbst dann erhalten bleibt, wenn die Probe 30 Minuten nach Zugabe des Kalibrators in die beschichteten Röhrchen zugefügt wird.

ZEITDIFFERENCE

	0' (µIU/ml)	30' (µIU/ml)
Serum 1	8	7
Serum 2	16	17
Serum 3	37	42
Serum 4	81	82

F. Hook-Effekt

Eine Probe mit INS bis zu 125.000 µIU/ml liefert höhere Messwerte als der letzte Kalibratormaßwert.

XIV. ANWENDUNGSGRENZEN

- Proben von Patienten, die Zubereitungen von monoklonalen Maus-Antikörpern zur Diagnose oder Therapie erhalten haben, können humane Anti-Maus Antikörper (HAMA) enthalten. Solche Proben können entweder falsch erhöhte oder zu niedrige Werte ergeben, wenn sie mit Testsystemen getestet werden, die monoklonale Maus Antikörper enthalten.
- Die gleiche Art von Interferenzen in der Immunoassay kann durch das Vorhandensein von Rheumafaktoren und/oder AIA (Anti-Insulin Autoantikörper) Heterophilic Antikörper induziert werden.
- Wenn die Ergebnisse nicht mit anderen klinischen Beobachtungen übereinstimmen, sollten weitere Informationen vor der Diagnosestellung ermittelt werden.

XV. INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE

- Entsprechen die Ist-Werte nicht den auf den Fläschchen angegebenen Soll-Werten, können die Werte, ohne treffende Erklärung der Abweichungen, nicht weiterverarbeitet werden.
- Falls zusätzliche Kontrollen erwünscht sind, kann jedes Labor seinen eigenen Pool herstellen, der in Aliquots eingefroren werden sollte. Erinnern Sie sich, dass zwei Gefrier-Auftau-Zyklen erlaubt sind.
- Akzeptanzkriterien für die Differenz zwischen den Resultaten der Wiederholungstests anhand der Proben müssen auf Guter Laborpraxis beruhen.

XVI. REFERENZINTERVALLE

Der Bereich des Insulinspiegels bei 55 Personen mit normalen Werten beim oralen Glukose-Toleranztest betrug 4 bis 16 µIE/ml.

Diese Werte sind nur Richtwerte; jedes Labor muss seinen eigenen Normalwertbereich ermitteln.

XVII. VORSICHTMASSNAHMEN UND WARNUNGEN

Sicherheit

Nur für diagnostische Zwecke.

Dieser Kit enthält ^{125}I (Halbwertszeit: 60 Tagen), das ionisierende X (28 keV) und γ (35.5 keV) Strahlungen emittiert.

Dieses radioaktive Produkt kann nur an autorisierte Personen abgegeben und darf nur von diesen angewendet werden; Erwerb, Lagerung, Verwendung und Austausch radioaktiver Produkte sind Gegenstand der Gesetzgebung des Landes des jeweiligen Endverbrauchers. In keinem Fall darf das Produkt an Menschen oder Tieren angewendet werden.

Der Umgang mit radioaktiven Substanzen sollte fern von Durchgangsverkehr in einem speziell ausgewiesenen Bereich stattfinden. Ein Logbuch für Protokolle und Aufbewahrung muss im Labor sein. Die Laborausstattung und die Glasbehälter, die mit radioaktiven Substanzen kontaminiert werden können, müssen ausgesondert werden, um Kreuzkontaminationen mit unterschiedlichen Radioisotopen zu verhindern. Verschüttete radioaktive Substanzen müssen sofort den Sicherheitsbestimmungen entsprechend entfernt werden. Radioaktive Abfälle müssen entsprechend den lokalen Bestimmungen und Richtlinien der für das Labor zuständigen Behörden gelagert werden. Das Einhalten der Sicherheitsbestimmungen für den Umgang mit radioaktiven Substanzen gewährleistet ausreichenden Schutz.

Die menschlichen Blutkomponenten in diesem Kit wurden mit europäischen und in USA erprobten FDA-Methoden getestet, sie waren negativ für HBsAG, anti-HCV und anti-HIV 1 und 2. Keine bekannte Methode kann jedoch vollkommene Sicherheit liefern, dass menschliche Blutbestandteile nicht Hepatitis, AIDS oder andere Infektionen übertragen. Deshalb sollte der Umgang mit Reagenzien, Serum oder Plasmaproben in Übereinstimmung mit den Sicherheitsbestimmungen erfolgen.

Alle tierischen Produkte und deren Derivate wurden von gesunden Tieren gesammelt. Komponenten von Rindern stammen aus Ländern in denen BSE nicht nachgewiesen wurde.

Trotzdem sollten Komponenten, die tierische Substanzen enthalten, als potenziell infektiös betrachtet werden.

Vermeiden Sie Hautkontakt mit den Reagenzien (Natriumazid als Konservierungsmittel). Das Azid in diesem Kit kann mit Blei oder Kupfer in den Abflussrohren reagieren und so hochexplosive Metallazide bilden. Spülen Sie während der Waschschrte den Abfluss gründlich mit viel Wasser, um die Metallazidbildung zu verhindern.

Bitte rauchen, trinken, essen Sie nicht in Ihrem Arbeitsbereich, und verwenden Sie keine Kosmetika. Pipettieren Sie nicht mit dem Mund. Verwenden Sie Schutzkleidung und Wegwerfhandschuhe.

XVIII. LITERATUR

- FLIER, J.S., KAHN, C.R. and ROTH, J. (1979).
Receptors, antireceptor antibodies and mechanisms of insulin resistance.
N. Engl. J. Med., 300; 8:413-419.
- FRIER, B.M., ASHBY, J.P., NAIRN, I.M. and BAIRS, J.D. (1981).
Plasma insulin, C-peptide and glucagon concentrations in patients with insulin-dependent diabetes treated with chlorpropamide.
Diab. Metab., 7;1:45-49.
- JUDZEWITSCH, R.G., PFEIFER, M.A., BEST, J.D., BEARD, J.C., HALTER, J.B. and PORTE D.Jr. (1982).
Chronic chlorpropamide therapy of non-insulin-dependent diabetes augments basal and stimulated insulin secretion by increasing islet sensitivity to glucose.
J.Clin. End. and Metab., 55;2:321-328.
- KOSAKA, K., HAGURA, R. and KUZUYA, T. (1977).
Insulin responses in equivocal and definite diabetes, with special reference to subjects who had mild glucose intolerance but later developed definite diabetes.
Diabetes, 26;10:944-952.
- STARR, J.I., MAKO, M.E., JUHN, D. and RUBENSTEIN, A.H. (1978).
Measurement of serum proinsulin-like material : cross-reactivity of porcine and human proinsulin in the insulin radioimmunoassay.
J. Lab. Clin. Med., 91;4:691-692.

- TEMPLE, R.C., CARRINGTON, C.A., LUZIO, S.D., OWENS, D.R., SCHNEIDER, A.E., SOBEY, W.J., HALES, C.N. (1989).
Insulin deficiency in non-insulin-dependent diabetes.
The Lancet, Feb.11:293-295.
- TEMPLE, R.C., CLARK, P.M., NAGI, D.K., SCHNEIDER, A.E., YUDKIN, J.S., HALES, C.N. (1990).
Clin. Endocrin., 32:689-693.
- TEMPLE, R.C., CLARK, P.M., HALES, C.N. (1992).
Measurement of insulin secretion in type 2 diabetes : problems and pitfalls.
Diabetic medicine, 9:503-512.
- CLARK, P. (1993)
Evaluation of Medgenix Insulin-Irma.
Addenbrooke's Hospital Cambridge, UK.

XIX. ZUSAMMENFASSUNG DES PROTOKOLLS

	GESAMT-AKTIVITÄT (ml)	KALIBRATIONEN (ml)	PROBE(N) (ml)
Kalibratoren (0-5)	-	0,05	-
Proben	-	-	0,05
Tracer	0,05	0,05	0,05
Inkubation	2 Std. bei Raumtemperatur		
Trennung	-	absaugen (oder dekant.)	
Waschlösung	-	2.0	
Trennung	-	absaugen (oder dekant.)	
Waschlösung	-	2.0	
Trennung	-	absaugen (oder dekant.)	
Gamma Counter	60 Sekunden messen		

DIASource Katalognummer : KIP1251 – KIP1254	Nummer der Originalausgabe: 200224-1
---	--

Revisionsdatum : 24/02/2020



Prima di utilizzare il kit leggere attentamente le istruzioni per l'uso

INS-IRMA

I. USO DEL KIT

Kit radioimmunologico per la determinazione quantitativa in vitro dell'insulina umana (INS) in siero.

II. INFORMAZIONI DI CARATTERE GENERALE

- A. Nome commerciale:** DIASource INS-IRMA Kit
- B. Numero di catalogo:** KIP1251: 96 test
KIP1254: 4x96 test
- C. Prodotto da:** DIASource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgio.

Per informazioni tecniche o su come ordinare il prodotto contattare:

Tel: +32 (0)10 84.99.11

Fax: +32 (0)10 84.99.91

III. INFORMAZIONI CLINICHE

A. Attività biologiche dell'insulina

L'insulina è un ormone polipeptidico con peso molecolare di 5800 dalton, secreto dalle cellule beta delle isole di Langerhans del pancreas. Possiede un ampio spettro di azioni biologiche: stimola l'uptake di glucosio da parte delle cellule e la sua ossidazione, promuove la formazione di glicogeno, la lipogenesi, la produzione di proteine e la sintesi di DNA e RNA; svolge un ruolo essenziale nella regolazione dei livelli di glucosio (inibizione della glicogenolisi epatica e stimolazione dell'utilizzazione periferica del glucosio). I suoi effetti ipoglicemizzanti sono controbilanciati da ormoni con effetto iperglicemizzante (glucagone, ormone della crescita, cortisolo, adrenalina).

La secrezione di insulina è controllata dai livelli plasmatici di glucosio: l'ipoglicemia induce un aumento immediato e sostenuto dei livelli di insulina; anche il sistema nervoso e vari fattori metabolici o ormonali (aminoacidi, glucagone, ormoni gastrointestinali) partecipano al controllo della secrezione dell'insulina.

Il diabete mellito di tipo I (insulino-dipendente o giovanile) è dovuto alla distruzione delle beta cellule con assoluto di insulina. Nel diabete mellito di tipo II (non insulino-dipendente o della maturità), la resistenza periferica all'insulina può essere causa di iperglicemia, comunque dopo alcuni anni si arriva ad un esaurimento delle beta cellule con deficit di insulina che in circa il 30% dei soggetti richiede la somministrazione di insulina. L'insulino resistenza è associata ad elevati livelli circolanti di ormone; è comunemente dovuta all'obesità. Alcune endocrinopatie (acromegalia, sindrome di Cushing), rari casi di difetti dei recettori o di auto anticorpi anti recettori sono associati con intolleranza al glucosio o a diabete mellito dovuto a insulino resistenza.

La determinazione dei livelli plasmatici di insulina è un'importante ausilio per la ricerca delle cause dell'ipoglicemia. Si trovano livelli elevati di insulina nell'insulinoma (tumore delle beta cellule). Una ipoglicemia post-prandiale funzionale può essere associata con liberazione inappropriata di insulina dopo un pasto ricco di carboidrati.

Si possono determinare i livelli di insulina sia a digiuno che dopo test dinamico:

- Test da stimolo: pasto ricco di carboidrati, test di tolleranza al glucosio (OGTT), infusione di arginina, somministrazione di tolbutamide o di altre sulfoniluree.
- Test da inibizione: digiuno, infusione di somatostatina.


B. Applicazioni cliniche del dosaggio dell'insulina

- Determinazione della funzione residua delle beta cellule con il test di tolleranza al glucosio o dopo un pasto ricco di carboidrati, come guida per una eventuale terapia sostitutiva con insulina.
- Contributo alla diagnosi differenziale di diabete mellito insulino o non insulino dipendente.
- Caratterizzazione e follow-up dell'intolleranza al glucosio.
- Diagnosi e studio dei casi di insulino resistenza.
- Diagnosi di insulinoma e di altre cause di ipoglicemia.

IV. PRINCIPIO DEL METODO

Il kit DIAsource INS-IRMA è un dosaggio immunoradiometrico con separazione coated tube. Gli anticorpi di cattura, Mabs 1, sono adsorbiti sulla superficie interna della parte inferiore di provette di polistirene. Standard e campioni hanno dapprima una bassa affinità per i Mabs 1; l'aggiunta di anticorpi di segnale Mabs 2, marcati con ^{125}I , provocano un aumento di affinità per i Mabs 1 e l'inizio della reazione immunologica. Al termine dell'incubazione la radioattività non legata alla fase solida viene allontanata mediante lavaggio. La radioattività residua è direttamente proporzionale alla concentrazione di insulina in standard e campioni. L'uso di alcuni anticorpi monoclonali diversi evita l'iperspecificità del dosaggio, frequente nei dosaggi IRMA a due siti, l'incubazione in agitazione e l'incubazione a 37°C .

V. REATTIVI FORNITI

Reattivi	Kit da 96 test	Kit da 4x96 test	Codice colore	Volume di ricostituzione			
 Provette sensibilizzate con anticorpo anti INS (anticorpi monoclonali)	2 x 48	8 x 48	Rosso scuro	Pronte per l'uso			
<table border="1" data-bbox="119 739 255 795"><tr><td>Ab</td><td>^{125}I</td></tr></table> Marcato: anti-INS (Anticorpi monoclonali) marcati con ^{125}I in tampone HEPES con BSA, sodio azide (<0,1%), EDTA e un colorante inerte rosso	Ab	^{125}I	1 flacone 5,5 ml 350 kBq	4 flaconi 5,5 ml 4 x 350 kBq	Rosso	Pronto per l'uso	
Ab	^{125}I						
<table border="1" data-bbox="103 918 231 963"><tr><td>CAL</td><td>0</td></tr></table> Calibratore zero in plasma umano, contenente timolo	CAL	0	1 flacone liofiliz.	2 flaconi liofiliz.	Giallo	Aggiungere 2 ml di acqua distillata	
CAL	0						
<table border="1" data-bbox="103 1019 231 1064"><tr><td>CAL</td><td>N</td></tr></table> Calibratore 1-5 (le concentrazioni esatte degli calibratore sono riportate sulle etichette dei flaconi), in plasma umano, contenente timolo	CAL	N	5 flaconi liofiliz.	2 x 5 flaconi liofiliz.	Giallo	Aggiungere 0,5 ml di acqua distillata	
CAL	N						
<table border="1" data-bbox="71 1198 263 1243"><tr><td>WASH</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table> Tampone di lavaggio (TRIS HCl)	WASH	SOLN	CONC	1 flacone 10 ml	4 flaconi 10 ml	Bruno	Diluire 70 x con acqua distillata usando un agitatore magnetico
WASH	SOLN	CONC					
<table border="1" data-bbox="71 1332 287 1377"><tr><td>CONTROL</td><td>N</td></tr></table> Controlli: N = 1 o 2, in plasma umano, contenente timolo	CONTROL	N	2 flaconi liofiliz.	2 x 2 flaconi liofiliz.	Argento	Aggiungere 0,5 ml di acqua distillata	
CONTROL	N						

Note: 1. Usare lo standard zero per diluire i campioni.
2. 1 μUI della preparazione standard è equivalente a 1 μUI di WHO 66/304

VI. REATTIVI NON FORNITI

Il seguente materiale è richiesto per il dosaggio ma non è fornito nel kit.

1. Acqua distillata.
2. Pipette per dispensare 50 μl , 500 μl e 2 ml (Si raccomanda di utilizzare pipette accurate con puntale in plastica monouso).
3. Agitatore tipo vortex.
4. Agitatore magnetico.
5. Pipetta a ripetizione automatica 5 ml per i lavaggi.
6. Sistema di aspirazione dei campioni (facoltativo).
7. Contatore gamma con finestra per ^{125}I (efficienza minima 70%)

VII. PREPARAZIONE DEI REATTIVI

- A. **Calibratore:** Ricostituire lo calibratore zero con 2 ml di acqua distillata e gli altri calibratore con 0,5 ml di acqua distillata.
- B. **Controlli:** Ricostituire i controlli con 0,5 ml di acqua distillata.
- C. **Soluzione di lavoro del tampone di lavaggio:** Preparare la quantità necessaria di soluzione di lavoro del tampone di lavaggio aggiungendo 69 parti di acqua distillata ad una parte di tampone di lavaggio concentrato (70 x). Usare un agitatore magnetico per rendere la soluzione omogenea. La soluzione di lavoro va scartata al termine della giornata.

VIII. CONSERVAZIONE E SCADENZA DEI REATTIVI

- I reattivi non utilizzati sono stabili a $2-8^\circ\text{C}$ fino alla data riportata su ciascuna etichetta.
- Dopo ricostituzione, calibratore e controlli sono stabili 3 giorni a $2-8^\circ\text{C}$ e, suddivisi in aliquote a -20°C per periodi più lunghi per un massimo di 3 mesi.
- La soluzione di lavoro del tampone di lavaggio deve essere preparata fresca ogni volta e usata nello stesso giorno della preparazione.
- Dopo apertura del flacone, il marcato è stabile fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta, se conservato a $2-8^\circ\text{C}$ nel flacone originale ben tappato.
- Alterazioni dell'aspetto fisico dei reattivi possono indicare una loro instabilità o deterioramento.

IX. RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

- Conservare i campioni di siero a $2-8^\circ\text{C}$.
- Se non si desidera eseguire il dosaggio entro 24 ore dal prelievo, si raccomanda di conservare i campioni a -20°C .
- Evitare ripetuti cicli di congelamento-scongelo dei campioni.
- Non usare campioni emolizzati.

X. METODO DEL DOSAGGIO

A. Avvertenze generali

Non usare il kit o suoi componenti oltre la data di scadenza. Non mescolare reattivi di lotti diversi. Prima dell'uso portare tutti i reattivi a temperatura ambiente.

Mescolare delicatamente i campioni per inversione o rotazione. Per evitare cross-contaminazioni, cambiare il puntale della pipetta ogni volta che si usi un nuovo reattivo o campione.

L'uso di pipette ben tarate e ripetibili o di sistemi di pipettamento automatici migliora la precisione del dosaggio. Rispettare i tempi di incubazione.

Allestire una curva di taratura per ogni seduta analitica, in quanto non è possibile utilizzare per un dosaggio curve di taratura di sedute analitiche precedenti.

B. Metodo del dosaggio

1. Numerare le provette sensibilizzate necessarie per dosare in duplicato ogni standard, campione o controllo. Numerare 2 provette non sensibilizzate per la determinazione dell'attività totale.
2. Agitare brevemente su vortex standard, campioni e controlli. Dispensare 50 μl di standard, campioni e controlli nelle rispettive provette.
3. Dispensare 50 μl di marcato in tutte le provette.
4. Scuotere delicatamente il portaprovette per liberare eventuali bolle d'aria intrappolate nel liquido contenuto nelle provette.
5. Incubare 2 ore a temperatura ambiente.
6. Aspirare (o decantare) il liquido contenuto in tutte le provette, tranne in quelle per l'attività totale, facendo attenzione che il puntale dell'aspiratore raggiunga il fondo delle provette e che aspiri tutto il liquido.
7. Lavare tutte le provette, tranne quelle per l'attività totale, con 2 ml di soluzione di lavoro di tampone di lavaggio, evitando di provocare la formazione di schiuma.
8. Aspirare (o decantare) il liquido contenuto in tutte le provette, tranne in quelle per l'attività totale.
9. Lavare nuovamente tutte le provette, tranne quelle per l'attività totale, con 2 ml di soluzione di lavoro di tampone di lavaggio e aspirare (o decantare).
10. Dopo il secondo lavaggio lasciare decantare le provette in posizione verticale per due minuti circa e aspirare eventuali gocce di liquido residue.
11. Contare tutte le provette per 1 minuto con il contatore gamma.

XI. CALCOLO DEI RISULTATI

1. Calcolare la media delle determinazioni in duplicato.
2. Costruire la curva di calibrazione su carta millimetrata semilogaritmica o lineare ponendo in ordinata le medie dei colpi per minuto (cpm) dei replicati degli standard e in ascissa le rispettive concentrazioni di insulina. Scartare i duplicati palesemente discordanti.
3. Determinare le concentrazioni e controlli per interpolazione sulla curva di taratura.
4. E' possibile utilizzare un sistema di interpolazione dati automatizzato.

Con un sistema automatico di interpolazione dati, utilizzare la curva a 4 parametri.

XII. CARATTERISTICHE TIPICHE

I sotto riportati sono forniti a titolo di esempio e non devono essere utilizzati per calcolare le concentrazioni di insulina in campioni e controlli al posto della curva standard, che va eseguita per ogni dosaggio.

INS-IRMA		cpm	B/T (%)
Attività totale		129481	100
Calibratore	0,0 µIU/ml	197	0,15
	5,7 µIU/ml	529	0,41
	13,5 µIU/ml	1277	0,99
	46,0 µIU/ml	4796	3,70
	144,0 µIU/ml	16436	12,69
	440,0 µIU/ml	44090	34,05

XIII. CARATTERISTICHE E LIMITI DEL METODO

A. Sensibilità

Venti replicati dello standard zero sono stati dosati insieme agli altri standard. La sensibilità, calcolata come concentrazione apparente di un campione con cpm pari alla media più 2 deviazioni standard di 20 replicati dello standard zero, è risultata essere 1 µIU/ml.

B. Specificità

Alcuni ormoni, potenzialmente in grado, di cross-reagire nel dosaggio sono stati aggiunti allo standard

100 µIU/ml (4 ng/ml). E' stata misurata la risposta apparente nel kit INS.

Come mostrato nella successiva tabella, le insuline animali, ma non l'insulina di ratto, cross-reagiscono nel dosaggio, mentre le proinsuline umana, bovina e porcina, non presentano cross-reazioni.

Analista aggiunto allo standard a valore elevato	Concentrazione teorica (ng/ml)	Valori osservati di insulina (ng/ml)	Cross-reattività (%)
Insulina porcina 8 ng/ml	4,2	17,4	> 100
Insulina bovina 8 ng/ml	3,8	17,8	> 100
Insulina di cane 16 ng/ml	4,2	17,2	81
Insulina di coniglio 16 ng/ml	4,2	14,1	62
Insulina di ratto 16 ng/ml	3,8	3,7	0,6
Proinsulina umana 32 ng/ml	4,3	4,4	0,3
Proinsulina porcina 16 ng/ml	4,3	4,7	2,5
Proinsulina bovina 16 ng/ml	4,3	4,4	0,6

C. Precisione

INTRA SAGGIO

INTER SAGGIO

Siero	N	<X> ± SD (µIU/ml)	CV (%)	Siero	N	<X> ± SD (µIU/ml)	CV (%)
A	10	6,6 ± 0,1	2,1	A	20	14,4 ± 0,9	6,5
B	10	53,3 ± 0,8	1,5	B	20	100,4 ± 6,1	6,1

SD : Deviazione Standard; CV: Coefficiente di Variazione

D. Accuratezza

TEST DI DILUIZIONE

Campione	Diluizione	Concentrazione teorica (µIU/ml)	Concentrazione misurata (µIU/ml)
Siero 1	1/1	-	101
	1/2	50,5	46
	1/4	25,3	21
	1/8	12,6	11
	1/16	6,3	6,2
	Siero 2	1/1	-
1/2		164	152
1/4		82	76
1/8		41	36
1/16		20,5	18

I campioni sono stati diluiti con calibratore zero.

TEST DI RECUPERO

Campione	Insulina aggiunta (µIU/ml)	Insulina recuperata (µIU/ml)	Recupero (%)
Siero 1	245,0	264	107,8
Siero 2	76	73,5	96,7
Siero 3	24,5	24,4	99,6
Siero 4	6,75	6,5	96,3

E. Tempo trascorso tra l'aggiunta dell'ultimo calibratore e il campione

Come mostrato nella seguente tabella, il dosaggio si mantiene accurato anche quando un campione viene aggiunto nelle provette sensibilizzate 30 minuti dopo l'aggiunta del calibratore.

TEMPO TRASCORSO

	0' (µIU/ml)	30' (µIU/ml)
Siero 1	8	7
Siero 2	16	17
Siero 3	37	42
Siero 4	81	82

E. Effetto hook

Un campione ha cui è stata aggiunta insulina fino a 125.000 µIU/ml ha cpm superiori a quello dello standard più concentrato.

XIV. LIMITAZIONI

- Campioni di pazienti che abbiano assunto preparazioni a base di anticorpi monoclonali murini a scopo diagnostico o terapeutico potrebbero contenere anticorpi umani antimurini (HAMA). Tali campioni, quando testati con metodiche basate sull'impiego di anticorpi monoclonali murini, potrebbero produrre valori falsamente elevati o ridotti.
- Lo stesso tipo di interferenze nel dosaggio immunologico può essere indotta dalla presenza di anticorpi eterofili, fattori reumatoidi e/o AIA (autoanticorpi anti-insulina).
- Qualora i risultati non fossero in linea con le altre osservazioni cliniche si renderà necessaria la raccolta di ulteriori informazioni prima della formulazione di una diagnosi.

XV. CONTROLLO DI QUALITA' INTERNO

- Se i risultati ottenuti dosando il Controllo 1 e il Controllo 2 non sono all'interno dei limiti riportati sull'etichetta dei flaconi, non è opportuno utilizzare i risultati ottenuti per i campioni, a meno che non si trovi una giustificazione soddisfacente.
- Ogni laboratorio può preparare un proprio pool di sieri da utilizzare come controllo, da conservare congelato in aliquote. Non congelare e scongelare un'aliquota più di due volte.
- I criteri di accettazione delle differenze tra i risultati in duplicato dei campioni devono basarsi sulla buona prassi di laboratorio.

XVI. INTERVALLI DI RIFERIMENTO

L'intervallo dei livelli di insulina in 55 soggetti con test di tolleranza al glucosio orale normale è risultato essere pari a 4 - 16 µIU/ml.

Questi valori sono puramente indicativi, per cui ciascun laboratorio potrà stabilire i propri intervalli normali.

XVII. PRECAUZIONI PER L'USO

Sicurezza

Il kit è solo per uso diagnostico in vitro.

Il kit contiene ¹²⁵I (emivita: 60 giorni) emettente raggi X (28 keV) e γ (35,5 keV) ionizzanti.

L'acquisto, a detenzione, l'utilizzo e il trasporto di materiale radioattivo sono soggetti a regolamentazione locale. In nessun caso il prodotto può essere

somministrato ad esseri umani o animali.

Usare sempre guanti e camici da laboratorio quando si manipola materiale radioattivo. Le sostanze radioattive devono essere conservate in propri contenitori in appositi locali che devono essere interdetti alle persone non autorizzate. Deve essere tenuto un registro di carico e scarico del materiale radioattivo. Il materiale di laboratorio e la vetreria deve essere dedicato all'uso di isotopi specifici per evitare cross-contaminazioni.

In caso di contaminazione o dispersione di materiale radioattivo, fare riferimento alle norme locali di radioprotezione. I rifiuti radioattivi devono essere smaltiti secondo le norme locali di radioprotezione. Lo scrupoloso rispetto delle norme per l'uso di sostanze radioattive fornisce una protezione adeguata agli utilizzatori.

I reattivi di origine umana presenti nel kit sono stati dosati con metodi approvati da organismi di controllo europei o da FDA e si sono rivelati negativi per HBs Ag, anti HCV, anti HIV1 e anti HIV2. Non sono disponibili metodi in grado di offrire la certezza assoluta che derivati da sangue umano non possano provocare epatiti, AIDS o trasmettere altre infezioni. Manipolare questi reattivi o i campioni di siero o plasma secondo le procedure di sicurezza vigenti.

Tutti i prodotti di origine animale o loro derivati provengono da animali sani. I componenti di origine bovina provengono da paesi dove non sono stati segnalati casi di BSE. E' comunque necessario considerare i prodotti di origine animale come potenziali fonti di infezioni.

Evitare ogni contatto dell'epidermide con i reattivi contenenti sodio azide come conservante. La sodio azide può reagire con piombo rame o ottone presenti nelle tubature di scarico per formare metallo-azidi esplosive. Smaltire questi reattivi facendo scorrere abbondante acqua negli scarichi.

Nei luoghi dove si usano sostanze radioattive non è consentito consumare cibi o bevande, fumare o usare cosmetici. Non pipettare i reattivi con pipette a bocca.

XVIII. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- FLIER, J.S., KAHN, C.R. and ROTH, J. (1979).
Receptors, antireceptor antibodies and mechanisms of insulin resistance.
N. Engl. J. Med., 300; 8:413-419.
- FRIER, B.M., ASHBY, J.P., NAIRN, I.M. and BAIRS, J.D. (1981).
Plasma insulin, C-peptide and glucagon concentrations in patients with insulin-dependent diabetes treated with chlorpropamide.
Diab. Metab., 7;1:45-49.
- JUDZEWITSCH, R.G., PFEIFER, M.A., BEST, J.D., BEARD, J.C., HALTER, J.B. and PORTE D.Jr. (1982).
Chronic chlorpropamide therapy of non-insulin-dependent diabetes augments basal and stimulated insulin secretion by increasing islet sensitivity to glucose.
J.Clin. End. and Metab., 55;2:321-328.
- KOSAKA, K., HAGURA, R. and KUZUYA, T. (1977).
Insulin responses in equivocal and definite diabetes, with special reference to subjects who had mild glucose intolerance but later developed definite diabetes.
Diabetes, 26;10:944-952.
- STARR, J.I., MAKO, M.E., JUHN, D. and RUBENSTEIN, A.H. (1978).
Measurement of serum proinsulin-like material : cross-reactivity of porcine and human proinsulin in the insulin radioimmunoassay.
J. Lab. Clin. Med., 91;4:691-692.
- TEMPLE, R.C., CARRINGTON, C.A., LUZIO, S.D., OWENS, D.R., SCHNEIDER, A.E., SOBEY, W.J., HALES, C.N. (1989).
Insulin deficiency in non-insulin-dependent diabetes.
The Lancet, Feb.11:293-295.
- TEMPLE, R.C., CLARK, P.M., NAGI, D.K., SCHNEIDER, A.E., YUDKIN, J.S., HALES, C.N. (1990).
Clin. Endocrin., 32:689-693.
- TEMPLE, R.C., CLARK, P.M., HALES, C.N. (1992).
Measurement of insulin secretion in type 2 diabetes : problems and pitfalls.
Diabetic medicine, 9:503-512.
- CLARK, P. (1993)
Evaluation of Medgenix Insulin-Irma.
Addenbrooke's Hospital Cambridge, UK.

XIX. SCHEMA DEL DOSAGGIO

	Attività totale µl	Calibratore µl	Campioni Controlli µl
Calibratore (0 - 5) Campioni, controlli Marcato	- - 50	50 - 50	- 50 50
Incubazione	2 ore a temperatura ambiente		
Separazione Soluzione di lavoro tampone di lavaggio Separazione Soluzione di lavoro tampone di lavaggio Separazione	Aspirare 2 ml Aspirare 2 ml Aspirare		
Conteggio	Contare le provette per 1 minuto		

Numero di catalogo di DIAsource : KIP1251 – KIP1254	Revisione numero : 200224-1
--	--------------------------------

Data di revisione : 24/02/2020

Leer el protocolo completo antes de usar.

INS-IRMA

I. INSTRUCCIONES DE USO

Radioinmunoensayo para la determinación cuantitativa in vitro de la Insulina (INS) humana en suero.

II. INFORMACIÓN GENERAL

- A. Nombre:** DIAsource INS-IRMA Kit
- B. Número de Catálogo:** KIP1251 : 96 tests
KIP1254 : 4x96 test
- C. Fabricado por:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

Para cuestiones técnicas y información sobre pedidos contactar:

Tel : +32 (0)10 84.99.11

Fax : +32 (0)10 84.99.91

III. INFORMACIÓN CLÍNICA

A. Actividades Biológicas de insulina

Insulina, una hormona polipéptica con un peso molecular de 5800, es segregada por las células beta de los islotes de Langerhans del páncreas. Insulina efectúa muchas actividades biológicas. Estimula el consumo celular de glucosa, la oxidación de glucosa, la glicogénesis, la lipogénesis, la proteogénesis y la formación de DNA y RNA. Insulina desempeña un papel importante en la regulación de los niveles de glucosa en plasma (inhibición del output hepático, estímulo del uso periférico de glucosa). Los efectos hipoglucémicos de insulina son compensados por hormonas con efectos hiperglucémicos (glucagon, hormona de crecimiento, cortisol, epinefrina). La segregación de insulina es controlada principalmente por los niveles de glucosa en plasma: hiperglucemia induce una elevación inmediata y importante en los niveles de insulina circulando. Influencias nerviosas, así como varios factores metabólicos y hormonales (aminoácidos, glucagon, hormona gastrointestinal) participan en el control de la segregación de insulina. Diabetes tipo I (dependiendo de insulina "juvenil") se debe a la destrucción de las células beta, resultando en una falta absoluta de insulina. En diabetes tipo II (no dependiendo de insulina "comienzo de la madurez") la resistencia a la insulina puede desempeñar un papel importante; sin embargo es posible que ocurre una disfunción de las células beta después de algunos años de evolución, causando una insulinopenia que requiere a veces la administración de insulina. La resistencia a la insulina guarda relación con niveles altos de circulación de la hormona. Obesidad constituye el caso más frecuente de resistencia a la insulina. Varias endocrinopatías (acromegalia, síndrome de Cushing) así como los casos escasos de defectos del receptor de insulina o casos con anticuerpos contra el receptor de insulina guardan relación con la intolerancia para glucosa o incluso con diabetes causado por resistencia a la insulina. La determinación de los niveles de insulina en plasma es un parámetro importante para el diagnóstico de la hipoglucemia. Los niveles de insulina están altos en caso de insulinoma (tumor de las células beta). La hipoglucemia funcional postprandial también puede guardar relación con una liberación inadaptada al consumo de hidratos de carbono. Los niveles de insulina se determinan en ayunas o durante un test dinámico:

- a) test de estímulo: una comida rica en hidratos de carbono, test de tolerancia para glucosa oral (OGTT), infusión de arginina, tolbutamida o otra administración sulfonilurea.
- b) test de inhibición: dieta, infusión de somatostatina.



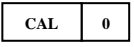
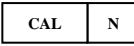


B. Aplicación clínica de la determinación de insulina

- . Determinación de la reserva de las células beta durante el test de tolerancia para glucosa o después de una comida rica en hidratos de carbono, como referencia para la implantación de la terapia con insulina;
- . Contribución en la diagnosis de diabetes dependiendo o no dependiendo de insulina;
- . Caracterización y observación de los estados de intolerancia para glucosa;
- . Diagnosis y análisis de casos de resistencia a la insulina;
- . Diagnosis de insulinoma y otros casos de hipoglucemia.

IV. PRINCIPIOS DEL MÉTODO

INS-Irma de DIAsource es un radioinmunoensayo basado en la separación en tubo recubierto de anticuerpos. Mabs1, los anticuerpos de captura, se adhieren en la parte interior inferior de las paredes del tubo de poliestireno. Al principio calibradores o muestras añadidos en los tubos presentarán poca afinidad con Mabs1. La adición de Mab2, el anticuerpo señal marcado con ¹²⁵I, completará el sistema y activará la reacción inmunológica. Después del lavado, la radiactividad restante adherida al tubo, refleja la concentración del antígeno. El uso de varios Mabs distintos evita hiperespecificidad, propio del IRMA de dos-puntos, y el uso de un agitador o la incubación a 37°C.

V. REACTIVOS SUMINISTRADOS

Reactivos	96 test Kit	4x96 test Kit	Código de Color	Reconstitución
 Tubos recubiertos con anti-INS (anticuerpos monoclonales)	2 x 48	8 x 48	rojo oscuro	Listo para uso
 TRAZADOR: anti-INS (anticuerpos monoclonales) marcado con I125 en tampón HEPES con albúmina bovina, azida (<0.1%), EDTA y un colorante rojo inerte	1 vial 5.5 ml 350 kBq	4 viales 5.5 ml 350 kBq	rojo	Listo para uso
 Calibrador cero en plasma humano y thymol	1 vial liofilizado	2 viales lío filizados	amarillo	Añadir 2 ml de agua destilada
 Calibradores N = 1 a 5 (mirar los valores exactos en las etiquetas) en plasma humano y thymol	5 viales lío filizados	2 x 5 viales lío filizados	amarillo	Añadir 0,5 ml de agua destilada
 Solución de lavado (Tris-HCl)	1 vial 10 ml	4 viales 10 ml	marrón	Diluir 70 x con agua destilada (utilizar agitador magnético)
 Controles - N = 1 o 2 en plasma humano y thymol	2 viales lío filizados	2 x 2 viales lío filizados	plateado	Añadir 0,5 ml de agua destilada

Nota: 1. Para diluciones de muestras utilizar estándar cero.
2. 1 µUI de la preparación del calibrador es equivalente a 1 µUI de WHO 66/304.

VI. MATERIAL NO SUMINISTRADO

El material mencionado a continuación es necesario y no está incluido en el kit

1. Agua destilada
2. Pipetas de 50µl, 500µl y 2 ml (Se recomienda el uso de pipetas precisas con puntas desechables de plástico)
3. Vortex
4. Agitador magnético
5. Jeringa automática 5 ml (tipo Cornwall) para el lavado
6. Sistema de aspiración (opcional)
7. Contador de radiaciones gamma para medir I¹²⁵ (mínima eficiencia 70%)

VII. PREPARACIÓN DE REACTIVOS

A. Calibradores: Reconstituir el calibrador cero con 2,0 ml de agua destilada y otros calibradores con 0,5 ml de agua destilada.
B. Controles: Reconstituir los controles con 0,5 ml de agua destilada.
C. Solución de lavado de trabajo: Preparar el volumen necesario de Solución de lavado de trabajo mezclando 69 partes de agua destilada por 1 parte de Solución de lavado (70x). Utilizar un agitador magnético para homogeneizar. Desechar la solución de lavado de trabajo no utilizada al final del día.

VIII. ALMACENAJE Y CADUCIDADES DE LOS REACTIVOS

- Antes de abrir ó reconstituir todos los componentes de los kits son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta, si se guardan a 2-8°C.
- Después de su reconstitución los calibradores y controles son estables durante 3 días a 2-8°C. Para periodos más largos, alcuotar y guardar a -20°C para un máximo de 3 meses.
- La solución de lavado de trabajo recién preparada solo debe utilizarse en el mismo día.
- Después del primer uso, el trazador es estable hasta la fecha de caducidad, si se guarda en el vial original cerrado a 2-8°C.
- Las alteraciones de los reactivos en el aspecto físico pueden indicar inestabilidad ó deterioro.

IX. RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

- Las muestras de suero deben ser guardadas a 2-8°C.
- Si el ensayo no se realiza en 24 hrs., almacenar las muestras a -20°.
- Evitar congelar y descongelar sucesivamente.
- No utilizar muestras hemolíticas.

X. PROTOCOLO

A. Notas de manejo

No utilizar el kit ó componentes después de la fecha de caducidad. No mezclar reactivos de diferente número de lote. Llevar todos los reactivos a temperatura ambiente antes de su uso.
Agitar minuciosamente todos los reactivos y muestras, agitándolos o girándolos suavemente. Con el fin de evitar ninguna contaminación utilizar puntas de pipetas desechables y limpias para la adición de cada reactivo y muestra.
El uso de pipetas de precisión ó equipamiento de dispensación automática mejorara la precisión. Respetar los tiempos de incubación.
Preparar la curva de calibración en cada ensayo, no utilizar los datos de un ensayo previo.

B. Protocolo

1. Marcar los tubos recubiertos por duplicado para cada uno de los estándares, muestras y controles. Para la determinación de las Cuentas Totales, marcar 2 tubos normales.
2. Agitar brevemente los calibradores, muestras y controles y dispensar 50 µl de cada uno en sus respectivos tubos.
3. Dispensar 50 µL del trazador en cada tubo, incluyendo los tubos correspondientes a las Cuentas Totales.
4. Agitar suavemente la gradilla de tubos para soltar cualquier burbuja adherida a las paredes de los tubos.
5. Incubar durante 2 horas a temperatura ambiente.
6. Aspirar (o decantar) el contenido de cada tubo (excepto los de Cuentas Totales). Asegurarse que la punta de la pipeta de aspiración toca el fondo del tubo con el fin de aspirar todo el líquido.
7. Lavar los tubos con 2 ml de Solución de lavado de trabajo (excepto los de Cuentas Totales) y aspirar (o decantar). Evitar la formación de espuma durante la adición de la Solución de lavado.
8. Aspirar (o decantar) el contenido de cada tubo (excepto los de Cuentas Totales)
9. Lavar de nuevo con 2 ml de Solución de lavado de trabajo (excepto los de Cuentas Totales) y aspirar (o decantar).
10. Después del último lavado, dejar los tubos en posición inversa durante 2 minutos y aspirar el líquido restante.
11. Medir la actividad de cada tubo durante 60 segundos en un Contador Gamma.

XI. CALCULO DE RESULTADOS

1. Calcular la media de los duplicados.
2. Representar en un gráfico semilogarítmico o lineal las c.p.m. (ordenada) para cada calibrador frente a las concentraciones de INS (abscisa) y dibujar una curva de calibración por los puntos de calibración, rechazando los extremos claros.
3. Leer la concentración para cada control y muestra por interpolación en la curva de calibración.
4. Métodos computarizados de computación de resultados pueden ser utilizados para la construcción de la curva de calibración. Si se utiliza un sistema automático de cálculo de resultados, se recomienda usar la representación gráfica "4 parámetros".

XII. EJEMPLO DE RESULTADOS

Los datos mostrados a continuación sirven como ejemplo y nunca deberán ser usados como una calibración real.

INS-IRMA		cpm	B/T (%)
Cuentas Totales		129481	100
Calibrador	0,0 µUI/ml	197	0,15
	5,7 µUI/ml	529	0,41
	13,5 µUI/ml	1277	0,99
	46,0 µUI/ml	4796	3,70
	144,0 µUI/ml	16436	12,69
	440,0 µUI/ml	44090	34,05

XIII. REALIZACIÓN Y LIMITACIONES

A. Limite de detección

Veinte calibradores cero fueron medidos en una curva con otros calibradores.

El límite de detección, definido como la concentración aparente resultante de dos desviaciones estándares sobre la media de enlace del calibrador cero, fue de 1 µUI/ml.

B. Especificidad

Hormonas con reacción cruzada se añadieron a un calibrador con un valor elevado (100 µUI/ml o 4 ng/ml). La respuesta aparente fue medida.

Como se demuestra más abajo, las insulinas animales (excepto insulina de rata) presentan una reacción cruzada y proinsulinas humanas, bovinas y de cerdo no presentan una reacción cruzada.

Componente añadido a un suero con un valor elevado		Concent. Teórica (ng/ml)	Concent. Medida (ng/ml)	Reacción-cruzada (%)
Insulina de cerdo	8 ng/ml	4,2	17,4	> 100
Insulina bovina	8 ng/ml	3,8	17,8	> 100
Insulina de perro	16 ng/ml	4,2	17,2	81
Insulina de conejo	16 ng/ml	4,2	14,1	62
Insulina de rata	16 ng/ml	3,8	3,7	0,6
Proinsulina humana	32 ng/ml	4,3	4,4	0,3
Proinsulina de cerdo	16 ng/ml	4,3	4,7	2,5
Proinsulina bovina	16 ng/ml	4,3	4,4	0,6

C. Precisión

PRECISIÓN INTRA-ENSAYO

PRECISIÓN INTER-ENSAYO

Suero	N	<X> ± SD (µUI/ml)	CV (%)	Suero	N	<X> ± SD (µUI/ml)	CV (%)
A	10	6,6 ± 0,1	2,1	A	20	14,4 ± 0,9	6,5
B	10	53,3 ± 0,8	1,5	B	20	100,4 ± 6,1	6,1

SD : Desviación Estándar; CV: Coeficiente de Variación

D. Exactitud

TEST DILUCIÓN

Muestra	Dilución	Concent. Teórica (µUI/ml)	Concent. Medida (µUI/ml)
Suero 1	1/1	-	101
	1/2	50,5	46
	1/4	25,3	21
	1/8	12,6	11
	1/16	6,3	6,2
Suero 2	1/1	-	328
	1/2	164	152
	1/4	82	76
	1/8	41	36
	1/16	20,5	18

Las muestras fueron diluidas con el calibrador cero.

TEST DE RECUPERACIÓN

Muestra	INS añadido (µUI/ml)	INS Recuperado (µUI/ml)	Recuperado (%)
Suero 1	245,0	264	107,8
Suero 2	76	73,5	96,7
Suero 3	24,5	24,4	99,6
Suero 4	6,75	6,5	96,3

E. Tiempo de espera entre la dispensación del último calibrador y la de la muestra

Como se muestra a continuación la precisión del ensayo se mantiene incluso en el caso de dispensar la muestra 30 minutos después de haberse adicionado el calibrador a los tubos recubiertos.

TIEMPO DE ESPERA

Suero (µUI/ml)	0'	30'
Suero 1	8	7
Suero 2	16	17
Suero 3	37	42
Suero 4	81	82

F. Efecto "hook"

Una muestra dopada con INS hasta 125000 µUI/ml presenta cuentas más elevadas que el último punto de calibración.

XIV. LIMITACIONES

- Es posible que las muestras de pacientes que han recibido preparaciones de anticuerpos monoclonales de ratón para diagnóstico o terapia, puedan contener anticuerpos humanos anti ratón (HAMA). Los resultados de estas muestras analizadas con kits que utilizan anticuerpos monoclonales de ratón, pueden dar valores falsamente aumentados o disminuidos.
- El mismo tipo de interferencias en el inmunoanálisis puede ser inducido por la presencia de anticuerpos heterofílicos, factores reumatoideos o AIA (autoanticuerpos anti-insulina).
- Si los resultados no concuerdan con otras observaciones clínicas, será necesario obtener información adicional antes de hacer un diagnóstico.

XV. CONTROL DE CALIDAD INTERNO

- Si los resultados obtenidos para el Control 1 y/o Control 2 no están dentro del rango especificado en la etiqueta del vial, los resultados obtenidos no podrán ser utilizados a no ser que se pueda dar una explicación convincente de dicha discrepancia
- Si es conveniente, - cada laboratorio puede utilizar sus propios pools de controles, los cuales se guardan en alícuotas congeladas. No congelar y descongelar más de dos veces.
- Los criterios de aceptación de la diferencia entre los resultados de los duplicados de las muestras se apoyan en las prácticas de laboratorio corrientes.

XVI. INTERVALOS DE REFERENCIA

Los niveles de insulina en 55 individuos con ensayos de tolerancia para glucosa, normales fueron de 4 a 16 µUI/ml.

Estos valores solamente sirven de pauta; cada laboratorio tiene que establecer sus propios valores normales.

XVII. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

Seguridad

Para uso solo en diagnóstico in vitro.

Este kit contiene I¹²⁵ (vida media : 60 días) emisor de rayos X (28 keV) y de rayos γ (35,5 keV) ionizantes.

Este producto radiactivo solo puede ser manejado y utilizado por personas autorizadas; la compra, almacenaje, uso y cambio de productos radiactivos están

sujetos a la legislación del país del usuario. En ningún caso el producto deberá ser suministrado a humanos y animales.

Todo el manejo de producto radiactivo se hará en una área señalizada, diferente de la de paso regular. Deberá de utilizarse un libro de registros de productos radiactivos utilizados. El material de laboratorio, vidrio que podría estar contaminado radiactivamente deberá de descontaminarse para evitar la contaminación con otros isótopos.

Cualquier derramamiento radiactivo deberá ser limpiado de inmediato de acuerdo con los procedimientos de seguridad. Los desperdicios radiactivos deberán ser almacenados de acuerdo con las regulaciones y normativas vigentes de la legislación a la cual pertenezca el laboratorio. El ajustarse a las normas básicas de seguridad radiológica facilita una protección adecuada.

Los componentes de sangre humana utilizados en este kit han sido testados por métodos aprobados por la CEE y/ó la FDA dando negativo a HBsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 y 2. No se conoce ningún método que asegure que los derivados de la sangre humana no transmitan hepatitis, SIDA ó otras infecciones. Por lo tanto el manejo de los reactivos y muestras se hará de acuerdo con los procedimientos de seguridad locales.

Todos los productos animales y derivados han sido obtenidos a partir de animales sanos. Componentes bovinos originales de países donde BSE no ha sido informado. Sin embargo, los componentes conteniendo sustancias animales deberán ser consideradas como potencialmente infecciosas.

Evitar cualquier contacto de los reactivos con la piel (azida sódica como conservante). La azida en este kit puede reaccionar con el plomo y cobre de las cañerías y producir azidas metálicas altamente explosivas. Durante el proceso de lavado, hacer circular mucha cantidad de agua por el sumidero para evitar el almacenamiento de la azida.

No fumar, beber, comer ó utilizar cosméticos en el área de trabajo. No pipetear con la boca. Utilizar ropa de protección y guantes.

XIX. RESUMEN DEL PROTOCOLO

	CUENTAS TOTALES (µl)	CALIBRADO RES (µl)	MUESTRA(S) CONTROL(S) (µl)
Calibradores (0 al 5)	-	50	-
Muestras, controles	-	-	50
Trazador	50	50	50
Incubación	2 horas a T.A.		
Separación	-		aspirar
Solución de Lavado	-		2,0 ml
Separación	-		aspirar
Solución de Lavado	-		2,0 ml
Separación	-		aspirar
Contaje	Contar los tubos durante 60 segundos		

DIAsource Catalogo Nr : KIP1251 – KIP1254	Revisión nr : 200224-1
--	---------------------------

XVIII. BIBLIOGRAFIA

Fecha de la revisión : 24/02/2020

- FLIER, J.S., KAHN, C.R. and ROTH, J. (1979).
Receptors, antireceptor antibodies and mechanisms of insulin resistance.
N. Engl. J. Med., 300; 8:413-419.
- FRIER, B.M., ASHBY, J.P., NAIRN, I.M. and BAIRS, J.D. (1981).
Plasma insulin, C-peptide and glucagon concentrations in patients with insulin-dependent diabetes treated with chlorpropamide.
Diab. Metab., 7:1:45-49.
- JUDZEWITSCH, R.G., PFEIFER, M.A., BEST, J.D., BEARD, J.C., HALTER, J.B. and PORTE D.Jr. (1982).
Chronic chlorpropamide therapy of non-insulin-dependent diabetes augments basal and stimulated insulin secretion by increasing islet sensitivity to glucose.
J.Clin. End. and Metab., 55:2:321-328.
- KOSAKA, K., HAGURA, R. and KUZUYA, T. (1977).
Insulin responses in equivocal and definite diabetes, with special reference to subjects who had mild glucose intolerance but later developed definite diabetes.
Diabetes, 26;10:944-952.
- STARR, J.I., MAKO, M.E., JUHN, D. and RUBENSTEIN, A.H. (1978).
Measurement of serum proinsulin-like material : cross-reactivity of porcine and human proinsulin in the insulin radioimmunoassay.
J. Lab. Clin. Med., 91;4:691-692.
- TEMPLE, R.C., CARRINGTON, C.A., LUZIO, S.D., OWENS, D.R., SCHNEIDER, A.E., SOBEY, W.J., HALES, C.N. (1989).
Insulin deficiency in non-insulin-dependent diabetes.
The Lancet, Feb.11:293-295.
- TEMPLE, R.C., CLARK, P.M., NAGI, D.K., SCHNEIDER, A.E., YUDKIN, J.S., HALES, C.N. (1990).
Clin. Endocrin., 32:689-693.
- TEMPLE, R.C., CLARK, P.M., HALES, C.N. (1992).
Measurement of insulin secretion in type 2 diabetes : problems and pitfalls.
Diabetic medicine, 9:503-512.
- CLARK, P. (1993)
Evaluation of Medgenix Insulin-Irma.
Addenbrooke's Hospital Cambridge, UK.

Leia todo o protocolo antes de utilizar.

INS-IRMA

I. UTILIZAÇÃO PREVISTA

Kit para ensaio Imunoradiométrico para a determinação quantitativa in vitro da insulina humana (INS) no soro.

II. INFORMAÇÃO GERAL

- A. Nome do proprietário :** Kit DIASource INS-IRMA
- B. Nº de catálogo :** KIP1251 : 96 testes
KIP1254 : 4 x 96 testes
- C. Produzido por :** DIASource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

Para assistência técnica ou encomendas, contacte:
Tel : +32 (0)10 84 99 11 - Fax : +32 (0)10 84 99 91

III. FUNDAMENTAÇÃO CLÍNICA

A. Atividades biológicas da insulina

A Insulina é uma hormona polipeptídica com um peso molecular de 5800 KD, segregada pelas células beta dos ilhéus de Langerhans situados no pâncreas. A Insulina possui um espectro amplo de acções biológicas. Estimula a captação celular de glicose, a oxidação da glicose, a glicogénese, lipogénese, proteogénese e a formação de DNA e de RNA. A Insulina desempenha um papel chave na regulação dos níveis plasmáticos da glicose (inibição da libertação hepática, estimulação da utilização periférica de glicose). Os efeitos hipoglicémicos resultantes da insulina são contrabalançados por hormonas com efeitos hiperglicémiantes (glucagão, hormona do crescimento, cortisol, epinefrina). A secreção de Insulina é largamente controlada pelos níveis plasmáticos de glicose: a hiperglicémia induz um aumento rápido e importante dos níveis circulantes de insulina. As influências neuronais, bem como vários factores hormonais e metabólicos (aminoácidos, glucagão, hormona gastrointestinal) também participam no controlo da secreção da insulina. A diabetes Tipo I (insulino-dependente: "juvenil") deve-se à destruição das células beta, tendo por consequência a ausência absoluta de insulina. Na diabetes tipo II (não-insulina-dependente: "início na maturidade"), a resistência à insulina pode desempenhar um papel importante; contudo, após vários anos de evolução, pode ocorrer a falha das células beta, com insulinopenia e em certos casos é necessária a administração de insulina. A resistência à Insulina é associada com níveis circulantes elevados da hormona. O caso mais comum de resistência à insulina é representado pela obesidade. Várias endocrinopatias (acromegalia, síndrome de Cushing), bem como casos raros de defeitos ao nível dos receptores ou casos com anticorpos anti-insulina, são associados com intolerância à glicose ou até diabetes devidos a resistência à glicose. A determinação dos níveis plasmáticos de insulina é um parâmetro importante no diagnóstico de hipoglicémia. Os níveis de Insulina são elevados em casos de insulinoma (tumor das células beta). A hipoglicemia funcional pós-prandial pode também estar associada com libertação inapropriada insulina depois de ingestão de hidratos de carbono. Os níveis de Insulina são determinados quer por estado de jejum, quer por teste dinâmico.

- teste de estimulação: refeição rica em hidratos de carbono, teste de tolerância oral à glicose (OGTT), infusão de arginina, tolbutamida ou administração de outras sulfonilureias.
- teste de inibição: jejum, infusão de somatostatina


B. Aplicação clínica da determinação da insulina:

- Determinação da reserva de células beta durante o teste de tolerância oral à glicose ou depois de uma refeição rica em hidratos de carbono, como um indicador para a instauração de terapêutica com insulina
- Contribuição para o diagnóstico de diabetes tipo I ou II
- Caracterização e monitorização de estados de intolerância à glicose.
- Diagnóstico e estudo de casos de resistência à insulina

IV. PRINCÍPIOS DO MÉTODO

O DIAsource INS-Irma é um ensaio imunoradiométrico baseado na separação em tubo revestido. Os Mabs1, capturadores de anticorpos (Ac), são ligados à superfície interna inferior, do tubo de plástico. Os calibradores ou amostras adicionados aos tubos vão inicialmente, demonstrar baixa afinidade para o Mabs1. A adição do Mab2, o anticorpo de sinal, marcado com ¹²⁵I, vai completar o sistema e despoletar a reacção imunológica. Depois da lavagem, a actividade radioactiva remanescente ligada ao tubo, reflecte a concentração de antigénio (Ag). A utilização de vários Acs diferentes evita a hiperespecificidade, comum aos IRMA de 2 locais, bem como a utilização de um agitador ou incubação a 37°C.

V. REAGENTES FORNECIDOS

Reagentes	Kit 96 testes	Kit 4x96 testes	Código de cor	Reconstituição			
 Tubos revestidos com anti INS (Acs monoclonais)	2 x 48	8 x 48	Vermelho escuro	Pronto a utilizar			
<table border="1" data-bbox="108 728 247 772"> <tr> <td>Ab</td> <td>¹²⁵I</td> </tr> </table> Marcador: anti-INS marcado com ¹²⁵ I (Acs monoclonais) em tampão HEPES com soro bovino, albumina, azida (<0.1%), EDTA e corante inerte	Ab	¹²⁵ I	1 recipiente 5.5 ml 350 kBq	4 recipientes 5.5 ml 350 kBq	vermelho	Pronto a utilizar	
Ab	¹²⁵ I						
<table border="1" data-bbox="108 929 247 974"> <tr> <td>CAL</td> <td>0</td> </tr> </table> Calibrador Zero em plasma humano e timol	CAL	0	1 recipiente liofilizado	2 recipientes liofilizados	amarelo	Adicione 2.0 ml de água destilada	
CAL	0						
<table border="1" data-bbox="108 1019 247 1064"> <tr> <td>CAL</td> <td>N</td> </tr> </table> Calibrador - N = 1 a 5 (ver valores exactos nos rótulos dos recipientes) em plasma humano e timol	CAL	N	5 recipientes liofilizados	2 x 5 recipientes liofilizados	amarelo	Adicione 0.5 ml de água destilada	
CAL	N						
<table border="1" data-bbox="108 1176 263 1220"> <tr> <td>WASH</td> <td>SOLN</td> <td>CONC</td> </tr> </table> Solução de lavagem (Tris-HCl)	WASH	SOLN	CONC	1 recipiente 10 ml	4 recipientes 10 ml	castanho	Dilua 70 x com água destilada (use um agitador magnético).
WASH	SOLN	CONC					
<table border="1" data-bbox="108 1288 247 1332"> <tr> <td>CONTROL</td> <td>N</td> </tr> </table> Controlos - N = 1 ou 2 Em plasma humano e timol	CONTROL	N	2 recipientes liofilizados	2 x 2 recipientes liofilizados	prateado	Adicione 0.5 ml de água destilada	
CONTROL	N						

Note: 1. Use o calibrador zero para diluições da Amostra.
2. 1 µIU da preparação padrão é equivalente a 1 µIU do OMS 66/304.

VI. MATERIAL NÃO FORNECIDO

O seguinte material é necessário, mas não fornecido com o kit :

- Água destilada
- Pipetas automáticas de: 50 µl, 500 µl e 2 ml (recomenda-se o uso de pipetas adequadas com pontas descartáveis)
- Misturador vortex
- Agitador magnético
- Seringa automática de 5 ml (tipo Cornwall) para lavagem
- Sistema de aspiração (opcional)
- Qualquer contador gama com capacidade para medir ¹²⁵I pode ser utilizado (alcance mínimo 70%).

VII. PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

- Calibradores** : Reconstitua o calibrador zero com 2.0 ml de água destilada e outros calibradores com 0.5 ml de água destilada
- Controlos** : Reconstitua os controlos com 0.5 ml de água destilada.
- Solução de Lavagem de Trabalho**: Prepare um volume adequado de Solução de Lavagem de Trabalho, adicionando 69 volumes de água destilada a 1 volume de solução de lavagem (70x). Use um agitador magnético para homogeneizar. Elimine a solução de lavagem não utilizada no final do dia.

VIII. CONSERVAÇÃO E PRAZO DE VALIDADE DOS REAGENTES

- Antes de serem abertos ou reconstituídos, todos os componentes do kit são estáveis até ao final do prazo de validade, indicado no rótulo, desde que mantidos entre 2-8°C.
- Depois da reconstituição, os calibradores, controlos são estáveis durante 3 dias entre 2 a 8°C. Para períodos de conservação mais longo, devem ser feitas alíquotas e mantidas a -20°C para o máximo de 3 meses.
- A Solução de Lavagem de Trabalho recentemente preparada deve ser utilizada no mesmo dia.
- Após a 1ª utilização, o marcador é estável até ao final do prazo de validade, desde que mantido no recipiente original bem fechado, entre 2 a 8°C
- As alterações na aparência física dos reagentes do kit podem indicar instabilidade ou degradação.

IX. RECOLHA E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

- Soro podem ser mantidos entre 2 - 8°C.
- Se o teste não for realizado dentro de 24 h, recomenda-se que conserve a -20°C.
- Evite ciclos de congelamento e descongelamento sucessivos
- Não utilize amostras hemolizadas.

X. PROCEDIMENTO

A. Notas de manipulação

Não utilize o kit ou os seus componentes após a expiração do prazo de validade. Não misture componentes de lotes diferentes. Antes de utilizar todos os reagentes devem estar à temperatura ambiente. Misture completamente os reagentes e as amostras com agitação ou rotação suaves. Para evitar contaminações cruzadas, use uma pipeta com ponta descartável para a adição de cada reagente e amostra. As pipetas de precisão elevada ou a pipetagem automática vão aumentar a precisão. Respeite os tempos de incubação. Prepare uma curva padrão para cada análise e não utilize dados de análises anteriores.

B. Procedimento

- Rotule os tubos revestidos em duplicado, para cada calibrador, amostra e controlo. Para a determinação de contagens totais, marque 2 tubos normais.
- Misture por breves momentos, no misturador vortex calibradores, amostras, controlos e dispense 50 µl de cada para os tubos respectivos.
- Dispense 50 µl de marcador para cada tubo.
- Agite manualmente o tabuleiro (rack) que contém os tubos.
- Incube durante 2 h à temperatura ambiente.
- Aspire (ou decante) o conteúdo de cada tubo (excepto as contagens totais). Certifique-se que a ponta de plástico do aspirador atinge o fundo do tubo revestido, para remoção de todo o líquido.
- Lave os tubos com 2 ml de Solução de Lavagem de Trabalho (excepto as contagens totais). Evite a formação de espuma durante a adição de Solução de Lavagem de Trabalho
- Aspire (ou decante) o conteúdo de cada tubo(excepto as contagens totais).
- Lave novamente os tubos com 2 ml da Solução de Lavagem de Trabalho (excepto as contagens totais) e aspire (ou decante).
- Após a última lavagem deixe os tubos na posição vertical durante 2 minutos e aspire até à última gota de líquido.
- Conte os tubos no contador gama durante 60 segundos.

XI. CÁLCULO DOS RESULTADOS

- Calcule a média das determinações em duplicado.
- Em papel semilogaritmico ou de gráfico linear desenhe o c.p.m. (ordenadas para cada padrão contra a concentração correspondente de INS (abcissas) e desenhe uma curva padrão (de calibração) através dos pontos padrão e rejeite os pontos aberrantes óbvios.
- Leia a concentração para cada controlo e amostra por interpolação na curva de calibração.
- A redução dos dados através de computador simplificará estes cálculos. Se o processamento dos resultados for automático, é recomendado um ajustamento de curvas de função logística de 4 parâmetros.

XII. DADOS TÍPICOS

Os dados seguintes servem apenas como exemplo e nunca devem ser utilizados em vez da curva de calibração executada em tempo real.

INS-IRMA		cpm	B/T (%)
Contagem Total		129481	100
Calibrador	0,0 µIU/ml	197	0,15
	5,7 µIU/ml	529	0,41
	13,5 µIU/ml	1277	0,99
	46,0 µIU/ml	4796	3,70
	144,0 µIU/ml	16436	12,69
	440,0 µIU/ml	44090	34,05

XIII. DESEMPENHO E LIMITAÇÕES

A. Limite da detecção

Foram analisados 20 calibradores zero juntamente com outros calibradores.

O limite de detecção, definido como a concentração aparente dois desvios padrão acima da média de contagem com 0 ligações, foi de 1 µIU/ml.

B. Especificidade

As hormonas com reactividade cruzada foram adicionadas a um calibrador de título elevado (100 µIU/ml ou 4 ng/ml). Foi medida a resposta aparente do INS.

Conforme demonstrado a seguir, as insulinas animais (excepto insulina de rato) apresentam reactividade cruzada, enquanto as insulinas humanas, porcinas e bovinas não apresentam reactividade cruzada.

Analito adicionado a um soro de elevada concentração	Conc. teórico (ng/ml)	Valores observados de INS (ng/ml)	Reacção cruzada (%)
Insulina Porcina	8 ng/ml	17,4	> 100
Insulina Bovina	8 ng/ml	17,8	> 100
Insulina Canina	16 ng/ml	17,2	81
Insulina de Coelho	16 ng/ml	14,1	62
Insulina de Rato	16 ng/ml	3,7	0,6
Proinsulin Humana	32 ng/ml	4,4	0,3
proinsulin Porcina	16 ng/ml	4,7	2,5
proinsulin Bovina	16 ng/ml	4,4	0,6

C. Precisão

INTRA-ENSAIO				INTER-ENSAIO			
Soro	N	<X> ± DP (µIU/ml)	CV (%)	Soro	N	<X> ± DP (µIU/ml)	CV (%)
A	10	6,6 ± 0,1	2,1	A	20	14,4 ± 0,9	6,5
B	10	53,3 ± 0,8	1,5	B	20	100,4 ± 6,1	6,1

DP : Desvio Padrão; CV: Coeficiente de variação

D. Exactidão

TESTE DE RECUPERAÇÃO

Amostra	INS Adicionado (µIU/ml)	INS Recuperado (µIU/ml)	Recuperação (%)
Soro 1	245,0	264	107,8
Soro 2	76	73,5	96,7
Soro 3	24,5	24,4	99,6
Soro 4	6,75	6,5	96,3

TESTE DE DILUIÇÃO

Amostra	Diluição	Conc. teórico (µIU/ml)	Conc. medida (µIU/ml)
Soro 1	1/1	-	101
	1/2	50,5	46
	1/4	25,3	21
	1/8	12,6	11
	1/16	6,3	6,2
Soro 2	1/1	-	328
	1/2	164	152
	1/4	82	76
	1/8	41	36
	1/16	20,5	18

As amostras foram diluídas com calibrador zero.

F. Atraso de tempo entre o último calibrador e a dispensa da amostra

Conforme demonstrado a seguir, os resultados das análises continuam precisos, mesmo quando é dispensada uma amostra 30 minutos depois da adição do calibrador aos tubos revestidos.

ATRASSO DE TEMPO		
	0' (µIU/ml)	30' (µIU/ml)
Soro 1	8	7
Soro 2	16	17
Soro 3	37	42
Soro 4	81	82

G. Efeito "Hook"

Uma amostra com INS até 125000 µIU/ml apresenta contagens superiores do que o último ponto de calibração.

XIV. LIMITAÇÕES

- Amostras de pacientes que receberam preparações de anticorpos monoclonais de camundongos para diagnóstico ou terapia podem conter anticorpos humanos anti-camundongos (HAMA). Essas amostras podem apresentar tanto valores falsamente elevados ou diminuídos quando testado com kits de teste que utilizam anticorpos monoclonais de camundongos.
- O mesmo tipo de interferências no imunoensaio pode ser induzido pela presença de anticorpos heterófilos, fatores reumatóide e / ou AIA (auto-anticorpos anti-insulina).
- Anticorpos heterófilos no soro humano podem reagir com o reagente de imunoglobulinas, interferindo com os imunoensaios. Os pacientes rotineiramente expostos a animais ou produtos de soro animal podem estar propensos a esse tipo de interferência e valores anômalos podem ser observados no caso da presença de anticorpos heterófilos. Avaliar cuidadosamente os resultados de pacientes com suspeita de ter esses anticorpos. Se os resultados não forem consistentes com outras observações clínicas, informação adicional deve ser exigida antes do diagnóstico.

XV. CONTROLO DE QUALIDADE INTERNO

- Se os resultados obtidos para o Controlo 1 e/ou 2 não se situarem dentro do intervalo especificado no rótulo do recipiente, os resultados não podem ser usados, sem que haja uma explicação satisfatória para a discrepância verificada.
- Se tal for desejável, cada laboratório pode fazer os seus pools de amostras de controlo, que devem ser mantidas na forma de alíquotas congeladas. Não efectue mais de 2 ciclos de congelamento/descongelamento.
- Os critérios de aceitação da diferença entre os resultados duplos das amostras devem basear-se nas Boas Práticas de Laboratório.

XVI. INTERVALOS DE REFERÊNCIA

O intervalo dos níveis de insulina em 55 indivíduos com testes normais de tolerância oral à glucose foi de 4 a 16 µIU/ml. Estes valores servem apenas de orientação; cada laboratório deve estabelecer o seu próprio intervalo de valores normais.

XVII. AVISOS E PRECAUÇÕES

Segurança

Para utilização em diagnóstico *in vitro*.

Este kit contém ¹²⁵I (meia-vida: 60 dias), emitindo radiações X (28 keV) e γ (35.5 keV) ionizantes.

Este produto radioactivo pode ser transferido e utilizado apenas por pessoas autorizadas; a aquisição, conservação, uso e troca de produtos radioactivos está sujeita a legislação nacional. Em caso algum este produto poderá ser administrado a seres humanos ou a animais.

Toda a manipulação de material radioactivo deve ser executada em área própria longe de locais de passagem. Deve ser mantido no laboratório um livro de notas (log book) para a recepção e conservação dos materiais radioactivos. O equipamento de laboratório contaminado e as substâncias perigosas devem ser eliminadas e separadas para evitar contaminação por diferentes isótopos.

Quaisquer derrames de material radioactivo devem ser imediatamente limpos de acordos com os procedimentos de radiosegurança. O lixo radioactivo deve ser eliminado de acordo com a legislação local e com as directrizes vigentes. A adesão às regras básicas de segurança com material radioactivo confere a protecção adequada.

O material de origem humana utilizado na preparação do reagente foi testado e considerado não reactivo ao antigénio de superfície da Hepatite B (HBs Ag), aos anticorpos do vírus da Hepatite C (HCV) e aos anticorpos do vírus da Imunodeficiência humana (HIV-1 e HIV-2). Dado que nenhum método de ensaio conhecido pode oferecer a segurança completa da ausência de agentes infecciosos, os reagentes e as amostras dos doentes devem ser manuseados como sendo potencialmente infecciosos.

Todos os produtos animais e derivados foram recolhidos a partir de animais saudáveis. Os componentes bovinos são oriundos de países onde não foram notificados casos de BSE. No entanto os componentes com substâncias animais devem ser tratados como potencialmente infecciosos.

A azida sódica pode reagir com as canalizações de chumbo ou cobre formando azidas metálicas altamente explosivas. Portanto, deixar fluir água em abundância nos tubos durante a eliminação de líquidos para prevenir a acumulação de azidas². Evitar contacto com a pele, olhos e mucosas (azida sódica como conservante) Não fume, beba, coma ou aplique cosméticos na área de trabalho. Não utilize as pipetas com o auxílio da boca. Use vestuário de protecção e luvas descartáveis.

XVIII. BIBLIOGRAFIA

- FLIER, J.S., KAHN, C.R. and ROTH, J. (1979).
Receptors, antireceptor antibodies and mechanisms of insulin resistance.
N. Engl. J. Med., 300; 8:413-419.
- FRIER, B.M., ASHBY, J.P., NAIRN, I.M. and BAIRS, J.D. (1981).
Plasma insulin, C-peptide and glucagon concentrations in patients with insulin-dependent diabetes treated with chlorpropamide.
Diab. Metab., 7;1:45-49.
- JUDZEWITSCH, R.G., PFEIFER, M.A., BEST, J.D., BEARD, J.C., HALTER, J.B. and PORTE D.Jr. (1982).
Chronic chlorpropamide therapy of non-insulin-dependent diabetes augments basal and stimulated insulin secretion by increasing islet sensitivity to glucose.
J.Clin. End. and Metab., 55;2:321-328.
- KOSAKA, K., HAGURA, R. and KUZUYA, T. (1977).
Insulin responses in equivocal and definite diabetes, with special reference to subjects who had mild glucose intolerance but later developed definite diabetes.
Diabetes, 26;10:944-952.
- STARR, J.I., MAKO, M.E., JUHN, D. and RUBENSTEIN, A.H. (1978).
Measurement of serum proinsulin-like material : cross-reactivity of porcine and human proinsulin in the insulin radioimmunoassay.
J. Lab. Clin. Med., 91;4:691-692.

- TEMPLE, R.C., CARRINGTON, C.A., LUZIO, S.D., OWENS, D.R., SCHNEIDER, A.E., SOBEY, W.J., HALES, C.N. (1989).
Insulin deficiency in non-insulin-dependent diabetes.
The Lancet, Feb.11:293-295.
- TEMPLE, R.C., CLARK, P.M., NAGI, D.K., SCHNEIDER, A.E., YUDKIN, J.S., HALES, C.N. (1990).
Clin. Endocrin., 32:689-693.
- TEMPLE, R.C., CLARK, P.M., HALES, C.N. (1992).
Measurement of insulin secretion in type 2 diabetes : problems and pitfalls.
Diabetic medicine, 9:503-512.
- CLARK, P. (1993)
Evaluation of Medgenix Insulin-Irma.
Addenbrooke's Hospital Cambridge, UK.

XIX. RESUMO DO PROTOCOLO

	CONTAGENS TOTAIS (ml)	CALIBRAD ORES (ml)	AMOSTRA(S) (ml)
Calibradores (0-5)	-	0.05	-
Amostras	-	-	0.05
Marcador	0.05	0.05	0.05
Incubação	2 h à temperatura ambiente		
Separação	-	Aspire (ou decante)	
Solução de Lavagem de Trabalho	-	2.0	
Separação	-	aspire (ou decante)	
Solução de Lavagem de Trabalho	-	2.0	
Separação	-	aspire (ou decante)	
Contagem	Conte os tubos durante 60 seg		

Nº de catalogo DIASource : KIP1251 - KIP1254	Nº de revisão : 200224-1
---	-----------------------------

Data da revisão : 24/02/2020



Διαβάστε ολόκληρο το πρωτόκολλο πριν από τη χρήση.

INS-IRMA

I. ΧΡΗΣΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΟΠΟΙΑ ΠΡΟΟΡΙΖΕΤΑΙ

Κιτ ανοσοραδιομετρικού προσδιορισμού για την *in vitro* ποσοτική μέτρηση της ανθρώπινης ινσουλίνης (INS) στον ορό.

II. ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

- A. Εμπορική ονομασία:** Κιτ INS-IRMA της DIASource
- B. Αριθμός καταλόγου:** KIP1251: 96 εξετάσεις
KIP1254: 4 x 96 εξετάσεις
- Γ. Κατασκευάζεται από την:** DIASource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

Για τεχνική βοήθεια ή πληροφορίες σχετικά με παραγγελίες επικοινωνήστε στα:
Τηλ.: +32 (0)10 84.99.11 Fax: +32 (0)10 84.99.91

III. ΚΛΙΝΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ

A Βιολογικές δράσεις της ινσουλίνης

Η ινσουλίνη, μια πολυπεπτιδική ορμόνη με μοριακό βάρος 5800, απεκκρίνεται από τα β-κύτταρα των νησίδων του Langerhans από το πάγκρεας. Η ινσουλίνη διαθέτει ένα ευρύ φάσμα βιολογικών δράσεων. Διεγείρει την κυτταρική πρόσληψη της γλυκόζης, την οξειδωση της γλυκόζης, τη γλυκογένεση, τη λιπογένεση, την πρωτεϊνογένεση και το σχηματισμό του DNA και του RNA. Η ινσουλίνη παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση των επιπέδων της γλυκόζης του πλάσματος (αναστολή της ηπατικής παραγωγής, διέγερση της περιφερικής χρησιμοποίησης της γλυκόζης). Οι προκύπτουσες υπογλυκαιμικές ενέργειες της ινσουλίνης αντισταθμίζονται από ορμόνες με υπογλυκαιμικές ενέργειες (γλυκαγόνο, αυξητική ορμόνη, κορτιζόλη, επινεφρίνη). Η απέκκριση της ινσουλίνης ελέγχεται κυρίως από τα επίπεδα της γλυκόζης στο πλάσμα: η υπεργλυκαιμία προκαλεί άμεση και σημαντική αύξηση στα επίπεδα της κυκλοφορούσας ινσουλίνης. Νευρικές επιδράσεις, καθώς και διάφοροι μεταβολικοί και ορμονικοί παράγοντες (αμινοξέα, γλυκαγόνο, γαστρεντερική ορμόνη) επίσης συμμετέχουν στον έλεγχο της απέκκρισης της ινσουλίνης. Ο τύπου I (ινσουλινοεξαρτώμενος: "νεανικός") διαβήτης οφείλεται σε καταστροφή των β-κυττάρων, με συνέπεια την απόλυτη έλλειψη ινσουλίνης. Στο τύπου II (μη ινσουλινοεξαρτώμενος: "με έναρξη στην ώριμη ηλικία") διαβήτη, ενδέχεται να παίζει σημαντικό ρόλο η αντίσταση στην ινσουλίνη. Ωστόσο, μετά από αρκετά χρόνια εξέλιξης, μπορεί να εμφανιστεί ανεπάρκεια των β-κυττάρων, που οδηγεί σε σχετική ινσουλινοπενία, η οποία απαιτεί, σε μερικές περιπτώσεις, χορήγηση ινσουλίνης. Η αντίσταση στην ινσουλίνη συσχετίζεται με υψηλά επίπεδα κυκλοφορίας της ορμόνης. Η πιο συνήθης αιτία αντίστασης στην ινσουλίνη έγκειται στην παχυσαρκία. Διάφορες ενδοκρινολογικές (ακρομεγαλία, σύνδρομο Cushing) καθώς και σπάνιες περιπτώσεις ελλειμμάτων στους υποδοχείς της ινσουλίνης ή περιπτώσεις με αντισώματα των υποδοχέων αντι-ινσουλίνης συσχετίζονται με δυσανεξία στη γλυκόζη ή ακόμη και διαβήτη λόγω αντίστασης στην ινσουλίνη. Ο προσδιορισμός των επιπέδων της ινσουλίνης στο πλάσμα αποτελεί σημαντική παράμετρο στη διάγνωση της υπογλυκαιμίας. Τα επίπεδα της ινσουλίνης είναι υψηλά σε περιπτώσεις ινσουλινώματος (όγκος των β-κυττάρων). Η λειτουργική μεταγενετική υπογλυκαιμία μπορεί επίσης να συσχετίζεται με μη ενδεδειγμένη απελευθέρωση ινσουλίνης κατά την πρόσληψη υδρογονανθράκων. Τα επίπεδα της ινσουλίνης προσδιορίζονται είτε σε κατάσταση νηστείας είτε κατά τη διάρκεια δυναμικής εξέτασης:

- α) Εξέταση διέγερσης: γεύμα πλούσιο σε υδρογονάνθρακες, τεστ ανοχής σε γλυκόζη ληφθείσα από το στόμα (OGTT), έγχυση αργινίνης, χορήγηση τολβουταμίδης ή άλλων σουλφαυλουριών.
- β) Εξέταση αναστολής: νηστεία, έγχυση σωματοστατίνης


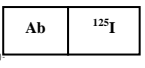
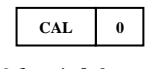
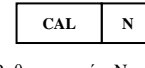

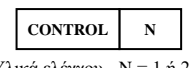
B. Κλινική εφαρμογή του προσδιορισμού ινσουλίνης

- Προσδιορισμός του αποθέματος των β-κυττάρων κατά τη διάρκεια της εξέτασης ανοχής στη γλυκόζη ή μετά από ένα γεύμα πλούσιο σε υδρογονάνθρακες, ως οδηγός για τον καθορισμό της θεραπείας με ινσουλίνη.
- Συμβολή στη διάγνωση ινσουλινοεξαρτώμενου και μη ινσουλινοεξαρτώμενου διαβήτη
- Χαρακτηρισμός και παρακολούθηση καταστάσεων δυσανεξίας στη γλυκόζη.
- Διάγνωση και μελέτη περιπτώσεων αντίστασης στην ινσουλίνη.
- Διάγνωση ινσουλινώματος και άλλων αιτίων υπογλυκαιμίας.

IV. ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η εξέταση INS-Ima της DIAsource είναι ένας ανοσοραδιομετρικός προσδιορισμός που βασίζεται σε διαχωρισμό επιστρωμένων σωληναρίων. Τα Mabs1, τα αντισώματα σύλληψης, προσκολλώνται στην κάτω και εσωτερική επιφάνεια του πλαστικού σωληναρίου. Οι βαθμονομητές ή τα δείγματα που προστίθενται στα σωληνάρια εμφανίζουν κατ' αρχήν χαμηλή συγγένεια προς τα Mabs1. Προσθήκη Mab2, του αντισώματος σηματοδότησης που είναι σηματοδοτούμενο με ¹²⁵I, θα ολοκληρώσει το σύστημα και θα πυροδοτήσει την ανοσολογική αντίδραση. Μετά την πλύση, η υπολειπόμενη ραδιενέργεια, που είναι δεσμευμένη στο σωληνάριο, αντανακλά τη συγκέντρωση του αντιγόνου. Η χρήση αρκετών διακριτών Mabs αποφεύγει την υπερειδιόκτητα, που είναι συνήθης σε IRMA δύο σημείων, καθώς και την ανάγκη συσκευής ανάδευσης ή επώασης στους 37° C.

V. ΠΑΡΕΧΟΜΕΝΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Αντιδραστήρια	Κιτ 96 εξετάσεων	Κιτ 4x96 εξετάσεων v	Χρωματι- κός κωδικός	Ανασύσταση
 Σωληνάρια επιστρωμένα με anti INS (μονοκλωνικά)	2 x 48	8 x 48	σκούρο κόκκινο	Έτοιμο για χρήση
 ΙΧΝΗΘΕΤΗΣ: Αντι-INS (μονοκλωνικά αντισώματα) σηματοδοτούμενα με ¹²⁵ Ιωδίνη σε ρυθμιστικό διάλυμα HEPES με βόεια ορολευκωματίνη, αζίδιο (<0,1%), EDTA και μια αδρανής κόκκινη χρωστική	1 φιαλίδιο 5,5 ml 350 kBq	4 φιαλίδια 5,5 ml 350 kBq	κόκκινο	Έτοιμο για χρήση
 Μηδενικός βαθμονομητής σε ανθρώπινο πλάσμα και θυμόλη	1 φιαλίδιο λυοφιλοποιο ημένο	2 φιαλίδια λυοφιλοποιο ημένο	κίτρινο	Προσθέστε 2,0 ml απεσταγμένου νερού
 Βαθμονομητής N = 1 έως 5 (δείτε τις ακριβείς τιμές πάνω στις ετικέτες των φιαλιδίων) σε ανθρώπινο πλάσμα και θυμόλη	5 φιαλίδια λυοφιλοποιο ημένο	2 x 5 φιαλίδια λυοφιλοποιο ημένο	κίτρινο	Προσθέστε 0,5 ml απεσταγμένου νερού
 Διάλυμα πλύσης (Tris-HCl)	1 φιαλίδιο 10 ml	4 φιαλίδια 10 ml	καφέ	Αραιώστε 70 x με απεσταγμένο νερό (χρησιμοποιήστε μαγνητικό αναδευτήρα).
 Υλικά ελέγχου - N = 1 ή 2 σε ανθρώπινο πλάσμα με θυμόλη	2 φιαλίδια λυοφιλοποιο ημένο	2 x 2 φιαλίδια λυοφιλοποιο ημένο	ασημί	Προσθέστε 0,5 ml απεσταγμένου νερού

Σημείωση: 1. Χρησιμοποιείτε το μηδενικό βαθμονομητή για αραιώσεις δειγμάτων.
2. 1 μIU του παρασκευάσματος του βαθμονομητή είναι ισοδύναμο με 1 μIU του WHO 66/304.

VI. ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ ΠΟΥ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ

Τα ακόλουθα υλικά απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται στο κιτ:

1. Απεσταγμένο νερό
2. Πιπέτες για διανομή: 50 μl, 500 μl και 2 ml (συνιστάται η χρήση πιπετών ακριβείας με αναλώσιμα πλαστικά ρύγχη)
3. Αναμείκτης στροβιλισμού
4. Μαγνητικός αναδευτήρας
5. Αυτόματη σύριγγα των 5 ml (τύπου Cornwall) για πλύση
6. Σύστημα αναρρόφησης (προαιρετικό)
7. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί οποιοσδήποτε απαριθμητής ακτίνων γ με δυνατότητα μέτρησης του ¹²⁵I (ελάχιστη απόδοση 70%).

VII. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟΥ

- A. Βαθμονομητές:** Ανασυστήστε το μηδενικό βαθμονομητή με 2,0 ml απεσταγμένου ύδατος και άλλους βαθμονομητές με 0,5 ml απεσταγμένου ύδατος.
- B. Υλικά ελέγχου:** Ανασυστήστε τα υλικά ελέγχου με 0,5 ml απεσταγμένου νερού.
- Γ. Διάλυμα πλύσης εργασίας:** Προετοιμάστε επαρκή όγκο διαλύματος πλύσης εργασίας με προσθήκη 69 όγκων απεσταγμένου νερού σε 1 όγκο διαλύματος πλύσης (70x). Χρησιμοποιήστε μαγνητικό αναδευτήρα για την ομογενοποίηση. Απορρίψτε το μη χρησιμοποιημένο διάλυμα πλύσης εργασίας στο τέλος της ημέρας.

VIII. ΦΥΛΑΞΗ ΚΑΙ ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΛΗΞΗΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

- Πριν από το άνοιγμα ή την ανασύσταση, όλα τα συστατικά του κιτ παραμένουν σταθερά έως την ημερομηνία λήξης, η οποία αναγράφεται στην ετικέτα του φιαλιδίου, εφόσον διατηρούνται σε θερμοκρασία 2 έως 8° C.
- Μετά την ανασύσταση, οι βαθμονομητές και τα υλικά ελέγχου παραμένουν σταθερά για μία εβδομάδα σε θερμοκρασία 2 έως 8° C. Για μεγαλύτερες περιόδους φύλαξης, πρέπει να σχηματίζονται κλάσματα και να διατηρούνται στους -20° C για το πολύ 3 μήνες.
- Φρέσκο, παρασκευασμένο διάλυμα πλύσης εργασίας θα πρέπει να χρησιμοποιείται την ίδια ημέρα.
- Μετά την πρώτη χρήση του, ο ιχνηθέτης παραμένει σταθερός έως την ημερομηνία λήξης, εφόσον διατηρείται στο αρχικό, ερμητικά κλειστό φιαλίδιο σε θερμοκρασία 2 έως 8° C.
- Τυχόν μεταβολές της φυσικής εμφάνισης των αντιδραστηρίων του κιτ ενδέχεται να υποδηλώνουν αστάθεια ή αλλοίωση.

IX. ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

- Τα δείγματα ορού πρέπει να φυλάσσονται σε θερμοκρασία 2-8° C.
- Εάν η εξέταση δεν πραγματοποιηθεί εντός 24 ωρών, συνιστάται η φύλαξη στους -20° C.
- Αποφεύγετε τους επακόλουθους κύκλους κατάψυξης-απόψυξης.
- Μην χρησιμοποιείτε δείγματα που έχουν υποστεί αιμόλυση.

X. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

- A. Σημειώσεις σχετικά με το χειρισμό**
Μη χρησιμοποιείτε το κιτ ή τα συστατικά μετά την ημερομηνία λήξης. Μην αναμειγνύετε υλικά από διαφορετικές παρτίδες κιτ. Φέρετε όλα τα αντιδραστήρια σε θερμοκρασία δωματίου πριν από τη χρήση. Αναμείξτε καλά όλα τα αντιδραστήρια και τα δείγματα με απαλή ανακίνηση ή ανάδευση. Χρησιμοποιείτε ένα καθαρό αναλώσιμο ρύγχος πιπέτας για την προσθήκη κάθε διαφορετικού αντιδραστηρίου και δείγματος προκειμένου να αποφύγετε την επιμόλυνση. Η ακρίβεια βελτιώνεται με χρήση πιπετών υψηλής ακρίβειας ή αυτοματοποιημένου εξοπλισμού διανομής με πιπέτες. Τηρείτε τους χρόνους επώασης. Προετοιμάστε μια καμπύλη βαθμονόμησης για κάθε ανάλυση και μη χρησιμοποιείτε δεδομένα από προηγούμενες αναλύσεις.
- B. Διαδικασία**
 1. Σημάνετε τα επιστρωμένα σωληνάρια εις διπλούν για κάθε βαθμονομητή, δείγμα, υλικό ελέγχου. Για τον προσδιορισμό των συνολικών μετρήσεων, σημάνετε 2 φυσιολογικά σωληνάρια.
 2. Στροβιλίστε για λίγο βαθμονομητές, δείγματα και υλικά ελέγχου και διανείμετε 50 μl από έκαστο σε αντίστοιχα σωληνάρια.
 3. Διανείμετε 50 ml ιχνηθέτη σε κάθε σωληνάριο.
 4. Ανακινήστε απαλά με το χέρι τη βάση στήριξης των σωληναρίων για να απελευθερώσετε τυχόν παγιδευμένες φυσαλίδες αέρα.
 5. Επώαση επί 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.
 6. Αναρροφήστε (ή μεταγγίστε) το περιεχόμενο κάθε σωληναρίου (με εξαίρεση εκείνα που αφορούν τις συνολικές μετρήσεις). Βεβαιωθείτε ότι το πλαστικό ρύγχος του αναρροφητή φθάνει στον πυθμένα του επιστρωμένου σωληναρίου προκειμένου να αφαιρεθεί όλη η ποσότητα του υγρού.
 7. Πλύνετε τα σωληνάρια με 2 ml διαλύματος πλύσης εργασίας (με εξαίρεση εκείνα που αφορούν τις συνολικές μετρήσεις). Αποφύγετε το σχηματισμό αφρού κατά τη διάρκεια της προσθήκης του διαλύματος πλύσης εργασίας.
 8. Αναρροφήστε (ή μεταγγίστε) το περιεχόμενο κάθε σωληναρίου (με εξαίρεση εκείνα που αφορούν τις συνολικές μετρήσεις).
 9. Πλύνετε τα σωληνάρια και πάλι με 2 ml διαλύματος πλύσης εργασίας (με εξαίρεση εκείνα που αφορούν τις συνολικές μετρήσεις) και αναρροφήστε (ή μεταγγίστε).
 10. Μετά την τελευταία πλύση, αφήστε τα σωληνάρια να σταθούν σε όρθια

11. θέση για δύο λεπτά και αναρροφήστε τη σταγόνα υγρού που απομένει.
Υποβάλλετε σε μέτρηση τα σωληνάρια σε απεριθμητή ακτίνων γ για 60 δευτερόλεπτα.

XI. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

- Υπολογίστε τη μέση τιμή των διπλών προσδιορισμών.
- Σε ημιλογαριθμικό ή γραμμικό χαρτί γραφημάτων, παραστήστε γραφικά τις c.p.m. (κρούσεις ανά λεπτό) (τεταγμένη) για κάθε βαθμονομητή έναντι της αντίστοιχης συγκέντρωσης της INS (τεταγμένη) και σχεδιάστε μια καμπύλη βαθμονόμησης μέσω των σημείων του βαθμονομητή, απορρίψτε τις εμφανείς μη αποδεκτές τιμές.
- Διαβάστε τη συγκέντρωση για κάθε υλικό ελέγχου και δείγμα με παρεμβολή στην καμπύλη βαθμονόμησης.
- Αναγωγή δεδομένων με τη βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή θα απλοποιήσει αυτούς τους υπολογισμούς. Εάν χρησιμοποιείται αυτόματη επεξεργασία αποτελεσμάτων, συνιστάται προσαρμογή καμπύλης λογιστικής συνάρτησης 4 παραμέτρων.

XII. ΤΥΠΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Τα ακόλουθα δεδομένα προορίζονται μόνο ως επεξήγηση και δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται ποτέ αντί της καμπύλης βαθμονόμησης πραγματικού χρόνου.

INS-IRMA		cpm	B)
Συνολική μέτρηση		129481	100
Βαθμονομητής	0,0 μIU/ml	197	0,15
	5,7 μIU/ml	529	0,41
	13,5 μIU/ml	1277	0,99
	46,0 μIU/ml	4796	3,70
	144,0 μIU/ml	16436	12,69
	440,0 μIU/ml	44090	34,05

XIII. ΑΠΟΔΟΣΗ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

A. Όριο ανίχνευσης

Υποβλήθηκαν σε προσδιορισμό είκοσι μηδενικοί βαθμονομητές μαζί με ένα σύνολο άλλων βαθμονομητών. Το όριο ανίχνευσης, οριζόμενο ως η φαινομενική συγκέντρωση δύο τυπικών αποκλίσεων πάνω από τις μέσες μετρήσεις σε μηδενική δέσμευση, ήταν 1 μIU/ml.

B. Ειδικότητα

Ορμόνες διασταυρούμενης αντιδραστικότητας προστέθηκαν σε ένα βαθμονομητή υψηλής τιμής (100 μIU/ml ή 4 ng/ml). Μετρήθηκε η φαινομενική απόκριση της INS. Όπως φαίνεται πιο κάτω, ινσουλίνες ζώων (εκτός της ινσουλίνης του αρουραίου) εμφανίζουν δύο τυπικών αποκλίσεων ενώ ανθράκινες, χοίρειες και βόειες προΐνσουλίνες δεν παρουσιάζουν διασταυρούμενη αντιδραστικότητα.

Προσθεθείσα αναλύομενη ουσία σε ορό υψηλής τιμής	Θεωρητικές τιμές INS (ng/ml)	Παρατηρηθείσες τιμές INS (ng/ml)	Διασταυρούμενη αντίδραση (%)
Χοίρειος ινσουλίνη 8 ng/ml	4,2	17,4	> 100
Βόειος ινσουλίνη 8 ng/ml	3,8	17,8	> 100
Ινσουλίνη σκύλου 16 ng/ml	4,2	17,2	81
Ινσουλίνη κουνελιού 16 ng/ml	4,2	14,1	62
Ινσουλίνη αρουραίου 16 ng/ml	3,8	3,7	0,6
Ανθρώπινη προΐνσουλίνη 32 ng/ml	4,3	4,4	0,3
Χοίρειος προΐνσουλίνη 16 ng/ml	4,3	4,7	2,5
Βόειος προΐνσουλίνη 16 ng/ml	4,3	4,4	0,6

Γ. Ακρίβεια

ΓΙΑ ΤΟΝ ΙΔΙΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ				ΜΕΤΑΞΥ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΩΝ			
Ορός	N	<X> ± T.A. (μIU/ml)	Σ.Δ. (%)	Ορός	N	<X> ± T.A. (μIU/ml)	Σ.Δ. (%)
A	10	6,6 ± 0,1	2,1	A	20	14,4 ± 0,9	6,5
B	10	53,3 ± 0,8	1,5	B	20	100,4 ± 6,1	6,1

T.A.: Τυπική απόκλιση, Σ.Δ.: Συντελεστής διακύμανσης

Δ. Ορθότητα

ΕΞΕΤΑΣΗ ΑΝΑΚΤΗΣΗΣ

Δείγμα	Προσθεθείσα INS (μIU/ml)	Ανακτηθείσα INS (μIU/ml)	Ανάκτηση (%)
Ορός 1	245.0	264	107.8
Ορός 2	76	73.5	96.7
Ορός 3	24.5	24.4	99.6
Ορός 4	6.75	6.5	96.3

ΕΞΕΤΑΣΗ ΑΡΑΙΩΣΗΣ

Δείγμα	Αραίωση	Θεωρητική συγκέντρωση (μIU/ml)	Μετρηθείσα συγκέντρωση (μIU/ml)
Ορός 1	1/1	-	101
	1/2	50.5	46
	1/4	25.3	21
	1/8	12.6	11
	1/16	6.3	6.2
Ορός 2	1/1	-	328
	1/2	164	152
	1/4	82	76
	1/8	41	36
	1/16	20.5	18

Τα δείγματα αραιώθηκαν με μηδενικό βαθμονομητή.

E. Μεσοδιάστημα μεταξύ της διανομής τελευταίου βαθμονομητή και δείγματος

Όπως φαίνεται στη συνέχεια, τα αποτελέσματα του προσδιορισμού παραμένουν ορθά ακόμα και όταν διανέμεται ένα δείγμα 30 λεπτά μετά την προσθήκη των βαθμονομητών στα επιστρωμένα σωληνάρια.

ΜΕΣΟΔΙΑΣΤΗΜΑ		
	0' (μIU/ml)	30' (μIU/ml)
Ορός 1	8	7
Ορός 2	16	17
Ορός 3	37	42
Ορός 4	81	82

ΣΤ. Φαινόμενο αγκίστρου (hook)

Δείγμα που εμβολιάστηκε με INS έως 125000 μIU/ml δίνει υψηλότερες μετρήσεις από το σημείο του τελευταίου βαθμονομητή.

XIV. ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

- Δείγματα από ασθενείς που έχουν λάβει παρασκευάσματα μονοκλωνικών αντισωμάτων ποντικού για σκοπούς διάγνωσης ή θεραπείας, ενδεχομένως να περιέχουν ανθρώπινα αντισώματα αντι-ποντικού (HAMA). Σε αυτά τα δείγματα μπορούν να παρατηρηθούν ψευδώς αυξημένες ή ψευδώς μειωμένες τιμές, όταν ελέγχονται με κιτ προσδιορισμού που χρησιμοποιούν μονοκλωνικά αντισώματα ποντικού.
- Παρόμοιες παρεμβολές στην ανοσοδοκιμασία μπορεί να προκληθούν από την παρουσία ετερόλογων αντισωμάτων, ρευματοειδών παραγόντων και / ή ΑΙΑ (αυτοαντισώματα αντι-ινσουλίνης).
- Τα ετεροφιλικά αντισώματα στον άνθρωπο ορό μπορούν να αντιδράσουν με ανοσοσφαιρίνες των αντιδραστηρίων, προκαλώντας παρεμβολή σε in vitro ανοσοπροσδιορισμούς. Ασθενείς που εκτίθενται τακτικά σε ζώα ή προϊόντα ζωικού ορού ενδεχομένως να είναι επιρρεπείς σε αυτήν την παρεμβολή. Παθολογικές τιμές μπορούν να παρατηρηθούν σε παρουσία ετεροφιλικών αντισωμάτων. Αξιολογείτε με προσοχή τα αποτελέσματα ασθενών, στους οποίους υπάρχει υποψία αυτών των αντισωμάτων.

Εάν τα αποτελέσματα δεν είναι σύμφωνα με άλλες κλινικές παρατηρήσεις, θα χρειαστεί η λήψη περαιτέρω πληροφοριών πριν από τη θέση της διάγνωσης.

XV. ΕΣΩΤΕΡΙΚΟΣ ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

- Εάν τα αποτελέσματα που λαμβάνονται για το υλικό ελέγχου 1 ή/και το υλικό ελέγχου 2 δε βρίσκονται εντός του πεδίου τιμών που καθορίζεται στην ετικέτα του φιαλιδίου, τα αποτελέσματα δεν είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν, εκτός εάν έχει δοθεί ικανοποιητική εξήγηση για την ασυμφωνία.
- Εάν είναι επιθυμητό, κάθε εργαστήριο μπορεί να δημιουργήσει τα δικά του μείγματα δειγμάτων ελέγχου, τα οποία πρέπει να διατηρούνται κατενυγμένα σε κλάσματα. Μην καταψύχετε-αποψύχετε περισσότερο από δύο φορές.
- Τα κριτήρια αποδοχής για τη διαφορά μεταξύ των διπλών αποτελεσμάτων των δειγμάτων θα πρέπει να βασίζονται σε ορθές εργαστηριακές πρακτικές.

XVI. ΔΙΑΣΤΗΜΑΤΑ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Το πεδίο τιμών των επιπέδων της ινσουλίνης σε 55 υποκείμενα με φυσιολογικές εξετάσεις ανοχής σε γλυκόζη ληφθείσα από το στόμα ήταν 4 έως 16 μIU/ml
Οι τιμές αυτές παρέχονται μόνον ως οδηγός. Κάθε εργαστήριο θα πρέπει να καθιερώσει το δικό του φυσιολογικό πεδίο τιμών.

XVII. ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ

Ασφάλεια

Μόνο για διαγνωστική χρήση in vitro.

Το kit αυτό περιέχει το ¹²⁵I (Χρόνος ημιζωής: 60 ημέρες), μια ραδιενεργή ουσία η οποία εκπέμπει ιονίζουσα ακτινοβολία Χ (28 keV) και γ (35.5 keV).

Αυτό το ραδιενεργό προϊόν είναι δυνατό να μεταφερθεί και να χρησιμοποιηθεί μόνο από εξουσιοδοτημένα άτομα. Η αγορά, φύλαξη, χρήση και ανταλλαγή ραδιενεργών προϊόντων υπόκεινται στη νομοθεσία της χώρας του τελικού χρήστη. Σε καμία περίπτωση δεν πρέπει να χορηγείται το προϊόν σε ανθρώπους ή ζώα.

Όλος ο χειρισμός του ραδιενεργού υλικού θα πρέπει να εκτελείται σε καθορισμένο χώρο, μακριά από χώρους τακτικής διέλευσης. Στο εργαστήριο πρέπει να διατηρείται ημερολόγιο για την παραλαβή και τη φύλαξη ραδιενεργών υλικών. Εξοπλισμός και γυάλινα σκεύη του εργαστηρίου, τα οποία θα μπορούσαν να μολυνθούν με ραδιενεργές ουσίες, θα πρέπει να φυλάσσονται σε ξεχωριστό χώρο για την πρόληψη επιμόλυνσης των διαφόρων ραδιοϊσότοπων.

Τυχόν διαρροές ραδιενεργών υγρών πρέπει να καθαρίζονται αμέσως σύμφωνα με τις διαδικασίες ασφάλειας από ραδιενέργεια. Τα ραδιενεργά απόβλητα πρέπει να απορρίπτονται σύμφωνα με τους τοπικούς κανονισμούς και τις κατευθυντήριες οδηγίες των αρχών που έχουν δικαιοδοσία στο εργαστήριο. Η τήρηση των βασικών κανόνων ασφάλειας από ραδιενέργεια παρέχει επαρκή προστασία.

Τα συστατικά ανθρώπινου αίματος που περιλαμβάνονται στο kit αυτό έχουν ελεγχθεί με μεθόδους εγκεκριμένες στην Ευρώπη ή/και από τον FDA και έχει διαπιστωθεί ότι είναι αρνητικά ως προς την παρουσία HBsAg, αντι-HCV, αντι-HIV-1 και 2. Καμία γνωστή μέθοδος δεν είναι δυνατό να παρέχει πλήρη διασφάλιση ότι παράγωγα του ανθρώπινου αίματος δε θα μεταδώσουν ηπατίτιδα, AIDS ή άλλες λοιμώξεις. Επομένως, ο χειρισμός αντιδραστηρίων, δειγμάτων ορού ή κλάσματος θα πρέπει να γίνεται σύμφωνα με τις τοπικές διαδικασίες περί ασφάλειας.

Όλα τα ζωικά προϊόντα και παράγωγα έχουν συλλεχθεί από υγιή ζώα. Τα βόεια συστατικά προέρχονται από χώρες όπου δεν έχει αναφερθεί BSE. Παρ' όλ' αυτά, συστατικά που περιέχουν ζωικές ουσίες θα πρέπει να αντιμετωπίζονται ως δυνητικώς μολυσματικά.

Αποφεύγετε οποιαδήποτε επαφή του δέρματος με αντιδραστήρια (χρησιμοποιείται αζίδιο του νατρίου ως συντηρητικό). Το αζίδιο στο kit αυτό ενδέχεται να αντιδράσει με μόλυβδο και χαλκό των υδραυλικών σωληνώσεων και να σχηματίσει με τον τρόπο αυτό ιδιαίτερα εκρηκτικά αζίδια μετάλλων. Κατά τη διάρκεια του βήματος πλύσης, εκπλύνετε την αποχέτευση με μεγάλη ποσότητα νερού, για την πρόληψη τυχόν συσσώρευσης αζιδίου.

Μην καπνίζετε, μην πίνετε, μην τρώτε και μη χρησιμοποιείτε καλλυντικά στο χώρο εργασίας. Μην διανέμετε με πιπέτα χρησιμοποιώντας το στόμα σας. Χρησιμοποιείτε προστατευτικό ρουχισμό και αναλώσιμα γάντια.

XVIII. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- FLIER, J.S., KAHN, C.R. and ROTH, J. (1979). **Receptors, antireceptor antibodies and mechanisms of insulin resistance.** N. Engl. J. Med., 300; 8:413-419.
- FRIER, B.M., ASHBY, J.P., NAIRN, I.M. and BAIRS, J.D. (1981). **Plasma insulin, C-peptide and glucagon concentrations in patients with insulin-dependent diabetes treated with chlorpropamide.** Diab. Metab., 7;1:45-49.
- JUDZEWITSCH, R.G., PFEIFER, M.A., BEST, J.D., BEARD, J.C., HALTER, J.B. and PORTE D.Jr. (1982). **Chronic chlorpropamide therapy of non-insulin-dependent diabetes augments basal and stimulated insulin secretion by increasing islet sensitivity to glucose.** J.Clin. End. and Metab., 55;2:321-328.
- KOSAKA, K., HAGURA, R. and KUZUYA, T. (1977). **Insulin responses in equivocal and definite diabetes, with special reference to subjects who had mild glucose intolerance but later developed definite diabetes.** Diabetes, 26;10:944-952.
- STARR, J.I., MAKO, M.E., JUHN, D. and RUBENSTEIN, A.H. (1978). **Measurement of serum proinsulin-like material : cross-reactivity of porcine and human proinsulin in the insulin radioimmunoassay.** J. Lab. Clin. Med., 91;4:691-692.
- TEMPLE, R.C., CARRINGTON, C.A., LUZIO, S.D., OWENS, D.R., SCHNEIDER, A.E., SOBEY, W.J., HALES, C.N. (1989). **Insulin deficiency in non-insulin-dependent diabetes.** The Lancet, Feb.11:293-295.
- TEMPLE, R.C., CLARK, P.M., NAGI, D.K., SCHNEIDER, A.E., YUDKIN, J.S., HALES, C.N. (1990). **Insulin secretion in type 2 diabetes : problems and pitfalls.** Diabetic medicine, 9:503-512.
- CLARK, P. (1993) **Evaluation of Medgenix Insulin-Irma.** Addenbrooke's Hospital Cambridge, UK.

XIX. ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΤΟΥ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟΥ

	ΣΥΝΟΛΙΚΕΣ ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ (ml)	ΒΑΘΜΟΝΟ ΜΗΤΕΣ (ml)	ΔΕΙΓΜΑ(ΤΑ) (ml)
Βαθμονομητές (0-5)	-	0,05	-
Δείγματα	-	-	0,05
Ιχνηθέτης	0,05	0,05	0,05
Επώαση	2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου		
Διαχωρισμός	-	Αναρρόφηση (ή μετάγγιση)	
Διάλυμα πλύσης εργασίας	-	2,0	
Διαχωρισμός	-	Αναρρόφηση (ή μετάγγιση)	
Διάλυμα πλύσης εργασίας	-	2,0	
Διαχωρισμός	-	Αναρρόφηση (ή μετάγγιση)	
Μέτρηση	Μέτρηση σωληναρίων επί 60 δευτερόλεπτα		

Αρ. καταλόγου DIASource: KIP1251 – KIP1254	Αρ. αναθεώρησης: 200224-1
---	------------------------------



pl

Przed zastosowaniem należy przeczytać cały protokół.

INS-IRMA

I. PRZEZNACZENIE

Oznaczenie immunoradiometryczne do ilościowego pomiaru ludzkiej insuliny (INS) w surowicy metodą *in vitro*.

II. INFORMACJE OGÓLNE

- A. Nazwa firmowa:** DIAsource INS-IRMA Kit
- B. Numer katalogowy:** KIP1251: 96 oznaczeń
KIP1254: 4 x 96 oznaczeń
- C. Wyprodukowano przez:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgia.

Dział pomocy technicznej oraz informacje dotyczące zamówień:

Tel: +32 (0)10 84.99.11

Fax: +32 (0)10 84.99.91

III. INFORMACJE KLINICZNE

A Aktywność biologiczna insuliny

Insulina, hormon polipeptydowy o masie cząsteczkowej 5800, jest wydzielana przez komórki beta wysp Langerhansa trzustki. Insulina charakteryzuje się szerokim spektrum działania biologicznego. Stymuluje wychwyt glukozy przez komórkę, utlenianie glukozy, glikogenezę, lipogenezę, proteogenezę i tworzenie DNA i RNA. Insulina odgrywa kluczową rolę w regulacji poziomów glukozy w osoczu (hamowanie wydzielania glukozy przez wątrobę, stymulacja utylizacji glukozy w tkankach obwodowych). Wpływ insuliny na podwzgórze jest bilansowany przez inne hormony działające na podwzgórze (glukagon, hormon wzrostu, kortyzol, epinefryna). Wydzielanie insuliny jest kontrolowane głównie przez poziom glukozy w osoczu. Hiperglikemia prowadzi do wydzielania i znacznego wzrostu poziomu insuliny we krwi krążącej. W kontroli wydzielania insuliny uczestniczą również komórki układu nerwowego oraz inne czynniki metaboliczne i hormonalne (aminokwasy, glukagon, hormon żółdkowo-jelitowy). Cukrzyca typu 1 (cukrzyca insulinozależna, tzw. „młodzieńcza”) jest spowodowana zniszczeniem komórek beta co prowadzi do całkowitego braku insuliny. W cukrzycy typu 2 (cukrzyca insulino niezależna, tzw. „dorosłych”) ważną rolę odgrywa oporność na insulinę, jednak po kilku latach postępu choroby może wystąpić niewydolność komórek beta, prowadząc do względnej insulinopenii wymagającej, w niektórych wypadkach, podawania insuliny. Insulinooporność związana jest z wysokimi stężeniami hormonu w krążeniu. Najczęstszą przyczyną insulinooporności jest otyłość. W różnych endokrynopatiach (akromegalii, zespole Cushinga), podobnie jak w niektórych, rzadkich przypadkach defektów receptora insulinowego, lub występowaniem przeciwciał anty-insulinowych może wystąpić nietolerancja glukozy, lub nawet cukrzyca związana z insulinoopornością. Wyniki oznaczenia poziomów insuliny w osoczu są ważnym parametrem w diagnostyce hipoglikemii. Poziomy insuliny są wysokie w przypadkach insulinoma (guza komórek beta). Czynnościowa hipoglikemia po posiłku może również być związana z nieprawidłowym wydzielaniem insuliny w odpowiedzi na podaż węglowodanów. Poziomy insuliny mogą być oznaczane albo na czczo, albo w testach dynamicznych :

- testy stymulacji: po podaniu posiłku z dużą zawartością węglowodanów, test doustnego obciążenia glukozą (OGTT), test po podaniu argininy, tolbutamidu lub innych pochodnych sulfonilomocznika.
- testy hamowania: na czczo, po podaniu somatostatyny



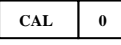
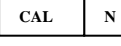
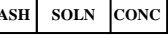
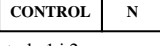
B. Zastosowanie kliniczne oznaczania poziomów insuliny

- Określenie rezerwy komórek beta w czasie testu tolerancji glukozy lub po posiłku o bogatej zawartości węglowodanów, jako wskazówka rozpoczęcia insulinoterapii;
- Pomoc w różnicowaniu cukrzycy insulinozależnej lub insulino niezależnej;
- Charakteryzacja i obserwacja stanów nietolerancji glukozy;
- Rozpoznawanie i badanie przypadków insulinooporności;
- Rozpoznawanie wyspiaka (insulinoma) i innych przypadków hipoglikemii.

IV. ZAGADNIENIA DOTYCZĄCE METODY

Oznaczenie DIASource INS-IRMA jest metodą immunoradiometryczną, opartą na separacji w opłaszczonych probówkach. Mabs 1 – przeciwciała przechwytyjące – są umocowane do dolnej i wewnętrznej powierzchni plastikowej próbki. Kalibratory lub próbki, dodawane do próbek, będą na początku wykazywały niskie powinowactwo do Mabs1. Dodanie Mab2, przeciwciała sygnałowego oznakowanego ¹²⁵I zakończy etap i wyzwole reakcję immunologiczną. Po przepłukaniu, stopień radioaktywności związanej z probówką odzwierciedla stężenie antygenu. Stosowanie odmiennych Mab pozwala na uniknięcie nadmiernej czułości, powszechnie występującej w dwustronnych oznaczeniach IRMA, podobnie jak konieczności stosowania wytrząsarki lub długiej inkubacji w temperaturze 37°C.

V. DOSTARCZONE ODCZYNNIKI

Odczynniki	Zestaw 96 oznaczeń	Zestaw 4 x 96 oznaczeń	Kolor	Rekonstrukcja
 Probówki opłaszczone przeciwciałami anti-INS (przeciwciała monoklonalne)	2 x 48	8 x 48	ciemno-czerwony	Gotowe do zastosowania
 ZNACZNIK : Przeciwciała (monoklonalne) anti-INS oznakowane Jodem ¹²⁵ w buforze HEPES zawierającym bydlęcą albuminę surowiczą, azydek (0,1%), EDTA i czerwony barwnik	1 fiolka 5,5 ml 350 kBq	4 fioleki 5,5 ml 350 kBq	czerwony	Gotowe do zastosowania
 Kalibratory 0 w osoczu pochodzenia ludzkiego z tymolem	1 fiolka liofil.	2 fioleki liofil.	żółty	Dodać 2 ml wody destylowanej
 Kalibratory N = 1 - 5 w osoczu pochodzenia ludzkiego z tymolem (dokładne wartości na etykietach fioleki)	5 fioleki liofil.	2 x 5 fioleki liofil.	żółty	Dodać 0,5 ml wody destylowanej
 Roztwór płuczący (TRIS-HCl)	1 fiolka 10 ml	4 fioleki 10 ml	brązowy	Rozcieńczyć 70x wodą destylowaną (wykorzystać mieszadło magnetyczne).
 Kontrolne 1 i 2 w osoczu pochodzenia ludzkiego z tymolem	2 fioleki liofil.	2 x 2 fioleki liofil.	srebrny	Dodać 0,5 ml wody destylowanej

Uwaga: 1. Do rozcieńczeń próbek należy stosować kalibrator zerowy.
2. 1 µIU preparatu kalibratora jest równoważne do 1 µIU WHO 66/304.

VI. MATERIAŁY WYMAGANE, ALE NIEDOSTARCZONE

Poniższe materiały są wymagane, ale nie są dostarczone w zestawie:

1. Woda destylowana
2. Pipety do dostarczania objętości: 50 µl, 500 µl, i 2 ml. (zaleca się stosowanie właściwych pipet z jednorazowymi końcówkami plastikowymi)
3. Mieszadło wirowe
4. Mieszadło magnetyczne
5. Strzykawka automatyczna o objętości 5 ml (rodzaj Cornwall) do płukania
6. Układ do aspiracji (opcjonalnie)
7. Może być wykorzystywany jakikolwiek licznik gamma odpowiedni do pomiaru ¹²⁵I (minimalny uzysk 70%).

VII. PRZYGOTOWANIE ODCZYNNIKÓW

- A. Kalibratory:** Rekonstruować kalibrator 0 przy pomocy 2 ml wody destylowanej a inne kalibratory przy pomocy 0,5 ml wody destylowanej.
- B. Kontrolne:** Kontrolne należy rekonstruować przy pomocy 0,5 ml wody destylowanej.
- C. Roboczy roztwór płuczący:** Właściwą objętość roboczego roztworu płuczającego należy przygotować dodając 69 objętości wody destylowanej do 1 objętości roztworu płuczającego (70x). Do homogenizacji należy wykorzystać mieszadło magnetyczne. Niewykorzystany roboczy roztwór płuczający należy wylać pod koniec dnia.

VIII. PRZECHOWYWANIE I DATA WAŻNOŚCI ODCZYNNIKÓW

- Przed otwarciem lub rekonstrukcją wszystkie składniki zestawu zachowują trwałość do daty ważności przedstawionej na etykiecie, jeżeli są przechowywane w temperaturze od 2 do 8°C.
- Po rozpuszczeniu, kalibratory i kontrolne zachowują stabilność przez 3 dni w temperaturze od 2 do 8°C. W razie konieczności dłuższego przechowywania, niewielkie objętości powinny być przechowywane w temperaturze -20°C dla maksymalnie 3 miesiące.
- Świeżo przygotowany roboczy roztwór płuczający powinien być wykorzystany w tym samym dniu.
- Po jego pierwszym zastosowaniu, znacznik izotopowy zachowuje trwałość do podanej daty ważności jeżeli jest przechowywany w oryginalnej, dobrze zamkniętej fiolece w temperaturze od 2 do 8°C.
- Zmiany w wyglądzie fizycznym odczynników w zestawie mogą wskazywać na ich niestabilność lub zużycie.

IX. POBIERANIE I PRZYGOTOWANIE MATERIAŁU DO BADANIA

- Próbkę surowicy muszą być przechowywane w temperaturze 2 - 8°C.
- Jeżeli oznaczenie nie jest wykonywane w ciągu 24 godzin, zaleca się przechowywanie w temperaturze -20°C.
- Unikać powtarzanych cykli zamrażania i rozmrażania.
- Nie wolno wykorzystywać próbek shemolizowanych.

X. PROCEDURA

A. Uwagi dotyczące obsługi

Nie wolno wykorzystywać składników zestawu po upływie daty ważności. Nie wolno mieszać materiałów pochodzących z różnych serii zestawów. Przed wykorzystaniem wszystkie odczynniki powinny osiągnąć temperaturę pokojową. Wszystkie odczynniki i próbki należy dokładnie wymieszać przez delikatne potrząsanie lub obracanie. Aby uniknąć zanieczyszczenia krzyżowego do dodawania poszczególnych odczynników i próbek należy wykorzystywać czyste, jednorazowe końcówki pipet. Pipety wysokiej precyzji lub pipety automatyczne poprawiają precyzję wykonania oznaczenia. Przestrzegać czasów inkubacji. Przygotować krzywą kalibracyjną dla każdego cyklu pomiarowego, nie wolno wykorzystywać danych z poprzednich oznaczeń.

B. Procedura

1. Dla każdego kalibratora, próbki i kontroli należy oznaczyć opłaszczone probówki w badaniach podwójnych. W celu określenia całkowitych zliczeń należy oznaczyć 2 zwykłe probówki.
2. Szybko wymieszać wirując: kalibratory, próbki i kontrolne, i dozować po 50 µl każdej substancji do odpowiednich próbek.
3. Dozować 50 µl znacznika do każdej próbki.
4. Delikatnie potrząsać (ręcznie) stojak z probówkami, aby uwolnić wszelkie, uwięzione pęcherzyki powietrza.
5. Inkubować przez 120 minut w temperaturze pokojowej.
6. Aspirować (lub odlać) zawartość każdej próbki (z wyjątkiem próbek do całkowitego zliczenia). Aby usunąć cały płyn należy upewnić się, że plastikowa końcówka aspiratora osiągnęła dno opłaszczonej próbki.
7. Przepłukać probówkę przy pomocy 2 ml roboczego roztworu płuczającego (z wyjątkiem próbek do całkowitego zliczenia). W trakcie dodawania roboczego roztworu płuczającego należy unikać wytwarzania piany.
8. Aspirować (lub odlać) zawartość każdej próbki (z wyjątkiem próbek do całkowitego zliczenia).
9. Ponownie przepłukać probówkę przy pomocy 2 ml roztworu płuczającego (z wyjątkiem próbek do całkowitego zliczenia) i aspirować (lub odlać).
10. Po ostatnim płukaniu, pozostawić probówki w pozycji stojącej do góry na dwie minuty i aspirować pozostałe krople płynu.
11. Zliczać probówki w liczniku gamma przez 60 sekund.

XI. OBLICZANIE WYNIKÓW

1. Obliczyć średnią oznaczeń podwójnych.
2. Na papierze milimetrowym lub w kratkę wykreślić c.p.m. (rzędna) dla każdego kalibratora wobec odpowiadającego stężenia INS (odcietą) oraz wykreślić krzywą kalibracji przez punkty kalibratora, odrzucając oczywiste wartości odbiegające od linii środkowej.
3. Odczytać stężenie dla każdej kontroli i próbki przez naniesienie na krzywą kalibracyjną.
4. Redukcja danych przy pomocy komputera pozwoli uprościć te obliczenia. Jeżeli ma być zastosowane automatyczne przetwarzanie wyników, zaleca się dopasowanie krzywej logistycznej 4 parametrowej.

XII. PRZYKŁAD DANYCH TYPOWYCH

Poniższe dane są przedstawione wyłącznie w celach przykładowych i nie powinny być nigdy stosowane zamiast rzeczywistych krzywych kalibracyjnych.

INS-IRMA		cpm	B/T (%)
Zliczanie całkowite		129481	100
Kalibrator	0,0 µIU/ml	197	0,15
	5,7 µIU/ml	529	0,41
	13,5 µIU/ml	1277	0,99
	46,0 µIU/ml	4796	3,70
	144,0 µIU/ml	16436	12,69
	440,0 µIU/ml	44090	34,05

XIII. DZIAŁANIE I OGRANICZENIA

A. Granica wykrywania

Dwadzieścia kalibratorów zerowych oznaczano wraz z zestawem innych kalibratorów. Granica wykrywania, zdefiniowana jako odmienne stężenie dwóch odchyłeń standardowych powyżej przeciętnej wartości zliczania przy wiązaniu zerowym kształtowała się na poziomie 1 µIU/ml.

B. Swoistość

Dodawano hormony reagujące krzyżowo do kalibratora o wysokim poziomie (100 µIU/ml lub 4 ng/ml). Oznaczano przybliżoną odpowiedź INS. Jak przedstawiono, insuliny zwierzęce (z wyjątkiem insuliny szczurzej) reagują krzyżowo, podczas gdy proinsuliny ludzkie, wieprzowe i wołowe nie przejawiają reakcji krzyżowej.

Dodany analiz do surowicy o wysokim poziomie		Teoretyczne wartości INS (ng/ml)	Obserwowane wartości INS (ng/ml)	Reakcja krzyżowa (%)
Insulina wieprzowa	8 ng/ml	4,2	17,4	> 100
Insulina bydłęca	8 ng/ml	3,8	17,8	> 100
Insulina psia	16 ng/ml	4,2	17,2	81
Insulina królicza	16 ng/ml	4,2	14,1	62
Insulina szczurza	16 ng/ml	3,8	3,7	0,6
Proinsulina ludzka	32 ng/ml	4,3	4,4	0,3
Proinsulina wieprzowa	16 ng/ml	4,3	4,7	2,5
Proinsulina wołowa	16 ng/ml	4,3	4,4	0,6

C. Precyzja

W SERII				POMIĘDZY SERIAMI			
Surowica	N	X ± S.D. (µIU/ml)	CV %	Surowica	N	X ± S.D. (µIU/ml)	CV %
A	10	6,6 ± 0,1	2,1	A	20	14,4 ± 0,9	6,5
B	10	53,3 ± 0,8	1,5	B	20	100,4 ± 6,1	6,1

SD Odchylenie standardowe; CV: Współczynnik zmienności

D. Dokładność

BADANIE ODZYSKU

Próbka	INS dodana (µIU/ml)	INS odzyskany (µIU/ml)	Odzysk (%)
Surowica 1	245.0	264	107.8
Surowica 2	76	73.5	96.7
Surowica 3	24.5	24.4	99.6
Surowica 4	6.75	6.5	96.3

BADANIE ROZCIĘCZENIA

Próbka	Rozcieńczenie	Stęż. teoretyczne (µIU/ml)	Stęż. zmierzone (µIU/ml)
Surowica 1	1/1	-	101
	1/2	50.5	46
	1/4	25.3	21
	1/8	12.6	11
	1/16	6.3	6.2
Surowica 2	1/1	-	328
	1/2	164	152
	1/4	82	76
	1/8	41	36
	1/16	20.5	18

Próbki zostały rozcieńczone przy pomocy kalibrator zerowy

E. Opóźnienie pomiędzy oznaczeniem ostatniego kalibratora i dozowaniem próbki

Jak wykazano, wyniki pomiaru pozostają dokładne nawet wówczas, gdy od momentu dodania kalibratora do oplaszczonych probówek minęło 30 minut.

OPÓŹNIENIE

	0' (µIU/ml)	30' (µIU/ml)
Surowica 1	8	7
Surowica 2	16	17
Surowica 3	37	42
Surowica 4	81	82

F. Efekt hook'a

Próbka nasycona INS o stężeniu do 125000 µIU/ml daje wyższe wartości zliczeń niż ostatni punkt kalibracyjny.

XIV. OGRANICZENIA

- Próbki od pacjentów, którzy w celach diagnostycznych lub terapeutycznych otrzymywali preparaty z mysich przeciwciał monoklonalnych, mogą zawierać ludzkie przeciwciała anty-mysie (HAMA). Próbki takie, oznaczane z użyciem zestawów testowych wykorzystujących mysie przeciwciała monoklonalne, mogą wykazywać wartości fałszywie zawyżone lub zaniżone.
- Tego samego typu interferencje w oznaczeniach immunologicznych mogą być spowodowane obecnością przeciwciał heterofilnych, czynników reumatoidalnych i (lub) AIA (przeciwciał przeciwko insulinie).
- Jeżeli wyniki nie są zgodne z obserwacjami klinicznymi, przed postawieniem rozpoznania powinny być uzyskane dodatkowe informacje.

XV. WEWNĘTRZNA KONTROLA JAKOŚCI

- Jeżeli wyniki uzyskane dla kontroli 1 i/lub 2 nie znajdują się w zakresie określonym na etykiecie fiołki, wyniki nie mogą zostać wykorzystane dopóki nie uda się znaleźć właściwego wyjaśnienia tego odchylenia.
- Jeżeli to konieczne, każde laboratorium może wykonać własne próbki zbiorcze w celach kontrolnych, które powinny być zamrożone w małych objętościach. Nie wolno zamrażać i rozmrażać więcej niż dwukrotnie. Nie wolno rozmrażać i zamrażać częściej niż dwukrotnie.

- Dopuszczalne kryteria dotyczące różnicy pomiędzy wynikami oznaczeń podwójnych próbek powinny być zgodne z zasadami prawidłowej pracy w laboratorium.

XVI. ZAKRESY REFERENCYJNE

Zakres poziomów insuliny u 55 osób o normalnej tolerancji na test glukozy podawanej doustnie wyniósł 4 do 16 μ IU/ml. Wartości te są podane jedynie dla orientacji; każde laboratorium powinno opracować swoje własne zakresy wartości prawidłowych.

XVII. ŚRODKI OSTROŻNOŚCI I OSTRZEŻENIA

Bezpieczeństwo

Tylko do diagnostyki *in vitro*.

Zestaw zawiera 125 I (Okres połowicznego rozpadu: 60 dni), emitujący promieniowanie jonizujące X (28 keV) i γ (35,5 keV).

Ten produkt radioaktywny może być transportowany i wykorzystany wyłącznie przez osoby autoryzowane; zakup, przechowywanie, stosowanie i wymiana produktów radioaktywnych podlega regulacjom prawnym kraju użytkownika końcowego. W żadnym wypadku produkt nie może być podawany ludziom lub zwierzętom.

Obsługa materiałów radioaktywnych powinno być przeprowadzana w miejscach do tego przeznaczonych, z dala od miejsc ogólnej użyteczności. W laboratorium musi być przechowywany rejestr przyjęć i przechowywania materiałów radioaktywnych. Wyposażenie laboratorium oraz szkło, które może być skażone substancjami radioaktywnymi powinno być oddzielone w celu uniknięcia krzyżowego zanieczyszczenia różnych radioizotopów.

Wszelkie plamy z substancji radioaktywnych muszą być natychmiast oczyszczone zgodnie z procedurami dotyczącymi bezpieczeństwa radiologicznego. Odpady radioaktywne muszą być usuwane zgodnie z miejscowymi przepisami i ogólnie przyjętymi wytycznymi obowiązującymi w laboratorium. Przestrzeganie podstawowych zasad bezpieczeństwa radiologicznego zapewnia wystarczające zabezpieczenie.

Składniki zawierające ludzką krew, dostarczone w zestawie, zostały przebadane metodami zaaprobowanymi przez instytucje europejskie i/lub FDA. Stwierdzono, że nie zawierają one HbsAg, przeciwciał anti-HCV, anti-HIV-1 i 2. Żadna ze znanych metod nie może dać całkowitej pewności że materiały pochodzenia ludzkiego nie przeniosą czynników zakaźnych wirusowego zapalenia wątroby, AIDS i innych. Dlatego postępowanie z odczynnikami i próbkami surowicy lub osocza powinno być zgodne z miejscowymi procedurami dotyczącymi bezpieczeństwa.

Produkty pochodzenia zwierzęcego były pobierane od zdrowych zwierząt. Składniki bydłace pochodzą z krajów, w których nie odnotowano występowania BSE. Pomimo to, składniki zawierające substancje pochodzenia zwierzęcego powinny być traktowane jako potencjalnie zakaźne.

Unikać kontaktu skóry z odczynnikami (zawierają azydek sodowy jako środek konserwujący). Azydek znajdujący się w zestawie może reagować z miedzią i ołowiem w układzie kanalizacyjnym tworząc związki o właściwościach wybuchowych. W czasie płukania odprowadzany płyn należy płukać dużymi objętościami wody, aby zapobiec kumulacji azydków.

Nie wolno palić, spożywać napojów ani pokarmów, bądź używać kosmetyków w miejscu pracy. Nie pipetować ustami. Zakładać ubranie ochronne i rękawiczki jednorazowe.

XVIII. BIBLIOGRAFIA

- FLIER, J.S., KAHN, C.R. and ROTH, J. (1979). **Receptors, antireceptor antibodies and mechanisms of insulin resistance.** N. Engl. J. Med., 300; 8:413-419.
- FRIER, B.M., ASHBY, J.P., NAIRN, I.M. and BAIRS, J.D. (1981). **Plasma insulin, C-peptide and glucagon concentrations in patients with insulin-dependent diabetes treated with chlorpropamide.** Diab. Metab., 7;1:45-49.
- JUDZEWITSCH, R.G., PFEIFER, M.A., BEST, J.D., BEARD, J.C., HALTER, J.B. and PORTE D.Jr. (1982). **Chronic chlorpropamide therapy of non-insulin-dependent diabetes augments basal and stimulated insulin secretion by increasing islet sensitivity to glucose.** J.Clin. End. and Metab., 55;2:321-328.
- KOSAKA, K., HAGURA, R. and KUZUYA, T. (1977).

Insulin responses in equivocal and definite diabetes, with special reference to subjects who had mild glucose intolerance but later developed definite diabetes.

Diabetes, 26;10:944-952.

- STARR, J.I., MAKO, M.E., JUHN, D. and RUBENSTEIN, A.H. (1978). **Measurement of serum proinsulin-like material : cross-reactivity of porcine and human proinsulin in the insulin radioimmunoassay.** J. Lab. Clin. Med., 91;4:691-692.
- TEMPLE, R.C., CARRINGTON, C.A., LUZIO, S.D., OWENS, D.R., SCHNEIDER, A.E., SOBEY, W.J., HALES, C.N. (1989). **Insulin deficiency in non-insulin-dependent diabetes.** The Lancet, Feb.11:293-295.
- TEMPLE, R.C., CLARK, P.M., NAGI, D.K., SCHNEIDER, A.E., YUDKIN, J.S., HALES, C.N. (1990). Clin. Endocrin., 32:689-693.
- TEMPLE, R.C., CLARK, P.M., HALES, C.N. (1992). **Measurement of insulin secretion in type 2 diabetes : problems and pitfalls.** Diabetic medicine, 9:503-512.
- CLARK, P. (1993) **Evaluation of Medgenix Insulin-Irma.** Addenbrooke's Hospital Cambridge, UK.

XIX. PODSUMOWANIE PROTOKOŁU

	CAŁKOWITA LICZBA ZLICZEŃ ml	KALIBRATORY ml	PRÓBKA(I) ml
Kalibratory (0-5)	-	0,05	-
Próbki	-	-	0,05
Znacznik izotopowy	0,05	0,05	0,05
Inkubacja	120 minut w temperaturze pokojowej		
Rozdzielenie	-	aspiracja (lub odlewanie)	
Roztwór płuczący	-	2,0	
Rozdzielenie	-	aspiracja (lub odlewanie)	
Roztwór płuczący	-	2,0	
Rozdzielenie	-	aspiracja (lub odlewanie)	
Zliczanie	Zliczanie próbek przez 60 sekund		

Nr katalogowy DIAsource KIP1251 – KIP1254	Nr aktualizacji : 200224-1
--	-------------------------------

Data wydania : 24/02/2020



bu

Прочетете целия протокол преди употреба

INS-IRMA

I. УПОТРЕБА

Имунорадиометричен набор за количествени измервания in vitro на човешки инсулин (INS) в серум.

II. ОБЩА ИНФОРМАЦИЯ

A. Патентовано име:	DIAsource INS-IRMA Kit		
B. Каталоген номер:	KIP1251:	96 теста	
	KIP1254:	4 x 96 теста	
C. Произведено от:	DIAsource ImmunoAssays S.A. Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.		

За техническа помощ или поръчка:
Тел.: +32 (0)10 84.99.11 Факс: +32 (0)10 84.99.91

III. КЛИНИЧЕН ПРЕГЛЕД

A. Биологична активност на инсулина

Инсулинът е полипептиден хормон с молекулно тегло 5800, който се секретира от бета клетките на Лангерхансовите острови на панкреаса. Инсулинът има широк кръг от биологични ефекти. Той стимулира усвояването на глюкозата от клетките, окислението на глюкозата, гликогенезата, липогенезата, протеиногенезата и формирането на ДНК и РНК. Инсулинът играе ключова роля в регулирането на плазмените нива на глюкозата (потискане на чернодроната продукция и стимулиране на периферното усвояване на глюкозата). На последващите хипогликемични ефекти на инсулина се противопоставят хормони с хипергликемичен ефект (глюкагон, растежен хормон, кортизол, адреналин). Инсулиновата секреция се контролира основно от нивата на плазмената глюкоза: хипергликемията индуцира бързо и сигнификантно нарастване на инсулиновите нива в кръвообращението. Влиянието на нервната система, както и участието на различни метаболитни и хормонални фактори (аминокиселини, глюкагон, гастроинтестинални хормони) оказват контрол върху инсулиновата секреция. Захарният диабет тип I (инсулино-зависим тип: "ювенилен") се дължи на разрушаване на бета клетките с последваща пълна липса на инсулин. При тип II (неинсулино-зависим тип: "с начало в зряла възраст"), инсулиновата резистентност вероятно играе важна роля, но независимо от това, след няколко години на еволюция може да настъпи недостатъчност на бета клетките, която да доведе до относителна инсулинопения, изискваща в някои случаи приложението на инсулин. Инсулиновата резистентност е свързана с високи нива на хормона в кръвообращението. Инсулиновата резистентност се среща най-често при затлъстяване. Различните ендокринологични заболявания (акромегалия, синдром на Къшинг) както и редките случаи на дефекти на рецептора за инсулин или наличие на антитела срещу инсулиновия рецептор са свързани с нарушен глюкозен толеранс или дори с диабет, дължащ се на инсулинова резистентност. Определянето на плазмените нива на инсулина е важен показател за диагностициране на хипогликемията. Инсулиновите нива са високи в случаите на инсулином (тумор на бета клетките). Функционалната постпрандиална хипогликемия може също да бъде свързана както с неправилно отделяне на инсулина, така и с неправилно усвояване на въглехидратите. Инсулиновите нива се определят или на гладно, или по време на динамичен тест:

- стимулационен тест : богата на въглехидрати храна , орален глюкозо толерантен тест (ОГТТ), инфузия на аргинин, прием на толбутамид или друго сулфониурейно средство.
- тест с потискане : гладуване, инфузия на соматостатин.


B. Клинично приложение на определянето нивата на инсулина

- Определяне на резерва от бета клетки по време на оралния глюкозо толерантен тест или след прием на богата на въглехидрати храна като насока за възстановяване на инсулиновата терапия;
- Допринася за диагностицирането на инсулинозависим и неинсулинозависим диабет;
- Характеризиране и проследяване на състоянията на нарушен глюкозен толеранс;
- Диагностициране и изследване на случаите на инсулинова резистентност;
- Диагностициране на инсулином и други случаи на хипогликемия.

IV. ПРИНЦИПИ НА МЕТОДА

DIAsource INS-IRMA е имунорадиометрично изследване на база на сепарация на покрити епруветки. Mabs1 (моноклонални антитела 1), които са прихващащи антитела, са разположени по долната и вътрешната повърхност на пластмасовата епруветка. Калибраторите или пробите, които се добавят към епруветките отначало показват слаб афинитет към Mabs1. Добавянето на Mabs2, които са сигнални антитела, маркирани с ¹²⁵I, завършват системата и пускат в ход имунологичната реакция. След измиване остатъчната радиоактивност, свързана с епруветката, отразява антигенната концентрация. Посредством употребата на няколко отделни Mabs се избягва свръхчувствителността, характерна за двучастовата IRMA, както и необходимостта от уред за разклащане или инкубация при температура 37°C.

V. ИЗПОЛЗВАНИ РЕАГЕНТИ

Реагенти	Количество 96 теста	Количество 4 x 96 теста	Цвят код	Приготвяне			
 Епруветки, покрити с анти-INS (моноклонални антитела)	2 x 48	8 x 48	Тъмно червено	Готов за употреба			
<table border="1" data-bbox="55 795 247 840"> <tr> <td>Ab</td> <td>125I</td> </tr> </table> ПРОСЛЕДЯВАЩО ВЕЩЕСТВО: ¹²⁵ Iод натоварените анти-INS (моноклонални антитела) антитела в HEPES буфер със свкнски серумен албумин, азид (<0.1%), EDTA и инертна червена боя	Ab	125I	1 флакон 5.5 ml 350 kBq	4 флакона 5.5 ml 4 x 350 kBq	червен	Готов за употреба	
Ab	125I						
<table border="1" data-bbox="55 1052 247 1097"> <tr> <td>CAL</td> <td>0</td> </tr> </table> Нулев калибратор в човешка плазма и тимол	CAL	0	1 флакон лиофили зиран	2 флакона лиофили зирани	жълт	Добавете 2 ml дестилирана вода	
CAL	0						
<table border="1" data-bbox="55 1187 247 1232"> <tr> <td>CAL</td> <td>N</td> </tr> </table> Калибратор N = 1 до 5 (виж точните стойности на етикета на флаконите) в човешка плазма и тимол	CAL	N	5 флакона лиофили зирани	2 x 5 флакона лиофили зирани	жълт	Добавете 0.5 ml дестилирана вода	
CAL	N						
<table border="1" data-bbox="55 1355 279 1400"> <tr> <td>WASH</td> <td>SOLN</td> <td>CONC</td> </tr> </table> Измиващ разтвор (TRIS-HCl)	WASH	SOLN	CONC	1 флакон 10 ml	4 флакона 10 ml	кафяв	Разредете 70x с дестилирана вода (използвайте магнитен сепаратор)
WASH	SOLN	CONC					
<table border="1" data-bbox="55 1512 279 1556"> <tr> <td>CONTROL</td> <td>N</td> </tr> </table> Контроли 1 и 2 в човешка плазма с тимол	CONTROL	N	2 флакона лиофили зирани	2 x 2 флакона лиофили зирани	сребърен	Добавете 0.5 ml дестилирана вода	
CONTROL	N						

Забележка: 1. Използвайте нулевия калибратор за разреждане на пробата.
2. 1 µIU от калибрирания препарат е квивалентен на 1 µIU от WHO 66/304.

VI. СРЕДСТВА, КОИТО НЕ СЕ ОСИГУРЯВАТ

Следните материали са необходими, но не се осигуряват в набора:

1. Дестилирана вода
2. Пипети от: 50 µl, 500 µl и 2 ml (препоръчва се използването на прецизни пипети с накрайници за еднократна употреба).
3. Завихрящ смесител
4. Магнитен сепаратор
- 5 ml автоматична спринцовка (тип Cogwall) за измиване
6. Аспирационна система (по избор).
7. Всякакъв гама брояч, който може да измери употребеното количество ¹²⁵I (минимален капацитет от 70%)

VII. ПРИГОТВЯНЕ НА РЕАГЕНТА

- A. **Калибратори:** Реконституирайте нулевия калибратор с 2 ml дестилирана вода, а другия калибратор – с 0.5 ml дестилирана вода.
- B. **Контроли:** Реконституирайте контролите с 0.5 ml дестилирана вода.
- C. **Работен измиващ разтвор:** Подгответе адекватен обем от работния измиващ разтвор чрез добавянето на 69 обема дестилирана вода към 1 обем от измиващия разтвор (70x). Използвайте магнитен сепаратор, за да хомогенизирате. Изхвърлете неупотребеното количество от работния измиващ разтвор в края на деня.

VIII. СЪХРАНЕНИЕ И СРОК НА ГОДНОСТ НА РЕАГЕНТИТЕ

- Всички компоненти на кита са стабилни до датата на срока на годност, посочен на опаковката, при температура на съхранение от 2 °C до 8°C преди отваряне или реконституиране.
- След реконституиране, калибраторите и контролите са стабилни за срок от 3 дни при температури 2-8°C. За по-дълги периоди на съхранение трябва да се приготвят равни части и да се съхраняват при температура -20°C за максимум 3 месеца.
- Пряко приготвения Работен измиващ разтвор трябва да бъде използван същия ден.
- След първата употреба, трейсера е стабилен до изтичане срока на годност, ако се съхранява в оригиналния добре затворен флакон при температури 2-8°C.
- Промени във физическия вид на реагентите на кита индицират нестабилност или негодност.

IX. СЪБИРАНЕ НА ПРОБИТЕ И ОБРАБОТКА

- Серумът трябва да се съхранява при температури 2-8°C.
- Ако тестът не се направи в рамките на 24 часа, се препоръчва съхранение при температура -20°C.
- Избягвайте последващи цикли на замразяване-размразяване.
- Не използвайте хемолизирани проби.

X. ПРОЦЕДУРА

A. Общи бележки

Не използвайте кита или компонентите му след датата на изтичане срока на годност. Не смесвайте материали от различни партиди китове. Преди употреба оставете всички реагенти на стайна температура. Внимателно смесвайте всички реагенти с пробите чрез нежно раклащане или въртеливо размесване. За да избегнете кръстосана контаминация, използвайте чист пипетен накрайник за еднократна употреба за добавянето на всеки реагент към съответната проба. Високо прецизираните пипети или автоматичните пипети биха подобрили точността. Съобразявайте се с времето за инкубация. Подгответе калибрационна крива за всяко измерване и не използвайте данни от предишни измервания.

B. Процедура

1. Означете две по две покритите епруветки за всеки калибратор, контрола и проба. За определяне на общия брой импулси, обозначете 2 нормални епруветки.
2. Разклатете за кратко време калибраторите, контролите и пробите и разпределете по 50 µl от всяко в съответните епруветки.
3. Разпределете по 50 µl от проследяващото вещество във всяка епруветка.
4. Разтърсете нежно с ръка стойката с епруветките, за да освободите някое остатъчно въздушно мехурче.
5. Инкубирайте за 2 часа при стайна температура.
6. Аспирирайте (или прелейте) съдържанието на всяка епруветка (освен епруветките за определяне на общия брой импулси). Уверете се, че пластмасовият край на аспиратора достига дъното на покритата епруветка, за да може да отстрани цялата течност.
7. Изплакнете епруветките с 2 ml от Измиващия разтвор (освен епруветките за определяне на общия брой импулси). Избягвайте получаването на пяна по време на добавянето на Работния измиващ разтвор.
8. Аспирирайте (или прелейте) съдържанието на всяка епруветка (освен епруветките за определяне на общия брой импулси).
9. Изплакнете отново епруветките с 2 ml от Измиващия разтвор (освен епруветките за определяне на общия брой импулси) и аспирирайте (или прелейте).
10. След последното изплакване, оставете епруветките да стоят обърнати нагоре за две минути и аспирирайте останалите капчици от течността.

11. Отчетете епруветките в гама брояч за 60 секунди.

XI. ИЗЧИСЛЯВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

- Изчислете средното аритметично на резултатите, получени от две по две епруветките.
- На полулогаритмична или линейна диаграма върху графична хартия нанесете (на ординатата) броят на минута за всеки калибратор (общ брой импулси в минута) спрямо (на абсцисата) съответната концентрация на INS и начертайте калибрационна крива през калибрационните точки като не включвате точките, които очевидно не принадлежат към тази крива.
- Прочетете концентрациите за всяка контрола и проба чрез интерполиране върху калибрационната крива.
- Тези изчисления могат да се улеснят чрез асистирано редуциране на данните посредством компютър. Ако се използва автоматична обработка на резултатите, се препоръчва прилагането на 4-параметрова логистична функционална крива.

XII. ХАРАКТЕРНИ ДАННИ

Данните, изложени по-долу са само за илюстрация и никога не бива да се използват вместо истинската калибрационна крива.

INS-IRMA		срм	В/Г (%)
Общ брой		129481	100
Калибратор	0.0 µIU/ml	197	0.15
	5.7 µIU/ml	529	0.41
	13.5 µIU/ml	1277	0.99
	46.0 µIU/ml	4796	3.70
	144.0 µIU/ml	16436	12.69
	440.0 µIU/ml	44090	34.05

XIII. ИЗПЪЛНЕНИЕ И ОГРАНИЧЕНИЯ

A. Определен лимит

Двадесет нулеви калибратора са били изпитани заедно с комплект от други калибратори. Определения лимит, дефиниран като явната концентрация на две стандартни отклонения над средния брой при нулево свързване, е бил 1 µIU/ml.

B. Специфичност

Кръстосано реагиращи хормони бяха добавени към калибратор с висока стойност (100 µIU/ml или 4 ng/ml). Явният INS отговор беше измерен. Както е показано след това, животинските инсулини (с изключение на инсулина у плъхове) дава кръстосана реактивност докато човешките, свинските и говеждите проинсулини не дават кръстосана реактивност.

Добавено аналитично вещество към серума с висока концентрация		Теоретични INS стойности (ng/ml)	Установени INS стойности (ng/ml)	Кръстосана реакция (%)
Свински инсулин	8 ng/ml	4.2	17.4	> 100
Говежди инсулин	8 ng/ml	3.8	17.8	> 100
Кучешки инсулин	16 ng/ml	4.2	17.2	81
Заешки инсулин	16 ng/ml	4.2	14.1	62
Инсулин у плъхове	16 ng/ml	3.8	3.7	0.6
Човешки проинсулин	32 ng/ml	4.3	4.4	0.3
Свински проинсулин	16 ng/ml	4.3	4.7	2.5
Говежди проинсулин	16 ng/ml	4.3	4.4	0.6

C. Прецизност

ПО ВРЕМЕ НА ИЗПИТВАНЕТО				МЕЖДУ ИЗПИТВАНЕТО			
Серум	N	<X> ± SD (µIU/ml)	CV (%)	Серум	N	<X> ± SD (µIU/ml)	CV (%)
A	10	6.6 ± 0.1	2.1	A	20	14.4 ± 0.9	6.5
B	10	53.3 ± 0.8	1.5	B	20	100.4 ± 6.1	6.1

SD : Стандартно отклонение; CV: Коефициент на вариация

D. Точност

ВЪЗСТАНОВИТЕЛЕН ТЕСТ

Проба	Добавен INS (µIU/ml)	Възстановен INS (µIU/ml)	Възстановяване (%)
Серум 1	245.0	264	107.8
Серум 2	76	73.5	96.7
Серум 3	24.5	24.4	99.6
Серум 4	6.75	6.5	96.3

ТЕСТ С РАЗРЕЖДАНЕ

Проба	Разреждане	Теоретична концентрация (µIU/ml)	Измерена концентрация (µIU/ml)
Серум 1	1/1	-	101
	1/2	50.5	46
	1/4	25.3	21
	1/8	12.6	11
	1/16	6.3	6.2
Серум 2	1/1	-	328
	1/2	164	152
	1/4	82	76
	1/8	41	36
	1/16	20.5	18

Пробите са били разредени с нулев калибратор.

E. Закъснение

Както е показано по-долу, резултатите от изпитването остават точни дори когато пробата е разпределена 30 минути след като калибраторът е бил добавен към покритата епруветка.

	ОТЛОЖЕНОСТ ВЪВ ВРЕМЕТО	
	0' (µIU/ml)	30' (µIU/ml)
Серум 1	8	7
Серум 2	16	17
Серум 3	37	42
Серум 4	81	82

F. Ефект на кукичката

Една проба с добавен INS до 125000 µIU/ml сигнализира за надхвърляне на най-високата концентрация на калибратора.

XIV. ОГРАНИЧЕНИЯ

- Проби от пациенти, които са приели препарати от миши моноклонални антитела за диагностика или лечение, могат да съдържат човешки анти-миши антитела (НАМА). Тези проби могат да покажат или фалшиво повишени, или намалени стойности, когато се тестват с китове, които използват миши моноклонални антитела.
- Същият вид интерференции в имунотеста могат да бъдат индуцирани от наличието на хетерофилни антитела, ревматоидни фактори и/или AIA (антиинсулинови автоантитела).
- Ако резултатите не са съвместими с други клинични наблюдения, ще се изисква допълнителна информация преди поставяне на диагноза.

XV. ВЪТРЕШЕН КАЧЕСТВЕН КОНТРОЛ

- Ако резултатите, получени за Контрола 1 и/или Контрола 2 не са в рамките на нивото, указано на етикета на флакона, то резултатите не могат да бъдат използвани, освен ако не се предостави задоволително обяснение на това несъответствие.
- По желание, всяка лаборатория може да си направи собствен комплект от контролни проби, които трябва да се съхраняват замразени в кратни съотношения. Не подлагайте на цикъла замразяване-размразяване повече от два пъти.

- Критериите за приемане на разликата от двойните резултати на пробите трябва да се опират на Добрата Лабораторна Практика.

XVI. РЕФЕРЕНТНИ ИНТЕРВАЛИ

Границите за инсулиновите нива при 55 индивида с нормален орален глюкозо толерантен тест бяха 4 до 16 $\mu\text{IU/ml}$
Тези стойности са дадени само като насока; всяка лаборатория трябва да установи свои собствени нормални граници на стойностите.

XVII. ПРЕДПАЗНИ МЕРКИ И ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ

Безопасност

Само за *in vitro* диагностика.

Този набор съдържа ^{125}I (полуживот: 60 дни), емитиращ йонизиращи X (28 keV) и γ (35.5 keV) лъчения.

Този радиоактивен продукт може да се пренася и да се използва само от оторизирани лица; покупката, съхранението, употребата и размяната на радиоактивни продукти са предмет на законодателството на държавата, на крайния потребител. Този продукт не бива в никакъв случай да се прилага на хора или животни.

Боравенето с радиоактивния продукт трябва да се извършва в определена за целта територия, далеч от регулярни зони на преминаване. В лабораторията трябва да се поддържа дневник за получаването и съхранението на радиоактивни материали. Лабораторната екипировка и стъклария, които могат да бъдат контаминирани с радиоактивни субстанции, трябва да бъдат отделени с цел да се избегне кръстосана контаминация с различни радионуклиди.

Всякакви радиоактивни пръски трябва да се почистват незабавно в съответствие с процедурите за радиационна безопасност. Радиоактивните отпадъци трябва да се изхвърлят, следвайки местните наредби и ръководства на властите, упражняващи юрисдикцията, над лабораториите. Придържането към основните правила за радиационна безопасност осигуряват адекватна защита.

Човешките кръвни компоненти, включени в кита, са били тествани чрез одобрени от Европейски и/или FDA (Американска агенция по храните и лекарствата) методи и са дали отрицателен резултат за HbsAg, анти-HCV, анти-HIV-1 и 2. Няма известен метод, който да дава пълна гаранция за това, че човешките кръвни деривати не пренасят хепатит, СПИН или други инфекции. Ето защо, боравенето със реагентите, серумните или плазмените проби трябва да бъде в съответствие с местните процедури по безопасност.

Всички животински продукти и деривати са били събрани от здрави животни. Волските компоненти са с произход от страни, където BSE (волска серумна енцефалопатия) не е била установявана. Независимо от това, компонентите, съдържащи животински субстанции трябва да се третираят като потенциално инфекциозни.

Избягвайте какъвто и да било кожен контакт с реагентите (съдържат натриев азид като консервант). Азидът в този кит може да реагира с оловото и медта във водопроводните инсталации като по този начин се получават силно експлозивни метални азиди. По време на измивния етап, промийте със силна и обилна струя вода канализацията, за да избегнете формирането на азиди.

Не пушете, не пийте, не яжте и не си слагайте козметика в работната територия. Не пипетирайте с уста. Използвайте защитно облекло и ръкавици за еднократна употреба.

XVIII. БИБЛИОГРАФИЯ

- FLIER, J.S., KAHN, C.R. and ROTH, J. (1979).
Receptors, antireceptor antibodies and mechanisms of insulin resistance.
N. Engl. J. Med., 300; 8:413-419.
- FRIER, B.M., ASHBY, J.P., NAIRN, I.M. and BAIRS, J.D. (1981).
Plasma insulin, C-peptide and glucagon concentrations in patients with insulin-dependent diabetes treated with chlorpropamide.
Diab. Metab., 7;1:45-49.
- JUDZEWITSCH, R.G., PFEIFER, M.A., BEST, J.D., BEARD, J.C., HALTER, J.B. and PORTE D.Jr. (1982).
Chronic chlorpropamide therapy of non-insulin-dependent diabetes augments basal and stimulated insulin secretion by increasing islet sensitivity to glucose.
J.Clin. End. and Metab., 55;2:321-328.

- KOSAKA, K., HAGURA, R. and KUZUYA, T. (1977).
Insulin responses in equivocal and definite diabetes, with special reference to subjects who had mild glucose intolerance but later developed definite diabetes.
Diabetes, 26;10:944-952.
- STARR, J.I., MAKO, M.E., JUHN, D. and RUBENSTEIN, A.H. (1978).
Measurement of serum proinsulin-like material : cross-reactivity of porcine and human proinsulin in the insulin radioimmunoassay.
J. Lab. Clin. Med., 91;4:691-692.
- TEMPLE, R.C., CARRINGTON, C.A., LUZIO, S.D., OWENS, D.R., SCHNEIDER, A.E., SOBEY, W.J., HALES, C.N. (1989).
Insulin deficiency in non-insulin-dependent diabetes.
The Lancet, Feb.11:293-295.
- TEMPLE, R.C., CLARK, P.M., NAGI, D.K., SCHNEIDER, A.E., YUDKIN, J.S., HALES, C.N. (1990).
Clin. Endocrin., 32:689-693.
- TEMPLE, R.C., CLARK, P.M., HALES, C.N. (1992).
Measurement of insulin secretion in type 2 diabetes : problems and pitfalls.
Diabetic medicine, 9:503-512.
- CLARK, P. (1993)
Evaluation of Medgenix Insulin-Irma.
Addenbrooke's Hospital Cambridge, UK.

XIX. ОБОБЩЕНИЕ НА ПРОТОКОЛА

	ОБЩА АКТИВНОСТ ml	КАЛИБРАТОРИ ml	ПРОБА (И) ml
Калибратори (0-5) Проби Трейсьър	- 0.05	0.05 - 0.05	- 0.05 0.05
Инкубация	2 часа при стайна температура		
Сепарация Измиващ разтвор Сепарация Измиващ разтвор Сепарация	- - - - -	аспирирайте (или прелейте) 2.0 аспирирайте (или прелейте) 2.0 аспирирайте (или прелейте)	
Броене	Отчетете епруветките за 60 секунди		

DIAsource каталог номер: KIP 1251 – KIP 1254	Номер на ревизия: 200224-1
---	-------------------------------

Дата на ревизия: 24/02/2020

1. 제품개요

순번	항 목	내 용
1	품목명	내분비물질검사시약
2	제품명	DIAsourc INS-IRMA
3	허가번호	수인 15-289 호
4	사용목적	사람의 혈청과 혈장내 인슐린 정량측정
5	포장단위	96 테스트/키트
6	저장방법	2~8°C, 제조일로부터 49일
7	사용기한	2~8°C, 제조일로부터 49일

2. 측정원리

DIAsource INS-Irma는 피복시험관 분리법에 기초한 면역방사계수 측정법이다. 포획 항체, Mabs1은 플라스틱 시험관의 아래 내벽에 부착되어 있다. 시험관에 첨가하는 표준용액 또는 검체는 처음에는 Mabs1에 대한 낮은 친화도를 보일 것이다. ¹²⁵I로 표지된 signal 항체인 MAb2의 첨가로 실험순서가 완료되며 면역학적 반응을 야기할 것이다. 세척 후, 시험관에 부착된 잔여 방사능은 항원 농도를 반영한다. 2 site IRMA가 일반적인 shaking나 37°C에서의 배양의 필요성과 마찬가지로 서로 다른 몇개의 Mab을 사용하는 것은 과도한 특이성을 방지한다.

3. 제공되는 시약

번호	명칭	구성	Colour Code
1	Coated tube	2 X 48	Dark red
2	Tracer ¹²⁵ I labelled Anti-INS	1 vial, 5.5ml	Red
3	Calibrator 0	1 vial, 동결건조	Yellow
4	Calibrator 1-5	5 vial, 동결건조	Yellow
5	Wash Solution	1 vial, 10ml	Brown
6	Control I, II	2 vial, 동결건조	Silver

3. 측정방법

1) 검체 준비

- 혈청은 2-8°C에서 보관한다.
- 측정이 24시간 안에 이루어지지 않는다면 혈청과 혈장 검체는 -20°C에 저장해야 한다.
- 반복적인 냉,해동은 피한다.

2) 시약 조제

- 표준용액 : 표준용액 0번은 2ml의 증류수로 재구성하고 나머지 표준용액은 0.5ml의 증류수로 재구성한다.
- 정도관리 용액: 0.5 ml의 증류수로 재구성한다.
- 세척액 : 70배로 희석한다. 균질화하기 위해 마그네트 교반기를 이용한다.

3) 검사 방법 (* 자동화 장비: Gamma Pro)

- 각 재구성 한 표준용액, 정도관리 용액, 트레이서를 pipeting stage에 준비한다.
- 검체를 50ul씩 준비하여 시험관 랙에 준비한다.
- 50ul의 표준용액, 정도관리용액, 트레이서 50ul를 차례대로 니들이 흡입 후, 검체가 든 시험관에 분주한다. 준비된 시험관에 차례대로 분주한다.
- 분주가 끝난 시험관은 incubation stage 로 옮겨져 2 시간동안 반응한다.
- 반응이 끝난 후 rinsing stage로 옮겨져 2ml의 세척액으로 각 시험관이 세척되고 모두 흡입단계까지 이루어진다.
- 시험관이 detection stage로 옮겨져 시험관의 결과 값을 읽어낸다.

4) 결과판정

- 자료처리
 - 중복 측정값의 평균값을 구한다.
 - INS 농도에 대한 각각의 표준용액에서 얻어진 cpm으로 semi logarithmic 또는 linear 그래프에 표준곡선을 그린다.
 - 각 정도관리용액과 검체에 대해서 표준곡선에 삽입함으로써 농도를 판독한다.
- 참고치
정상값은 4~16 IU/ml 이다.

5. 완제품 시험규격

1) 외관검사

제조원의 품질관리표준지침서(문서번호 POCQ075)에 따라 시험하고, 확인양식(문서번호 FTPK004)에 기입하고 확인한다.

- 문서번호 ITPKIP1251 에 기입된 대로 구성품이 일치하는지 확인한다
- 제품 구성품의 lot와 키트안의 구성품이 일치하는지 확인
- 구성품과 키트의 유효기간을 확인
- 구성품의 라벨상태를 확인
- 구성품의 포장상태를 확인(용량, 물질 등)
- 서류가 맞게 있는지 확인(사용설명서, 품질서류 등)
- 박스에 라벨이 정확히 부착되어 있는지 확인
- 검사 후 담당자는 확인양식(FTPK004)에 기입하고 서명한다.

2) 성능시험 (제조원의 품질관리 표준지침서(문서번호 POCQ006)에 따라 시험한다.

- 총 계수는 허용범위 (140,000-180,000 cpm)내에 있어야 한다
- 표준용액 0의 결합률은 허용범위(na-0.28%) 내에 있어야 한다
- 표준용액 1의 결합률은 허용범위(0.17-0.79%) 내에 있어야 한다
- 표준용액 5의 결합률은 허용범위(44.47-65.42%) 내에 있어야 한다
- 키트 정도관리용액에서 얻어진 값이 허용범위 내에 있어야 한다
control I 14.0-26.0 uIU/ml
control II 56.0-104 uIU/ml
- 표준물질은 허용범위 내에 있어야 한다
Calibrator 1 : 3.50-6.50 uIU/ml
Calibrator 2 : 8.4-15.6 uIU/ml
Calibrator 3 : 28-52 uIU/ml
Calibrator 4 : 84-156 uIU/ml
Calibrator 5 : 294-546 uIU/ml
비고 : 각 로트의 허용범위는 방사면역 측정을 위한 표준지침서(문서번호 CACQKIP1251)에 기록되어 있다.
(허용범위는 평균값의 ±3SD를 기준으로 측정된다).

6. 사용시 주의사항

- 체외진단용으로만 사용하여야 하며, 체외진단용 이외 흡입이나 체내 투여 등을 금지한다.
- 동 제품에 포함된 방사성동위원소 취급 시 다음 사항을 준수하여야 한다.
 - 방사성동위원소는 지정된 장소에 보관하며, 관련 법령에 따라 자격을 갖춘자가 지정된 장소에서 사용한다.
 - 방사성동위원소를 취급할 때 안전에 영향을 주는 불필요한 행동을 하지 않는다. (예, 음식 섭취, 흡연, 화장 등)
 - 방사성동위원소를 포함한 시약을 분주해야 하는 경우, 입으로 파이펫팅 하지 않는다.
 - 방사성동위원소를 취급할 때에는 장갑 및 실험복을 착용하며, 검사가 완료되면 손을 깨끗이 닦는다.
 - 유출된 모든 물질은 즉시 닦아 낸 후 폐기 또는 취급에 관련된 소관 법령에 따라 처리하여야 하며, 방사성 물질의 오염이나 방사성 물질 등의 분실은 관련 법령에 정한 규정된 절차에 따라 처리한다.
- 검사를 실시하기 전에 모든 제품(구성품 포함)은 해당 제품별 검사 온도 조건에 따라 실시한다.
- 그밖에 방사성동위원소의 보관, 이동, 사용 및 폐기 등 취급에 관한 사항은 관련 법규 또는 규정에 따른다.
- 본 kit 내의 혈액성분은 시험을 거쳤고 , HbsAg, 항HIV 1와 항 HIV 2에 대한 반응은 없었다. 알려져 있는 어떠한 방법으로도 간염 , AIDS, 감염성혈액 성분 같은 감염성 물질의 부재를 확인시킬 수 없다 그러므로 시약과 환자 검체의 취급은 병원내의 안전절차에 따라야 한다.
- 시약이 피부에 접촉되지 않게 하라(요오드화나트륨 방부제). 본 kit 내의 요오드화합물은 배관계통의 납과 구리와 반응하여 큰 폭발성을 가진 요오드화합물로 변화할 수 있다. 세척 단계에서 요오드화합물의 생성을 막기 위해 흐르는 물로 배수관을 씻어 내도록 한다.
- 방사성물질의 취득과 저장에 대한 일지는 실험실 내에 보관되어야 한다. 방사성 물질로 오염될 수 있는 서로 다른 방사성물질에 의한 교차 오염을 예방하기 위해 실험실 기구와 유리제품은 서로 분리 되어져야 한다.
- 방사성 물질이 쏟아진 경우에는 방사선안전 절차에 따라 즉시 제염하여야 한다. 방사성 폐기물은 특정 규정과 실험실의 관할권을 가지고 있는 신고당국의 지침에 따라 처리되어 야만 한다. 방사선안전에 대한 기본 규칙의 준수는 충분한 방호를 제공한다.