



IVD

CE

# INS-ELISA

*KAP1251*

---

Version : 230123

Date of issue : 23/01/2023

Revision date: 23/01/2023

# History

---

## Summary of change:

<b>Current Version:</b> 230123
New logo



Read entire protocol before use.

## INS-ELISA

### I. INTENDED USE

Immunoenzymetric assay for the *in vitro* quantitative measurement of human Insulin (INS) in serum.

### II. GENERAL INFORMATION

- A. **Proprietary name :** DIAsource INS-ELISA Kit
- B. **Catalogue number :** KAP1251 : 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 Da, 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 oxidation, 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, epinephrin). 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 :

- a) stimulation test : carbohydrate rich meal, oral glucose tolerance test (OGTT), arginin infusion, tolbutamide or other sulfonylureas administration.
- b) 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-ELISA is a solid phase Enzyme Amplified Sensitivity Immunoassay performed on breakable microtiterplates. The assay uses monoclonal antibodies (MAbs) directed against distinct epitopes of insulin. Calibrators and samples react with the capture monoclonal antibody (MAB 1) coated on microtiter well and with a monoclonal antibody (MAB 2) labelled with horseradish peroxidase (HRP). After an incubation period allowing the formation of a sandwich: coated MAB 1 – human insulin – MAB 2 – HRP, the microtiterplate is washed to remove unbound enzyme labelled antibody. Bound enzyme-labelled antibody is measured through a chromogenic reaction. Chromogenic solution (TMB ready for use) is added and incubated. The reaction is stopped with the addition of Stop Solution and the microtiterplate is then read at the appropriate wavelength. The amount of substrate turnover is determined colourimetrically by measuring the absorbance, which is proportional to the insulin concentration.

A calibration curve is plotted and INS concentration in samples is determined by interpolation from the calibration curve.

#### V. REAGENTS PROVIDED

Reagents	96 tests Kit	Color Code	Reconstitution			
 Microtiterplate with 96 anti INS (monoclonal antibodies) coated breakable wells.	96 wells	blue	<b>Ready for use</b>			
<table border="1" data-bbox="119 907 268 958"> <tr> <td>Ab</td> <td>HRP</td> </tr> </table> Conjugate: HRP labelled anti-INS (monoclonal antibodies) in TRIS-HCl buffer with bovine serum albumin and thymol	Ab	HRP	1 vial 6 ml	red	<b>Ready for use</b>	
Ab	HRP					
<table border="1" data-bbox="129 1093 258 1122"> <tr> <td>CAL</td> <td>0</td> </tr> </table> Zero calibrator in human plasma and thymol	CAL	0	1 vial lyophilized	yellow	<b>Add 2.0 ml distilled water</b>	
CAL	0					
<table border="1" data-bbox="124 1220 263 1249"> <tr> <td>CAL</td> <td>N</td> </tr> </table> Calibrator N = 1 to 5 (see exact values on vial labels) in human plasma and thymol	CAL	N	5 vials lyophilized	yellow	<b>Add 1 ml distilled water</b>	
CAL	N					
<table border="1" data-bbox="97 1361 290 1391"> <tr> <td>WASH</td> <td>SOLN</td> <td>CONC</td> </tr> </table> Wash Solution (Tris-HCl)	WASH	SOLN	CONC	1 vial 10 ml	brown	<b>Dilute 200 x with distilled water (use a magnetic stirrer).</b>
WASH	SOLN	CONC				
<table border="1" data-bbox="124 1458 263 1487"> <tr> <td>CONTROL</td> <td>N</td> </tr> </table> Controls - N = 1 or 2 in human plasma with thymol	CONTROL	N	2 vials lyophilized	silver	<b>Add 1 ml distilled water</b>	
CONTROL	N					
<table border="1" data-bbox="119 1576 268 1606"> <tr> <td>CHROM</td> <td>TMB</td> </tr> </table> Chromogenic TMB Solution (Tetramethylbenzidine)	CHROM	TMB	1 vial 12 ml	black	<b>Ready for use</b>	
CHROM	TMB					
<table border="1" data-bbox="113 1695 274 1724"> <tr> <td>STOP</td> <td>SOLN</td> </tr> </table> Stop solution: HCl 1.0 N	STOP	SOLN	1 vial 12 ml	white	<b>Ready for use</b>	
STOP	SOLN					

- Note:**
1. Use the zero calibrator for sample dilutions.
  2. 1  $\mu$ IU of the calibrator preparation is equivalent to 1  $\mu$ IU of 2<sup>nd</sup> IRP 66/304.

#### VI. SUPPLIES NOT PROVIDED

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

1. High quality distilled water
2. Pipettes for delivery of: 50  $\mu$ l, 500  $\mu$ l and 2 ml (the use of accurate pipettes with disposable plastic tips is recommended)
3. Vortex mixer
4. Magnetic stirrer
5. Washer for Microtiterplates
6. Microtiterplate reader capable of reading at 450 nm and 650 nm (bichromatic reading)

#### VII. REAGENT PREPARATION

- Calibrators** : Reconstitute the zero calibrator with 2.0 ml distilled water and other calibrators with 1 ml distilled water.
- Controls** : Reconstitute the controls with 1 ml distilled water.
- Working Wash solution** : Prepare an adequate volume of Working Wash solution by adding 199 volumes of distilled water to 1 volume of Wash Solution (200x). 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.
- Unused wells must be stored, at 2-8°C, in a sealed bag containing a desiccant until expiration date.
- After reconstitution, calibrators and controls are stable for 1 week at 2 to 8°C. For longer storage periods, aliquots should be made and kept at -20°C. Avoid successive freeze thaw cycles.
- The concentrated Wash Solution is stable at room temperature until expiration date.
- Freshly prepared Working Wash solution should be used on the same day.
- After its first use, the conjugate 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 in aliquots at -20°C is recommended. Avoid subsequent freeze thaw cycles.
- Prior to use, all samples should be at room temperature. It is recommended to vortex the samples before use.
- 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.  
Perform calibrators, controls and samples in duplicate. Vertical alignment is recommended.  
Use a clean plastic container to prepare the Wash Solution.  
In order to avoid cross-contamination, use a clean disposable pipette tip for the addition of each reagent and sample.  
For the dispensing of the Chromogenic Solution and the Stop Solution avoid pipettes with metal parts.

High precision pipettes or automated pipetting equipment will improve the precision.

Respect the incubation times.

To avoid drift, the time between pipetting of the first calibrator and the last sample must be no longer than 30 minutes.

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

Dispense the Chromogenic Solution within 15 minutes following the washing of the microtiterplate.

During incubation with Chromogenic Solution, avoid direct sunlight on the microtiterplate.

## B. Procedure

- Select the required number of wells for the run. The unused wells should be resealed in the bag with a desiccant and stored at 2-8°C.
- Secure the wells into the holding frame.
- Pipette 50 µl of each Calibrator, Control and Sample into the appropriate wells.
- Pipette 50 µl of anti-INS-HRP conjugate into all the wells.
- Incubate for 30 minutes at room temperature
- Aspirate the liquid from each well.
- Wash the plate 3 times by:
  - dispensing 0.4 ml of Wash Solution into each well
  - aspirating the content of each well
- Pipette 100 µl of Chromogenic Solution the into each well within 15 minutes following the washing step.
- Incubate the microtiterplate for 15 minutes at room temperature .
- Pipette 100 µl of Stop Reagent into each well.
- Read the absorbances at 450 nm (reference filter 630 nm or 650 nm) within 1 hour and calculate the results as described in section XI.

## XI. CALCULATION OF RESULTS

- Read the plate at 450 nm against a reference filter set at 650 nm (or 630 nm).
- Calculate the mean of duplicate determinations.
- On semi-logarithmic or linear graph paper plot the OD values (ordinate) for each calibrator against the corresponding concentration of INS (abscissa) and draw a calibration curve through the calibrator points by connecting the plotted points with straight lines.
- 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-ELISA		OD units Polychromatic model
Calibrator	0 µIU/ml	0.025
	5.1 µIU/ml	0.070
	13.8 µIU/ml	0.13
	44.4 µIU/ml	0.507
	128 µIU/ml	1.313
	250 µIU/ml	2.34

## 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 OD at zero binding, was 0.17 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	17.4
Bovine insulin	8 ng/ml	3.8	17.8
Dog insulin	16 ng/ml	4.2	17.2
Rabbit insulin	16 ng/ml	4.2	14.1
Rat insulin	16 ng/ml	3.8	3.7
Human proinsulin	32 ng/ml	4.3	4.4
Porcine proinsulin	16 ng/ml	4.3	4.7
Bovine proinsulin	16 ng/ml	4.3	4.4

## C. Precision

INTRA ASSAY				INTER ASSAY			
Serum	N	<X> ± SD (µIU/ml)	CV (%)	Serum	N	<X> ± SD (µIU/ml)	CV (%)
A	23	13.09 ± 0.6	4.8	A	8	13.29 ± 1.08	8.1
B	23	32.9 ± 1.9	6.0	B	7	34.12 ± 3.1	9.0

SD : Standard Deviation; CV: Coefficient of variation

## D. Accuracy

### RECOVERY TEST

Sample	Added INS (µIU/ml)	Recovered INS (µIU/ml)	Recovery (%)
Serum	182.1	174.5	95.8
	86.7	80	92.3
	39.6	37.4	94.4
	15.1	13.6	90

### DILUTION TEST

Sample	Dilution	Theoretical Concent. (µIU/ml)	Measured Concent. (µIU/ml)
Serum 1	1/1	-----	82.3
	1/2	41.2	42.21
	1/4	20.6	22.86
	1/8	10.3	11.04
	1/16	5.15	5.9
	1/32	2.58	3.3
Serum 2	1/1	-----	57.5
	1/2	28.7	27.7
	1/4	14.4	14.5
	1/8	7.2	8.0
	1/16	3.6	4.4
	1/32	1.8	2.3

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 wells

	T0	10 min	20 min	30 min
C I	12.8	12.7	12.4	12.9
C II	31.3	30.7	30	28.6

## F. Hook effect

A sample spiked with INS up to 10000 µIU/ml gives higher OD's than the last calibrator point.

## XIV. 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.
- Acceptance criteria for the difference between the duplo results of the samples should rely on Good Laboratory Practises
- It is recommended that Controls be routinely assayed as unknown samples to measure assay variability. The performance of the assay should be monitored with quality control charts of the controls.
- It is good practise to check visually the curve fit selected by the computer.

## XV. REFERENCE INTERVALS

The range of insulin levels in 29 subjects with normal oral glucose tolerance tests, was 5 to 19 µIU/ml, the range is based on 2.5 to 97.5 percentiles of the dataset. These values are given only for guidance; each laboratory should establish its own normal range of values.

## XVI. PRECAUTIONS AND WARNINGS

### Safety

For *in vitro* diagnostic use only.

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 all reagents, Stop Solution contains HCl. In case of contact, wash thoroughly with water

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

## XVII. 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.

## XVIII. SUMMARY OF THE PROTOCOL

	CALIBRATORS (µl)	SAMPLE(S) CONTROLS (µl)
Calibrators (0-5) Samples, Controls Anti-INS-HRP conjugate	50 - 50	- 50 50
Incubate for 30 min at room temperature. Aspirate the contents of each well. Wash 3 times with 400 µl of Wash Solution and aspirate.		
Chromogenic Solution	100	100
Incubate for 15 min at room temperature.		
Stop Solution	100	100
Read on a microtiterplate reader and record the absorbance of each well at 450 nm (versus 630 or 650 nm)		

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

Lire entièrement le protocole avant utilisation.

## INS-ELISA

### I. BUT DU DOSAGE

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

### II. INFORMATIONS GENERALES

- A. **Nom du produit :** DIAsource INS-ELISA kit
- B. **Numéro de catalogue :** KAP1251 : 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 Da, est sécrétée par les cellules  $\beta$  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 de hypoglycémie 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  $\beta$ , 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  $\beta$  peut arriver, conduisant à une demande relative d'insulinopenia, 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  $\beta$ ). 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  $\beta$  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.



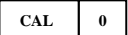


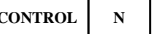
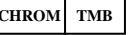
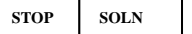


#### IV. PRINCIPES DU DOSAGE

Le kit DIAsource INS-ELISA est un « Enzyme Amplified Sensitivity Immunoassay » en phase solide effectué sur des plaques de microtitration sécables. La trousse utilise des anticorps monoclonaux (MABs) dirigés contre différents épitopes de l'insuline. Les calibrateurs et les échantillons réagissent avec l'anticorps de capture monoclonal (MAB 1) recouvrant les puits et avec un anticorps monoclonal (MAB 2) marqué avec la peroxydase (HRP). Après une période d'incubation permettant la formation d'un sandwich: MAB 1 recouvert – insuline humaine – MAB 2 – HRP, la micro-plaque est lavée afin d'enlever l'anticorps libre marqué enzymatiquement. L'anticorps lié marqué enzymatiquement est mesuré avec une réaction chromogénique. Une solution chromogénique (TMB prêt à utiliser) est ajoutée et incubée. La réaction est arrêtée avec l'addition de Solution d'arrêt et la micro-plaque est alors lue à la longueur d'onde appropriée. La quantité de remplacement de substrat est déterminée colorimétriquement par la mesure de l'absorbance, qui est proportionnelle à la concentration en insuline.

Une courbe de calibration est dessinée et la concentration en INS dans les échantillons est déterminée par interpolation de la courbe de calibration.

#### V. REACTIFS FOURNIS

Réactifs	96 tests Kit	Code Couleur	Reconstitution
 Micro-plaque de titration sécable avec 96 puits recouverts d'anti INS (anticorps monoclonal)	96 puits	bleu	Prêt à l'emploi
 Conjugué: anti-INS marqué avec de l'HRP (anticorps monoclonal) dans un tampon TRIS-HCl avec de l'albumine bovine et du thymol	1 flacon 6 ml	Rouge	Prêt à l'emploi
 Calibrateur zéro dans du plasma humain et du thymol	1 flacon lyophilisé	Jaune	Ajouter 2 ml d'eau distillée
 Calibrateur N = 1 à 5 (cfr. Valeurs exactes sur chaque flacon) dans du plasma humain et du thymol	5 flacons lyophilisés	Jaune	Ajouter 1 ml d'eau distillée
 Solution de Lavage (Tris-HCl)	1 flacon 10 ml	Brun	Diluer 200 x avec de l'eau distillée (utiliser un agitateur magnétique).
 Contrôles - N = 1 ou 2 dans du plasma humain et du thymol	2 flacons lyophilisés	Gris	Ajouter 1 ml d'eau distillée
 Chromogène TMB (Tetraméthylbenzidine)	1 flacon 12 ml	Noir	Prêt à l'emploi
 Réactif d'arrêt: HCl 1,0 N	1 flacon 12 ml	Blanc	Prêt à l'emploi

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 2<sup>nd</sup> IRP 66/304.

#### VI. MATERIEL NON FOURNI

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

- Eau distillée d'une haute qualité
- Pipettes pour distribuer: 50 µl, 500 µl et 2 ml (l'utilisation de pipettes précises et de pointes en plastique est recommandée)
- Agitateur vortex
- Agitateur magnétique
- Laveuse de microplaques

- Lecteur de microplaques capable de lire à 450 nm et 650 nm (lecture bichromatique)

#### VII. PREPARATION DES REACTIFS

- Calibrateurs** : Reconstituer le calibrateur zéro avec 2 ml d'eau distillée et les autres calibrateurs avec 1 ml d'eau distillée.
- Contrôles** : Reconstituer les contrôles avec 1 ml d'eau distillée.
- Solution de Lavage** : Préparer un volume adéquat de Solution de Lavage en ajoutant 199 volumes d'eau distillée à 1 volume de Solution de Lavage (200x). 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.
- Des puits inutilisés doivent être gardés, à 2-8°C, dans un sachet cacheté contenant un dessiccant jusqu'à la date d'expiration.
- Après reconstitution, les calibrateurs et les contrôles sont stables pendant 7 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 pendant 3 mois. Eviter des cycles de congélation et décongélation successifs.
- La Solution de Lavage concentrée est stable à température ambiante jusqu'à la date d'expiration.
- La Solution de Lavage préparée doit être utilisée le jour même.
- Avant la première utilisation, le conjugué 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 en aliquots à -20°C est recommandé.
- Eviter des cycles de congélation et décongélation successifs.
- Avant l'utilisation des échantillons, ceux-ci doivent être à température ambiante. On recommande de vortexer les échantillons avant de les utiliser.
- 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 trousse de lots différents. Mettre tous les réactifs à température ambiante avant utilisation.

Mélangez tous les réactifs et les échantillons sous agitation douce.

Tester les calibrateurs, les contrôles et les échantillons en double. Un alignement vertical est recommandé.

Utiliser un récipient en plastique propre pour préparer la Solution de Lavage.

Pour éviter toute contamination croisée, utiliser une nouvelle pointe de pipette pour l'addition de chaque réactif et échantillon.

Pour la distribution de solution du chromogène et de la Solution d'arrêt, éviter des pipettes avec des parties en métal.

Des pipettes de haute précision ou un équipement de pipetage automatique permettent d'augmenter la précision.

Respecter les temps d'incubation.

Afin d'éviter des anomalies, le délai entre le pipetage du premier calibrateur et celui du dernier échantillon ne peut pas dépasser 30 minutes.

Préparer une courbe d'étalonnage pour chaque nouvelle série d'expériences, ne pas utiliser les données d'expériences précédentes.

Distribuer la solution du chromogène dans les 15 minutes après le lavage de la micro-plaque de titration.

Eviter l'exposition à la lumière du soleil lors de l'incubation avec la solution du chromogène.

##### B. Mode opératoire

- Sélectionner le nombre de puits nécessaires pour le test. Les puits inutilisés doivent être cachetés de nouveau dans le sachet avec un dessiccant et gardés à 2-8°C.
- Placer les puits dans le support.
- Pipeter 50 µl de chaque Calibrateur, Contrôle et Echantillon dans les puits appropriés.
- Pipeter 50 µl du conjugué anti-INS-HRP dans tous les puits.

5. Incuber pendant 30 minutes à température ambiante.
6. Aspirer le liquide de chaque puits.
7. Laver la plaque 3 fois en:
  - distribuant 0.4 ml de la Solution de Lavage dans chaque puits
  - aspirant le contenu de chaque puits
8. Pipeter 100 µl de la solution chromogénique dans chaque puits dans les 15 minutes après la phase de lavage.
9. Incuber la microplaque pendant 15 minutes à température ambiante.
10. Pipeter 100 µl du Réactif d'arrêt dans chaque puits.
11. Lire les absorbances à 450 nm (filtre de référence 630 nm ou 650 nm) endéans l'heure et calculer les résultats comme décrits dans la section XI.

#### XI. CALCUL DES RESULTATS

1. Lire la plaque à 450 nm contre un filtre de référence mis à 650 nm (ou 630 nm).
2. Calculer la moyenne de chaque détermination réalisée en double.
3. Dessiner sur un graphique linéaire ou semi-logarithmique les DO (ordonnées) pour chaque calibrateur contre la concentration correspondante en INS (abscisses) et dessiner une courbe de calibration à l'aide des points de calibration, en connectant les points avec des lignes droites.
4. Lire la concentration pour chaque contrôle et échantillon par interpolation sur la courbe de calibration.
5. 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 d'étalonnage.

INS-ELISA		Unités DO modèle polychromatique
Calibrateur	0 µIU/ml	0.025
	5.1 µIU/ml	0.070
	13.8 µIU/ml	0.13
	44.4 µIU/ml	0.507
	128 µIU/ml	1.313
	250 µIU/ml	2.34

#### XIII. PERFORMANCE ET LIMITES

##### 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 DO déterminée à la fixation zéro, était de 0,17 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	> 100
Insuline bovine	8 ng/ml	3,8	> 100
Insuline canine	16 ng/ml	4,2	81
Insuline de lapin	16 ng/ml	4,2	62
Insuline de rat	16 ng/ml	3,8	0
Pro-insuline humaine	32 ng/ml	4,3	0,3
Pro-insuline porcine	16 ng/ml	4,3	2,5
Pro-insuline de boeuf	16 ng/ml	4,3	0,6

##### C. Précision

INTRA-ESSAI				INTER-ESSAI			
Sérum	N	<X> ± SD (µIU/ml)	CV (%)	Sérum	N	<X> ± SD (µIU/ml)	CV (%)
A	23	13.09 ± 0.6	4.8	A	8	13.29 ± 1.08	8.1
B	23	32.9 ± 1.9	6.0	B	7	34.12 ± 3.1	9.0

SD : Déviation Standard; CV: Coefficient de variation

#### D. Exactitude

##### TEST DE RECUPERATION

Echantillon	INS ajoutée (µIU/ml)	INS récupérée (µIU/ml)	Récupération (%)
Sérum	182.1	174.5	95.8
	86.7	80	92.3
	39.6	37.4	94.4
	15.1	13.6	90

##### TEST DE DILUTION

Echantillon	Dilution	Concent. théorique (µIU/ml)	Concent. Mesurée (µIU/ml)
Sérum 1	1/1	-----	82.3
	1/2	41.2	42.21
	1/4	20.6	22.86
	1/8	10.3	11.04
	1/16	5.15	5.9
	1/32	2.58	3.3
Sérum 2	1/1	-----	57.5
	1/2	28.7	27.7
	1/4	14.4	14.5
	1/8	7.2	8.0
	1/16	3.6	4.4
	1/32	1.8	2.3

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 ait été ajouté aux puits.

	T0	10 min	20 min	30 min
C I	12.8	12.7	12.4	12.9
C II	31.3	30.7	30	28.6

##### F. Effet crochet

Un échantillon dopé avec de l'INS jusqu'à 10.000 µIU/ml donne des DO supérieurs au dernier point de calibration.

#### XIV. CONTROLE DE 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 contrôlés, lesquels doivent être congelés aliquotés.
- Les critères d'acceptation pour les écarts des valeurs *in duplo* des échantillons doivent être basés sur les pratiques de laboratoire courantes.
- On recommande que les contrôles soient testés de façon routinière comme des échantillons inconnus pour mesurer la variabilité du test. La réalisation du test doit être suivie avec des fichiers de contrôle de qualité des contrôlés.

- On recommande de vérifier visuellement le lissage de la courbe sélectionnée par l'ordinateur.

#### XV. VALEURS ATTENDUES

Les niveaux d'insuline pour 29 sujets avec des tests de tolérance de glucose normaux, étaient de 5 à 19 µIU/ml, la portée est basée sur les percentiles de 2,5% & 97,5%.

Les valeurs sont donnés à titre d'information; chaque laboratoire doit établir ses propres écarts de valeurs.

#### XVI. PRECAUTIONS ET AVERTISSEMENTS

##### Sécurité

Pour utilisation en diagnostic *in vitro* uniquement.

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.

Éviter le contact de la peau avec tous les réactifs. La Solution d'arrêt contient de l'HCl. En cas de contact, laver avec beaucoup d'eau.

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

#### XVII. 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.

#### XVIII. RESUME DU PROTOCOLE

	CALIBRATEURS (µl)	ECHANTILLON(S) CONTROLES (µl)
Calibrateurs (0-5) Echantillons , Contrôles Conjugué Anti-INS-HRP	50 - 50	- 50 50
Incuber pendant 30 min à température ambiante. Aspirer le contenu de chaque puits. Laver 3 fois avec 400 µl de la Solution de Lavage et aspirer.		
Solution chromogénique	100	100
Incuber pendant 15 min à température ambiante.		
Solution d'arrêt	100	100
Lire sur un lecteur de micro-plaques et enregistrer l'absorbance de chaque puits à 450 nm (contre 630 ou 650 nm)		

Vor Gebrauch des Kits lesen Sie bitte diese Packungsbeilage.

# INS-ELISA

## I. VERWENDUNGSZWECK

Ein immunenzymetrisches Assay für die quantitative *in vitro* Bestimmung von humanem Insulin (INS) in Serum.

## II. ALLGEMEINE INFORMATION

- A. **Handelsbezeichnung :** DIAsource INS-ELISA Kit
- B. **Katalognummer :** KAP1251 : 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](mailto:ordering@diasource.be)**

## III. KLINISCHER HINTERGRUND

### A. *Biologische Aktivitäten von Insulin*

Insulin, ein Polypeptidhormon mit einem Molekulargewicht von 5800 Da, 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 : "juvener") 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 :

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



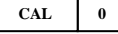
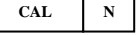

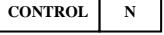
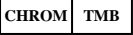
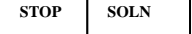
### B. *Klinische Anwendung der Insulinbestimmung*

- 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 Glucoseintoleranz;
- zur Diagnose und Untersuchung bei Fällen von Insulinresistenz;
- zur Diagnose des Insulinoms und anderer Ursachen der Hypoglykämie.

#### IV. GRUNDSÄTZLICHES ZUR DURCHFÜHRUNG

Der DIASource INS-ELISA ist ein solid phase-Enzyme Amplified Sensitive Immunoassay (ELISA) in einer portionierbaren Mikrotiterplatte. Der Assay benutzt monoklonale Antikörper (MAK), die gegen verschiedene Epitope von Insulin gerichtet sind. Kalibratoren und Proben reagieren mit dem primären monoklonalen Antikörper (MAK 1), mit dem die Wells der Mikrotiterplatte beschichtet sind, und mit einem monoklonalen Antikörper (MAK 2), der mit Meerrettich-Peroxidase (MRP) markiert ist. Nach einer Inkubationsphase bildet sich ein Sandwich-Komplex: MAK 1 - Humaninsulin - MAK 2 - MRP; nicht gebundene enzymbeschriebene Antikörper werden durch Waschen der Mikrotiterplatte entfernt. Gebundene enzymbeschriebene Antikörper werden durch eine Farbreaktion gemessen. Farblösung (gebrauchsfertiges TMB) wird hinzugefügt und inkubiert. Die Reaktion wird durch Hinzufügen einer Stopplösung beendet und die Mikrotiterplatte wird bei adäquater Wellenlänge ausgewertet. Die Menge an Substratumsatz wird kolorimetrisch durch Messung der Absorption bestimmt, die proportional zur Insulinkonzentration ist. Es wird eine Kalibrationskurve erstellt und die INS-Konzentration in den Proben wird durch Interpolation von der Kalibrationskurve bestimmt.

#### V. MITGELIEFERTE REAGENZIEN

Reagenzien	96 Tests Kit	Farb Code	Rekonstitution
 Mikrotiterplatte mit 96 anti INS- beschichtete abbrechbaren Wells (monoklonale Antikörper)	96 Wells	blau	gebrauchsfertig
 Konjugat: MRP beschriebene Anti-INS (monoklonale Antikörper) in TRIS-HCl -puffer mit Rinderserum- albumin und Thymol	1 Gefäß 6 ml	Rot	gebrauchsfertig
 Null Kalibrator in Humanplasma und Thymol	1 Gefäß lyophilisiert	Gelb	2 ml dest. Wasser zugeben
 Kalibrator - N = 1 to 5 (genaue Werte auf Gefäß-Etiketten) in Humanplasma und Thymol	5 Gefäße lyophilisiert	Gelb	1 ml dest. Wasser zugeben
 Waschlösung (Tris-HCl)	1 Gefäß 10 ml	Braun	200 x mit dest. Wasser verdünnen (Magnetrührer benutzen).
 Kontrollen - N = 1 or 2 Humanplasma und Thymol	2 Gefäße lyophilisiert	silber	1 ml dest. Wasser zugeben
 Chromogenes TMB (Tetramethylbenzidin)	1 Gefäß 12 ml	schwarz	gebrauchsfertig
 Stoppreagenz: HCl 1,0 N	1 Gefäß 12 ml	weiß	gebrauchsfertig

**Bemerkung:** 1. Benutzen Sie den Null-Kalibrator zur Probenverdünnung.  
2. 1 µIU der Kalibratorzubereitung ist äquivalent zu 1 µIU 2nd IRP 66/304.

#### VI. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL

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

1. Hochwertiges destilliertes Wasser
2. Pipetten: 50 µl, 500 µl und 2 ml (Verwendung von Präzisionspipetten mit Wegwerf-Plastikspitzen wird empfohlen)
3. Vortex Mixer

4. Magnetrührer
5. Waschgerät für Mikrotiterplatten
6. Mikrotiterplatten-Lesegerät zur Auswertung bei 450 nm und 650 nm (Bichromatische Auswertung)

#### VII. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- A. **Kalibratoren:** Rekonstituieren Sie den Null-Kalibrator mit 2 ml dest. Wasser, die anderen Kalibratoren mit 1 ml dest. Wasser.
- B. **Kontrollen:** Rekonstituieren Sie die Kontrollen mit 1 ml dest. Wasser.
- C. **Waschlösung:** Bereiten Sie ein angemessenes Volumen Waschlösung aus einem Anteil Waschlösung (200x) mit 199 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.
- Nicht verwendete Wells sollten dicht in der Folie verschlossen mit Trockenmittel bei 2° bis 8°C gelagert werden bis zum Verfallsdatum.
- Nach der Rekonstitution sind die Kalibratoren und Kontrollen bei 2°C bis 8°C 7 Tage stabil. Aliquots müssen bei längerer Aufbewahrung bei -20°C eingefroren werden, dan sind Sie 3 Monate haltbar. Vermeiden Sie wiederholtes Einfrieren und Auftauen.
- Die konzentrierte Waschlösung ist bei Raumtemperatur bis zum Verfallsdatum haltbar.
- Frisch zubereitete Waschlösung sollte am selben Tag benutzt werden.
- Nach der ersten Benutzung ist das Konjugat 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.
- Vor Gebrauch müssen alle Proben Raumtemperatur erreichen. Vortexmischen der Proben wird vor Gebrauch empfohlen.
- 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.  
Führen Sie Kalibratoren, Kontrollen und Proben doppelt aus. Vertikale Ausrichtung wird empfohlen.  
Verwenden Sie zur Zubereitung der Waschlösung reinen Kunststoffbehälter.  
Verwenden Sie saubere Wegwerf-Pipettenspitzen, um Kreuzkontamination zu vermeiden.  
Verwenden Sie zur Pipettierung der chromogene Lösung und der Stopplösung keine Pipetten mit Metallteilen.  
Präzisionspipetten oder ein automatisches Pipettiersystem erhöhen die Präzision.  
Achten Sie auf die Einhaltung der Inkubationszeiten.  
Zur Vermeidung eines Drifts dürfen zwischen der Pipettierung des ersten Kalibrators und der letzten Probe nicht mehr als 30 Minuten verstreichen.  
Erstellen Sie für jeden Durchlauf eine Standardkurve, verwenden Sie nicht die Daten von früheren Durchläufen.  
Pipettieren Sie die chromogene Lösung innerhalb von 15 Minuten nach dem Waschen der Mikrotiterplatte.  
Während der Inkubation mit der chromogene Lösung ist die Mikrotiterplatte vor direktem Sonnenlicht zu schützen.

##### B. Durchführung

1. Wählen Sie die erforderliche Anzahl der Wells für den Lauf aus. Nicht verwendete Wells sollten wieder dicht in der Folie verschlossen mit Trockenmittel bei 2° bis 8°C gelagert werden.
2. Befestigen Sie die Wells im Halterahmen.
3. Pipettieren Sie jeweils 50 µl Kalibrator, Kontrolle und Probe in die entsprechenden Wells.

4. Pipettieren Sie 50 µl Anti-INS-MRP Konjugat in alle Wells.
5. Inkubieren Sie 30 Minuten bei Raumtemperatur
6. Saugen Sie die Flüssigkeit aus jedem Well ab.
7. Waschen Sie die Platte dreimal:
  - pipettieren Sie 0,4 ml Waschlösung in jeden Well
  - saugen Sie der Inhalt jedes Wells ab
8. Pipettieren Sie 100 µl der chromogene Lösung innerhalb von 15 Minuten nach dem Waschvorgang in jeden Well.
9. Inkubieren Sie die Mikrotiterplatte 15 Minuten bei Raumtemperatur.
10. Pipettieren Sie 100 µl des Stoppreagenzes in jeden Well.
11. Werten Sie die Absorptionen bei 450 nm (Referenzfilter 630 nm oder 650 nm) innerhalb 1 Stunde aus und berechnen Sie die Resultate wie in Abschnitt XI beschrieben.

#### XI. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

1. Werten Sie die Platte bei 450 nm gegen einen Referenzfilter auf 650 nm (oder 630 nm) aus.
2. Berechnen Sie den Durchschnitt aus den Doppelbestimmungen.
3. 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 Kalibrationskurve durch die Kalibrationspunkte, indem Sie die eingetragenen Punkte durch gerade Linien verbinden.
4. Berechnen Sie die Konzentration für jede Kontrolle und Probe durch Interpolation aus der Kalibrationskurve.
5. 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-ELISA		OD Einheiten Polychromatisches Modell
Kalibrator	0 µIU/ml	0.025
	5.1 µIU/ml	0.070
	13.8 µIU/ml	0.13
	44.4 µIU/ml	0.507
	128 µIU/ml	1.313
	250 µIU/ml	2.34

#### 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 0,17 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 hochwert. Serum	Theoretische Konzent. (ng/ml)	Gemess. INS Werte (ng/ml)	Kreuzreaktivität (%)
Schweineinsulin	8 ng/ml	17.4	> 100
Rinderinsulin	8 ng/ml	17.8	> 100
Hundeinsulin	16 ng/ml	17.2	81
Kanincheninsulin	16 ng/ml	14.1	62
Ratteninsulin	16 ng/ml	3.7	0
Humanproinsulin	32 ng/ml	4.4	0.3
Schweineproinsulin	16 ng/ml	4.7	2.5
Rinderproinsulin	16 ng/ml	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	23	13.09 ± 0.6	4.8	A	8	13.29 ± 1.08	8.1
B	23	32.9 ± 1.9	6.0	B	7	34.12 ± 3.1	9.0

SD : Standardabweichung; CV: Variationskoeffizient

#### D. Genauigkeit

WIEDERFINDUNGSTEST			
Probe	Zugeg. INS (µIU/ml)	Wiedergef. INS (µIU/ml)	Wiedergefunden (%)
Serum	182.1	174.5	95.8
	86.7	80	92.3
	39.6	37.4	94.4
	15.1	13.6	90

VERDÜNNUNGSTEST			
Probe	Verdünn.	Theoret. Konzent. (µIU/ml)	Gemess. Konzent. (µIU/ml)
Serum 1	1/1	-----	82.3
	1/2	41.2	42.21
	1/4	20.6	22.86
	1/8	10.3	11.04
	1/16	5.15	5.9
	1/32	2.58	3.3
Serum 2	1/1	----	57.5
	1/2	28.7	27.7
	1/4	14.4	14.5
	1/8	7.2	8.0
	1/16	3.6	4.4
	1/32	1.8	2.3

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 Wells zugefügt wird.

	T0	10 min	20 min	30 min
C I	12.8	12.7	12.4	12.9
C II	31.3	30.7	30	28.6

#### F. Hook-Effekt

Eine Probe mit INS bis zu 10.000 µIU/ml liefert höhere Messwerte als der letzte Kalibratorwert.

#### XIV. 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.
- Akzeptanzkriterien für die Differenz zwischen den Resultaten der Wiederholungstests anhand der Proben müssen auf Guter Laborpraxis beruhen.
- Es wird empfohlen, Kontrollen im Assay routinemäßig wie unbekannte Proben zu behandeln, um die Assayvarianz zu messen. Die Leistung des Assay muss mit den Qualitätskontrollkarten der Kontrollen überprüft werden.
- Es hat sich bewährt, die durch den Computer ausgewählte Kurvenanpassung visuell zu überprüfen.

## XV. REFERENZINTERVALLE

Der Bereich des Insulinspiegels bei 29 Personen mit normalen Werten beim oralen Glukose-Toleranztest betrug 5 bis 19 µIU/ml, Bereich auf Basis der 2,5% und 97,5% Perzentile.

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

## XV. VORSICHTMASSNAHMEN UND WARNUNGEN

### Sicherheit

Nur für diagnostische Zwecke.

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 allen Reagenzien; Stopplösung enthält HCl. Bei Kontakt gründlich mit Wasser spülen.

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.

## XVII. 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.

## XVIII. ZUSAMMENFASSUNG DES PROTOKOLLS

	KALIBRATOREN (µl)	PROBE(N) KONTROLLEN (µl)
Kalibratoren (0-5) Proben, Kontrollen Anti-INS-MRP Konjugat	50 - 50	- 50 50
30 min. bei Raumtemperatur inkubieren. Inhalt jedes Wells absaugen. Dreimal mit 400 µl Waschlösung waschen und absaugen.		
Chromogenelösung	100	100
15 min. bei Raumtemperatur inkubieren.		
Stopplösung	100	100
Auf einem Mikrotiterplatten-Lesegerät auswerten und Absorption jedes Wells bei 450 nm (gg. 630 oder 650 nm).		



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

# INS-ELISA

## I. USO DEL KIT

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

## II. INFORMAZIONI DI CARATTERE GENERALE

- A. Nome commerciale:** DIASource INS-ELISA Kit
- B. Numero di catalogo:** KAP1251: 96 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 deficit 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


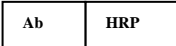
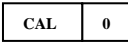
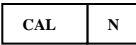

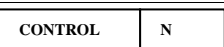
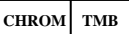
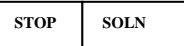
- Determinazione della funzione residua delle beta cellule con il test di tolleranza al glucosio o dopo un pasto ricco di carboidrati, come guida per una eventuale terapia sostitutiva con insulina.
- Contributo alla diagnosi differenziale di diabete mellito insulino o non insulino dipendente.
- Caratterizzazione 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

DIASource INS-ELISA è un immunodosaggio a sensibilità amplificata in fase solida, eseguito su piastre per microtitolazione frazionabili. Il saggio utilizza anticorpi monoclonali (MAbs) direttamente contro epitopi distinti dell'insulina. I calibratori e i campioni reagiscono con la cattura dell'anticorpo monoclonale (MAB 1) che riveste il pozzetto di microtitolazione e con un anticorpo monoclonale (MAB 2) marcato con horseradish perossidasi (HRP). Dopo un periodo di incubazione che consenta la formazione di un sandwich: MAB 1 di rivestimento – insulina umana – MAB 2 – HRP, la piastra di microtitolazione viene lavata per rimuovere l'anticorpo marcato con enzima non legato. L'anticorpo marcato con enzima non legato viene misurato attraverso una reazione cromogenica. La soluzione cromogenica (TMB pronta all'uso) viene aggiunta e incubata. La reazione viene interrotta con l'aggiunta di Stop Solution; quindi la piastra di microtitolazione viene letta alla lunghezza d'onda adeguata. La quantità di turnover del substrato viene determinata colorimetricamente misurando l'assorbanza che è proporzionale alla concentrazione di insulina. Viene tracciata una curva di calibrazione e la concentrazione INS nei campioni viene determinata per interpolazione dalla curva di calibrazione.

#### V. REATTIVI FORNITI

Reattivi	Kit da 96 test	Codice colore	Volume di ricostituzione
 Piastra di microtitolazione con 96 pozzetti separabili rivestiti anti INS (anticorpi monoclonali)	96 pozzetti	blu	Pronte per l'uso
 Coniugato: marcato HRP anti-INS (Anticorpi monoclonali) in tampone TRIS-HCl con BSA e timolo	1 flacone 6 ml	Rosso	Pronto per l'uso
 Calibratore zero in plasma umano contenente timolo	1 flacone liofiliz.	Giallo	Aggiungere 2 ml di acqua distillata
 Calibratore 1-5 (le concentrazioni esatte degli calibratore sono riportate sulle etichette dei flaconi), in plasma umano contenente timolo	5 flaconi liofiliz.	Giallo	Aggiungere 1 ml di acqua distillata
 Tampone di lavaggio (TRIS HCl)	1 flacone 10 ml	Bruno	Diluire 200 x con acqua distillata usando un agitatore magnetico
 Controlli: N = 1 o 2, in plasma umano contenente timolo	2 flaconi liofiliz.	Argento	Aggiungere 1 ml di acqua distillata
 TMB cromogena (tetrametilbenzidina)	1 flacone 12 ml	nero	Pronte per l'uso
 Reagente di arresto: HCl 1,0 N	1 flacone 12 ml	bianco	Pronte per l'uso

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

#### VI. REATTIVI NON FORNITI

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

1. Acqua distillata di qualità elevata
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. Lavatrice per piastra di microtitolazione
6. Lettore piastra di microtitolazione con una potenza di lettura di 450 nm e 650 nm (lettura bicromatica)

#### VII. PREPARAZIONE DEI REATTIVI

- A. Calibratore:** Ricostituire lo calibratore zero con 2 ml di acqua distillata e gli altri calibratore con 1 ml di acqua distillata.
- B. Controlli:** Ricostituire i controlli con 1 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 199 parti di acqua distillata ad una parte di tampone di lavaggio concentrato (200 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°C fino alla data riportata su ciascuna etichetta.
- Le pozzetti inutilizzate devono essere conservate a 2-8°C, in un contenitore sigillato che contenga un essiccante fino alla data di scadenza.
- Dopo ricostituzione, calibratore e controlli sono stabili 7 giorni a 2-8°C e, suddivisi in aliquote a -20°C per periodi più lunghi per 3 mesi. Evitare ripetuti cicli di congelamento-scongelo dei campioni.
- La soluzione di lavaggio concentrata è stabile a temperatura ambiente fino alla data di scadenza.
- 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 coniugato è stabile fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta, se conservato a 2-8°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°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.
- Prima dell'impiego, tutti i campioni devono essere a temperatura ambiente. Si raccomanda di vortexare i campioni prima di utilizzarli.
- Non usare campioni emolizzati.

#### X. METODO DEL DOSAGGIO

##### A. Avvertenze generali

Non usare il kit o i 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. Eseguire calibratori, controlli e campioni in doppio. Si raccomanda l'allineamento verticale. Utilizzare un contenitore di plastica pulito per preparare la soluzione di lavaggio. Per evitare cross-contaminazioni, cambiare il puntale della pipetta ogni volta che si usi un nuovo reattivo o campione. Per la distribuzione della soluzione cromogena e la Stop Solution evitare pipette con parti metalliche. L'uso di pipette ben tarate e ripetibili o di sistemi di pipettamento automatici migliora la precisione del dosaggio. Rispettare i tempi di incubazione. Per evitare derive, l'intervallo tra il pipettaggio del primo calibratore e l'ultimo campione non deve essere superiore a 30 minuti. 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. Distribuzione della soluzione cromogena entro 15 minuti dopo il lavaggio della piastra di microtitolazione. Durante l'incubazione con la soluzione cromogena evitare la luce diretta del sole sulla piastra di microtitolazione.

##### B. Metodo del dosaggio

1. Selezionare il numero di pozzetti necessario per il test. Le pozzetti inutilizzate devono essere risigillate nel contenitore con un essiccante e conservate a 2-8°C.
2. Assicurare le pozzetti nel telaio di supporto.
3. Pipettare 50 µl di ogni calibratore, controllo e campione nei pozzetti adeguati.
4. Pipettare 50 µl di coniugato anti-INS-HRP in tutti i pozzetti.

5. Incubare per 30 minuti a temperatura ambiente.
6. Aspirare il liquido da ogni pozzetto.
7. Lavare la piastra 3 volte :
  - versando 0,4 ml di soluzione di lavaggio in ogni pozzetto
  - aspirando il contenuto di ogni pozzetto
8. Pipettare 100 µl di soluzione cromogena entro 15 minuti dalla fase di lavaggio.
9. Incubare la piastra di microtitolazione per 15 minuti a temperatura ambiente.
10. Pipettare 100 µl di reagente d'arresto in ogni pozzetto.
11. Leggere le assorbanze a 450 nm (filtro di riferimento a 630 nm o 650 nm) entro 1 ora e calcolare i risultati come descritto nella sezione XI.

#### XI. CALCOLO DEI RISULTATI

1. Leggere la piastra a 450 nm rispetto a un filtro di riferimento regolato a 650 nm (o 630 nm).
2. Calcolare la media delle determinazioni in duplicato.
3. Costruire la curva di calibrazione su carta millimetrata semilogaritmica o lineare ponendo in ordinata le medie dei OD dei replicati degli standard e in ascissa le rispettive concentrazioni di insulina., collegando i punti tracciati con linee rette.
4. Determinare le concentrazioni e controlli per interpolazione sulla curva di taratura.
5. 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

Il 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-ELISA		Unità OD modello Policromatico
Calibratore	0 µIU/ml	0.025
	5.1 µIU/ml	0.070
	13.8 µIU/ml	0.13
	44.4 µIU/ml	0.507
	128 µIU/ml	1.313
	250 µIU/ml	2.34

#### 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 OD pari alla media più 2 deviazioni standard di 20 replicati dello standard zero, è risultata essere 0,17 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	17,4	> 100
Insulina bovina	8 ng/ml	17,8	> 100
Insulina di cane	16 ng/ml	17,2	81
Insulina di coniglio	16 ng/ml	14,1	62
Insulina di ratto	16 ng/ml	3,7	0
Proinsulina umana	32 ng/ml	4,3	0,3
Proinsulina porcina	16 ng/ml	4,3	2,5
Proinsulina bovina	16 ng/ml	4,3	0,6

#### C. Precisione

INTRA SAGGIO				INTER SAGGIO			
Siero	N	<X> ± SD (µIU/ml)	CV (%)	Siero	N	<X> ± SD (µIU/ml)	CV (%)
A	23	13.09 ± 0.6	4.8	A	8	13.29 ± 1.08	8.1
B	23	32.9 ± 1.9	6.0	B	7	34.12 ± 3.1	9.0

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	-----	82.3
	1/2	41.2	42.21
	1/4	20.6	22.86
	1/8	10.3	11.04
	1/16	5.15	5.9
	1/32	2.58	3.3
Siero 2	1/1	-----	57.5
	1/2	28.7	27.7
	1/4	14.4	14.5
	1/8	7.2	8.0
	1/16	3.6	4.4
	1/32	1.8	2.3

I campioni sono stati diluiti con calibratore zero.

#### TEST DI RECUPERO

Campione	Insulina aggiunta (µIU/ml)	Insulina recuperata (µIU/ml)	Recupero (%)
Siero	182.1	174.5	95.8
	86.7	80	92.3
	39.6	37.4	94.4
	15.1	13.6	90

#### 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 pozzetti sensibilizzate 30 minuti dopo l'aggiunta del calibratore.

	T0	10 min	20 min	30 min
C I	12.8	12.7	12.4	12.9
C II	31.3	30.7	30	28.6

#### F. Effetto hook

Un campione ha cui è stata aggiunta insulina fino a 10 000 µIU/ml ha OD superiori a quello dello standard più concentrato.

#### XIV. 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.
- I criteri di accettazione delle differenze tra i risultati in duplicato dei campioni devono basarsi sulla buona prassi di laboratorio.
- Si raccomanda di saggiare i controlli con regolarità come campioni sconosciuti per misurare la variabilità del saggio. La resa del saggio deve essere monitorata con tabelle di controllo qualità dei controlli.

- È buona pratica verificare visivamente il modello di curva selezionato dal computer.

#### XV. INTERVALLI DI RIFERIMENTO

L'intervallo dei livelli di insulina in 29 soggetti con test di tolleranza al glucosio orale normale è risultato essere pari a 5 – 19  $\mu$ IU/ml; l'intervallo si basa su percentili da 2,5 a 97,5 del set di dati.

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

#### XVI. PRECAUZIONI PER L'USO

##### Sicurezza

Il kit è solo per uso diagnostico in vitro.

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 qualsiasi contatto della cute con tutti i reagenti. La Stop solution contiene HCl. In caso di contatto, lavare abbondantemente con acqua.

Non fumare, bere, mangiare o applicare cosmetici nell'area di lavoro. Non pipettare i reattivi con pipette a bocca. Utilizzare indumenti protettivi e guanti monouso.

#### XVII. 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.

#### XVIII. SCHEMA DEL DOSAGGIO

	CALBRATORE ( $\mu$ l)	CAMPIONI CONTROLLI ( $\mu$ l)
Calibratore (0 - 5)	50	-
Campioni, controlli	-	50
Coniugato anti-INS-HRP	50	50
Incubare per 30 minuti a temperatura ambiente. Aspirare il contenuto di ogni pozzetto. Lavare 3 volte con 400 $\mu$ l di soluzione di lavaggio e aspirare.		
Soluzione cromogena	100	100
Incubare per 15 minuti a temperatura ambiente.		
Reagente di arresto	100	100
Leggere su un lettore per piastra da microtitolazione e registrare l'assorbanza di ogni pozzetto a 450 nm (rispetto a 630 o 650 nm)		

Leer todo el protocolo antes de utilizar.

## INS-ELISA

### I. USO PREVISTO

Ensayo inmunoenzimático para la medición cuantitativa *in vitro* de insulina humana (INS) en suero.

### II. INFORMACIÓN GENERAL

- A. Nombre registrado:** DIAsource INS-ELISA Kit
- B. Número de catálogo:** KAP1251 : 96 pruebas
- C. Fabricado por :** DIAsource ImmunoAssays S.A.  
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Bélgica.

Para obtener asistencia técnica o información sobre pedidos póngase en contacto con :

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

### III. ANTECEDENTES CLÍNICOS

#### A Actividad biológica de la insulina

Insulina, una hormona polipeptídica con un peso molecular de 5800 Da, es secretada por las células beta de los islotes de Langerhans en el páncreas. La insulina posee una amplia gama de acciones biológicas. Estimula la absorción celular de glucosa, la oxidación de la glucosa, glucogénesis, lipogénesis, proteogénesis y la formación de ADN Y ARN. La insulina tiene un rol clave en la regulación de los niveles de glucosa plasmática (inhibición de la producción hepática, estímulo de la utilización periférica de la glucosa). Los efectos hipoglucémicos resultantes de la insulina, se contrarrestan con las hormonas con efecto hiperglucémico (glucagón, hormona del crecimiento, cortisol, epinefrina). La secreción de la insulina es controlada principalmente por los niveles de glucosa plasmática: la hiperglucemia induce un aumento rápido e importante en los niveles de glucosa circulante. Asimismo influencias neurales así como varios factores metabólicos y hormonales (amino ácidos, glucagón, hormona gastrointestinal) también participan en el control de la secreción de la insulina. La diabetes tipo I (dependiente de la insulina: "juvenil") se debe a la destrucción de las células beta, con la consecuencia de la carencia absoluta de insulina. En la diabetes tipo II (no dependiente de la insulina: "aparición en el adulto"), la resistencia a la insulina puede jugar un papel importante; sin embargo después de varios años de evolución, puede ocurrir una falla de las células beta, produciendo una insulinopenia relativa que requiere, en algunos casos, administración de insulina. La resistencia a la insulina está asociada con altos niveles de la hormona en circulación. El caso más común de resistencia a la insulina la representa la obesidad. Varias endocrinopatías (acromegalia, síndrome de Cushing) así como casos raros de defectos en los receptores de la insulina o casos con anticuerpos con un receptor anti insulina, están asociados con intolerancia a la glucosa o incluso diabetes debida a la resistencia a la insulina. La determinación de los niveles de insulina plasmática es un parámetro importante en el diagnóstico de hipoglucemia. Los niveles de insulina están elevados en casos de insulinooma (tumor de células beta). La hipoglucemia funcional postprandial; también puede estar asociada con la liberación inadecuada de insulina por la absorción de carbohidratos. Los niveles de insulina se determinan ya sea en ayuno o durante la prueba dinámica :

- pruebas de estimulación: comida rica en carbohidratos, prueba oral de tolerancia a la glucosa (OGTT), infusión de arginina, tolbutamida o administración de otras sulfonilureas.
- prueba de inhibición : ayuno, infusión de somatostatina


#### B. Aplicación clínica de determinación de la insulina

- Determinación de las reservas de células beta durante la prueba de tolerancia a la glucosa o después de una comida rica en carbohidratos, como guía para la instauración de un tratamiento con insulina;
- Contribución al diagnóstico de diabetes dependiente y no dependiente de la insulina;
- Caracterización y seguimiento de los estados de la intolerancia a la glucosa;
- Diagnóstico y estudio de casos de resistencia a la insulina;
- Diagnóstico de insulinooma y otras causas de hipoglucemia.

#### IV. PRINCIPIOS DEL MÉTODO

El DIASource INS-ELISA es un inmunoensayo enzimático de sensibilidad amplificada en fase sólida realizado en microplacas con tiras desprendibles. El ensayo utiliza anticuerpos monoclonales (MAbs) dirigidos contra epítopes de la insulina. Los calibradores y las muestras reaccionan con los anticuerpos monoclonales de captura (MAB 1) que recubren el pocillo de la microplaca y con un anticuerpo monoclonal (MAB 2) marcado con peroxidasa de rábano picante (HRP). Después de un periodo de incubación que permite la formación de un emparejado: MAB 1 que recubre – insulina humana – MAB 2 – HRP, la microplaca se lava para eliminar anticuerpos marcados con la enzima que no se han unido. Los anticuerpos marcados con la enzima que se han unido, se miden a través de una reacción cromogénica. La solución cromogénica (TMB lista para usar) se añade y se incuba. La reacción se detiene añadiendo la solución de parada y la microplaca se lee a la longitud de onda adecuada. La cantidad de sustrato utilizado se determina en forma colorimétrica midiendo la absorbancia, la que es proporcional a la concentración de insulina. Se traza una curva de calibración y se determina la concentración de la INS en las muestras, por interpolación a partir de la curva de calibración.

#### V. REACTIVOS SUMINISTRADOS

Reactivos	Kit de 96 pruebas	Código Color	Reconstitución			
 Microplaca con 96 pocillos desprendibles recubiertos con anti INS (anticuerpo monoclonal).	96 pocillos	azul	Listo para usar			
<table border="1" data-bbox="97 898 245 949"> <tr> <td>Ab</td> <td>HRP</td> </tr> </table> Conjugado: Anti-INS (anticuerpos monoclonales) marcado con HRP en tampón con albúmina de suero bovino y timol	Ab	HRP	1 vial 6 ml	rojo	Listo para usar	
Ab	HRP					
<table border="1" data-bbox="113 1084 240 1122"> <tr> <td>CAL</td> <td>0</td> </tr> </table> Calibrador cero en plasma humano con timol	CAL	0	1 vial líoofilizado	amarillo	Añadir 2 ml de agua destilada	
CAL	0					
<table border="1" data-bbox="105 1205 248 1243"> <tr> <td>CAL</td> <td>N</td> </tr> </table> Calibrador N = 1 a 5 (ver valores exactos en las etiquetas de los viales) en plasma humano con timol	CAL	N	5 viales líoofilizados	amarillo	Añadir 1 ml de agua destilada	
CAL	N					
<table border="1" data-bbox="76 1375 277 1413"> <tr> <td>WASH</td> <td>SOLN</td> <td>CONC</td> </tr> </table> Solución de lavado (Tris-HCl)	WASH	SOLN	CONC	1 vial 10 ml	marrón	Diluir 200 x con agua destilada (utilizar un agitador magnético)
WASH	SOLN	CONC				
<table border="1" data-bbox="92 1473 261 1512"> <tr> <td>CONTROL</td> <td>N</td> </tr> </table> Controles - N = 1 o 2 en plasma humano con timol	CONTROL	N	2 viales líoofilizados	plata	Añadir 1 ml de agua destilada	
CONTROL	N					
<table border="1" data-bbox="76 1576 293 1615"> <tr> <td>CHROM</td> <td>TMB</td> </tr> </table> Solución TMB cromogénica (Tetrametilbencidina)	CHROM	TMB	1 vial 12 ml	negro	Listo para usar	
CHROM	TMB					
<table border="1" data-bbox="76 1697 213 1736"> <tr> <td>STOP</td> <td>SOLN</td> </tr> </table> Solución de parada: HCl 1,0 N	STOP	SOLN	1 vial 12 ml	blanco	Listo para usar	
STOP	SOLN					

**Nota:** 1. Utilizar el calibrador cero para diluir muestras.  
2. 1 µIU de la preparación del calibrador equivale a 1 µIU del 2<sup>nd</sup> IRP 66/304.

#### VI. MATERIALES NO SUMINISTRADOS

Los siguientes materiales son necesarios pero no son suministrados por el kit:

1. Agua destilada de alta calidad
2. Pipetas para dispensar: 50 µl, 500 µl y 2 ml (se recomienda utilizar pipetas precisas con puntas plásticas desechables)
3. Agitador Vortex
4. Agitador magnético

5. Lavadora de microplacas
6. Lector de microplacas que pueda leer a 450 nm y 650 nm (lectura bi cromática)

#### VII. PREPARACIÓN DE REACTIVOS

- A. **Calibradores** : Reconstituir el calibrador cero con 2 ml de agua destilada y los otros calibradores con 1 ml de agua destilada.
- B. **Controles** : Reconstituir los controles con 1 ml de agua destilada.
- C. **Solución de lavado de trabajo**: Prepare un volumen adecuado de solución de lavado de trabajo añadiendo 199 volúmenes de agua destilada a 1 volumen de solución de lavado (200x). Utilice un agitador magnético para homogenizar. elimine la solución de lavado de trabajo no utilizada al finalizar el día.

#### VIII. ALMACENAJE Y FECHA DE CADUCIDAD DE LOS REACTIVOS

- Antes de abrirlos o reconstituirlos todos los componentes de los kits son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del vial, si se mantienen a 2 a 8°C.
- Los pocillos no utilizados se deben almacenar a 2-8°C, en una bolsa sellada que contiene el desecante, hasta la fecha de caducidad.
- Después de reconstituir, los calibradores y controles son estables por una semana a 2 a 8°C. Para periodos de almacenaje prolongados, se deben preparar alícuotas y almacenar a -20°C. Evitar ciclos de congelación y descongelación sucesivos.
- La solución de lavado concentrada es estable a temperatura ambiente hasta la fecha de caducidad.
- La solución e lavado recién preparada, se debe utilizar el mismo día.
- Después del primer uso, el conjugado es estable hasta la fecha de caducidad, si se mantiene en su vial original debidamente cerrado a 2 a 8°C.
- Alteraciones de la apariencia física de los reactivos del kit pueden indicar inestabilidad o deterioro.

#### IX. TOMA DE LA MUESTRA Y PREPARACIÓN

- El suero debe mantenerse a 2 - 8°C.
- Si la prueba no se realiza dentro de las 24 horas, se recomienda almacenar en alícuotas a -20°C. Evitar ciclos de congelación y descongelación sucesivos.
- Ante de utilizarlas, todas las muestras deben estar a temperatura ambiente. Se recomienda agita las muestras en un Vortex antes del uso.
- No utilizar muestras hemolizadas.

#### X. PROCEDIMIENTO

- A. **Notas sobre el manejo**  
No utilizar los componentes del kit después de la fecha de caducidad. No mezclar materiales de kits de diferentes lotes. Dejar que todos los reactivos alcancen temperatura ambiente antes de utilizar. Mezclar muy bien todos los reactivos y muestras agitando o girando suavemente. Analizar los calibradores, controles y muestras en duplicado. Se recomienda la alineación vertical. Utilizar un contenedor de plástico limpio para preparar la solución de lavado Para evitar contaminación cruzada utilizar una punta de pipeta desechable limpia para añadir cada reactivo y muestra. Para dispensar la solución cromogénica y la solución de parada, evitar utilizar pipetas con partes metálicas. Pipetas de alta precisión o equipo para dispensación automática mejorarán la precisión. Adherirse a los tiempos de incubación Para evitar deriva, el periodo transcurrido entre el pipeteo del primer calibrador y la última muestra no debe ser más de 30 minutos. Preparar la curva de calibración para cada ensayo, no utilizar los datos de ensayos previos. Dispensar la Solución Cromogénica dentro de los 15 minutos posteriores al lavado de las microplacas. Durante la incubación con Solución Cromogénica, evitar exponer las microplacas la luz solar directa

- B. **Procedimiento**  
1. Seleccionar el número requerido de pocillos para el ensayo. Las tiras no utilizadas deben ser selladas en la bolsa con un desecante y guardadas a 2-8°C

- Fijar las tiras en el marco de sostén.
- Pipetear 50 µl de cada calibrador, control y muestra en los pocillos correspondiente.
- Pipetear 50 µl del conjugado anti-INS-HRP en todos los pocillos.
- Incubar 30 minutos a temperatura ambiente
- Aspirar el líquido de cada pocillo.
- Lavar la placa 3 veces:
  - dispensando 0,4 ml de solución de lavado en cada pocillo
  - aspirando el contenido de cada pocillo
- Pipetear 100 µl de solución cromogénica en cada pocillo dentro de los 15 minutos después del lavado.
- Incubar la microplaca durante 15 minutos a temperatura ambiente.
- Pipetear 100 µl del reactivo de parada en cada pocillo.
- Leer las absorbancias a 450 nm (filtro de referencia 630 nm o 650 nm) en 1 hora y calcular los resultados como se ha descrito en la sección XI.

#### XI. CÁLCULO DE RESULTADOS

- Leer la placa a 450 nm contra un filtro de referencia a 650 nm (o 630 nm).
- Calcular la media de los duplicados.
- En papel semi logarítmico o de gráfico lineal dibujar la curva de calibración con los valores de DO (en la ordenada) para cada calibrador contra la concentración correspondiente de INS (en la abscisa) uniendo los puntos de con líneas rectas.
- Leer la concentración de cada control y muestra por interpolación en la curva de calibración.
- El análisis de datos asistido por un ordenador simplifica estos cálculos. Si utiliza procesamiento de datos automático, se recomienda el ajuste de la curva dada por la función logística de 4 parámetros.

#### XII. EJEMPLO DE RESULTADOS

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

INS-ELISA		Unidades de DO del modelo policromático
Calibrador	0 µIU/ml	0,025
	5,1 µIU/ml	0,070
	13,8 µIU/ml	0,13
	44,4 µIU/ml	0,507
	128 µIU/ml	1,313
	250 µIU/ml	2,34

#### XIII. RENDIMIENTO Y LIMITACIONES

##### A. Límite de la detección

Se analizaron 20 calibradores cero al mismo tiempo que un grupo de otros calibradores. El límite de detección, definido como la concentración aparente de dos desviaciones estándar sobre la DO promedio cuando hay cero unión fue de 0,17 µIU/ml.

##### B. Especificidad

Se añadieron hormonas que producen reacción cruzada a un calibrador de alta concentración (100 µIU/ml o 4 ng/ml). Se midió la respuesta aparente de INS.

Como se muestra a continuación, las insulinas animales (excepto la insulina de rata) producen una reacción cruzada, mientras que la pro insulina humana, de cerdo y vacuno no presentan reacción cruzada.

Analito añadido a un suero de alta concentración	Valores de INS teóricos (ng/ml)	Valores de INS observados (ng/ml)	Reacción cruzada (%)
Insulina porcina	8 ng/ml	4,2	17,4
Insulina bovina	8 ng/ml	3,8	17,8
Insulina canina	16 ng/ml	4,2	17,2
Insulina de conejo	16 ng/ml	4,2	14,1
Insulina de rata	16 ng/ml	3,8	3,7
Proinsulina humana	32 ng/ml	4,3	4,4
Proinsulina porcina	16 ng/ml	4,3	4,7
Proinsulina bovina	16 ng/ml	4,3	4,4

#### C. Precisión

INTRA ENSAYO				ENTRE ENSAYOS			
Suero	N	<X> ± SD (µIU/ml)	CV (%)	Suero	N	<X> ± SD (µIU/ml)	CV (%)
A	23	13,09 ± 0,6	4,8	A	8	13,29 ± 1,08	8,1
B	23	32,9 ± 1,9	6,0	B	7	34,12 ± 3,1	9,0

SD : Desviación estándar; CV: Coeficiente de variación

#### D. Exactitud

##### PRUEBA DE RECUPERACIÓN

Muestra	INS añadida (µIU/ml)	INS recuperada (µIU/ml)	Recuperación (%)
Suero	182,1	174,5	95,8
	86,7	80	92,3
	39,6	37,4	94,4
	15,1	13,6	90

##### PRUEBA DE DILUCIÓN

Muestra	Dilución	Conc. teórica (µIU/ml)	Conc. medida (µIU/ml)
Suero1	1/1	-----	82,3
	1/2	41,2	42,21
	1/4	20,6	22,86
	1/8	10,3	11,04
	1/16	5,15	5,9
	1/32	2,58	3,3
Suero2	1/1	-----	57,5
	1/2	28,7	27,7
	1/4	14,4	14,5
	1/8	7,2	8,0
	1/16	3,6	4,4
	1/32	1,8	2,3

Las muestras se diluyeron con calibrador cero.

##### E. Lapso de tiempo entre la dispensación del último calibrador y muestra

Como se muestra a continuación, los resultados del ensayo continúan siendo precisos aun cuando la muestra se añade 30 minutos después que los calibradores han sido añadidos a los pocillos recubiertos

	T0	10 min	20 min	30 min
C I	12,8	12,7	12,4	12,9
C II	31,3	30,7	30	28,6

##### F. Efecto de gancho

Una muestra a la que se le añade hasta 10000 µIU/ml de INS resulta en DO más alta que el último punto del calibrador.

#### XIV. 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 preparar sus propios grupos de muestras de control, las que deben almacenarse en alícuotas congeladas.
- Los criterios de aceptación de las diferencias entre los resultados de los duplicados de las muestras deben depender de las Buenas Prácticas de Laboratorio
- Recomendamos que los controles sean incluidos rutinariamente en los ensayos como muestras desconocidas para medir la variabilidad del ensayo.

El funcionamiento del ensayo debe ser controlado con gráficos de control de calidad de los controles.

- Recomendamos un control visual de la curva seleccionada por el ordenador.

#### XV. INTERVALOS DE REFERENCIA

El rango de los niveles de insulina en 29 sujetos con pruebas orales de tolerancia a la glucosa normales, fue de 5 a 19  $\mu$ U/ml, el rango se basa en los percentiles 2,5 al 97,5 de los datos.

Estos valores son solo una guía, cada laboratorio debe establecer su propio rango de valores normales.

#### XVI. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

##### Seguridad

Solo para uso de diagnóstico *in vitro*.

Los componentes de sangre humana utilizados en este kit han sido analizados con métodos aprobados en Europa y/o la FDA resultando negativos para HBsAg, anti-VHC, anti-VIH-1 y 2. No se conoce ningún método que asegure que los derivados de la sangre humana no transmitan hepatitis, SIDA u 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 de éstos, han sido obtenidos a partir de animales sanos. Componentes bovinos originales de países donde BSE no ha sido informado. Sin embargo, los componentes que contienen substancias animales deberán ser considerados como potencialmente infecciosos.

Evitar contacto de la piel con todos los reactivos, la Solución de Parada contiene HCl. En caso de contacto, lavar con abundante agua.

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

#### XVII. 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.

#### XVIII. RESUMEN DEL PROTOCOLO

	CALIBRADORES ( $\mu$ l)	MUESTRA(S) CONTROLES ( $\mu$ l)
Calibradores (0-5)	50	-
Muestras, Controles	-	50
Conjugado anti-INS-HRP	50	50
Incubar 30 min a temperatura ambiente. Aspirar el contenido de cada pocillo. Lavar 3 veces con 400 $\mu$ l de solución de lavado y aspirar.		
Solución cromogénica	100	100
Incubar 15 min a temperatura ambiente.		
Solución de parada	100	100
Leer en un lector de microplacas y registrar la absorbancia de cada pocillo a 450 nm (versus 630 o 650 nm)		



el

Διαβάστε ολόκληρο το πρωτόκολλο πριν από τη χημεία

# INS-ELISA

## I. ΧΡΗΣΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΟΠΟΙΑ ΠΡΟΟΡΙΖΕΤΑΙ

Ανοσοενζυμομετρικός προσδιορισμός για την *in vitro* ποσοτική μέτρηση της ανθρώπινης ινσουλίνης (INS) στον ορό.

## II. ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

- A. Εμπορική ονομασία:** Kit INS-ELISA της DIAsource
- B. Αριθμός καταλόγου:** KAP1251: 96 προσδιορισμοί
- 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 Φαξ: +32 (0)10 84.99.91

## III. ΚΛΙΝΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ

### A Βιολογική δράση της ινσουλίνης

Η ινσουλίνη, μια πολυπεπτιδική ορμόνη με μοριακό βάρος 5800 Da, 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 υπεργλυκαιμικές 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 παθήσεις (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 μεταγευματική 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 σουλφανουλουριών.
- β) Εξέταση αναστολής: νηστεία, έγχυση σωματοστατίνης

### B. Κλινική εφαρμογή του προσδιορισμού ινσουλίνης


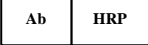

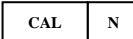


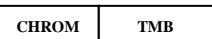
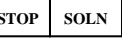
- Προσδιορισμός του αποθέματος των β-κυττάρων κατά τη διάρκεια της εξέτασης ανοχής στη γλυκόζη ή μετά από ένα γεύμα πλούσιο σε υδρογονάνθρακες, ως οδηγός για τον καθορισμό της θεραπείας με ινσουλίνη.
- Συμβολή στη διάγνωση ινσουλινοεξαρτώμενου και μη ινσουλινοεξαρτώμενου διαβήτη
- Χαρακτηρισμός και παρακολούθηση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



#### IV. ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Ο προσδιορισμός INS-ELISA της DIAsource είναι ένας ενζυμικός ανοσοπροσδιορισμός ενισχυμένης ευαισθησίας στερεής φάσης που εκτελείται σε αποσπώμενες πλάκες μικροτιτλοδότησης. Ο προσδιορισμός χρησιμοποιεί μονοκλωνικά αντισώματα (MAbs) που κατευθύνονται εναντίον διακριτών επιτόπων της ινσουλίνης. Οι βαθμονομητές και τα δείγματα αντιδρούν με το μονοκλωνικό αντίσωμα σύλληψης (MAb 1) που είναι επιστρωμένο στην υποδοχή της πλάκας μικροτιτλοδότησης και με ένα μονοκλωνικό αντίσωμα (MAb 2) σημασμένο με ραφανιδική υπεροξειδάση (HRP). Μετά από μια περίοδο επώασης που επιτρέπει το σχηματισμό ενός σάντουιτς: επιστρωμένο MAb 1 – ανθρώπινη ινσουλίνη – MAb 2 – HRP, η πλάκα μικροτιτλοδότησης υποβάλλεται σε πλύση για να απομακρυνθεί το σημασμένο με ένζυμο αδέσμευτο αντίσωμα. Το σημασμένο με ένζυμο δεσμευμένο αντίσωμα μετράται μέσω μιας χρωμογόνου αντίδρασης. Προστίθεται και επωάζεται χρωμογόνο διάλυμα (TMB έτοιμο για χρήση). Η αντίδραση σταματά με την προσθήκη ανασχετικού διαλύματος και στη συνέχεια γίνεται ανάγνωση της πλάκας μικροτιτλοδότησης στο κατάλληλο μήκος κύματος. Η ποσότητα μετατροπής του υποστρώματος καθορίζεται χρωματομετρικά μετρώντας την απορρόφηση, η οποία είναι ανάλογη προς τη συγκέντρωση της ινσουλίνης. Παριστάνεται γραφικά μια καμπύλη βαθμονόμησης και προσδιορίζεται η συγκέντρωση της INS στα δείγματα με αναγωγή από την καμπύλη βαθμονόμησης.

#### V. ΠΑΡΕΧΟΜΕΝΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Αντιδραστήρια	Κιτ 96 προσδιορισμών	Χρωματικός κωδικός	Ανασύσταση
 Πλάκα μικροτιτλοδότησης με 96 αποσπώμενες υποδοχές επιστρωμένες με	96 υποδοχές	μπλε	Έτοιμο για χρήση
 Σύζευγμα: Αντι-INS (μονοκλωνικά αντισώματα) σημασμένα με HRP σε ρυθμιστικό διάλυμα TRIS-HCl με βόεια ορολευκοματίνη και θυμόλη	1 φιαλίδιο 6 ml	κόκκινο	Έτοιμο για χρήση
 Μηδενικός βαθμονομητής σε ανθρώπινο πλάσμα και θυμόλη	1 φιαλίδιο λυοφιλοποιημένο	κίτρινο	Προσθέστε 2 ml απεσταγμένου νερού
 Βαθμονομητής N = 1 έως 5 (δείτε τις ακριβείς τιμές πάνω στις ετικέτες των φιαλιδίων) σε ανθρώπινο πλάσμα και θυμόλη	5 φιαλίδια λυοφιλοποιημένα	κίτρινο	Προσθέστε 1 ml απεσταγμένου νερού
 Διάλυμα πλύσης (Tris-HCl)	1 φιαλίδιο 10 ml	καφέ	Αραιώστε 200 x με απεσταγμένο νερό (χρησιμοποιήστε μαγνητικό αναδευτήρα).
 Οροί ελέγχου - N = 1 ή 2 σε ανθρώπινο πλάσμα με θυμόλη	2 φιαλίδια λυοφιλοποιημένα	ασημί	Προσθέστε 1 ml απεσταγμένου νερού
 Διάλυμα χρωμογόνου TMB (τετραμεθυλβενζιδίνη)	1 φιαλίδιο 12 ml	μαύρο	Έτοιμο για χρήση
 Ανασχετικό αντιδραστήριο: HCl 1,0 N	1 φιαλίδιο 12 ml	λευκό	Έτοιμο για χρήση

**Σημείωση:** 1. Χρησιμοποιείτε το μηδενικό βαθμονομητή για αραιώσεις δειγμάτων.  
2.1 μIU του παρασκευάσματος του βαθμονομητή είναι ισοδύναμο με 1 μIU του 2<sup>ο</sup> IRP 66/304.

#### VI. ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ ΠΟΥ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ

Τα ακόλουθα υλικά απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται στο κιτ:

1. Απεσταγμένο νερό υψηλής ποιότητας

2. Πιπέτες για διανομή: 50 μl, 500 μl και 2 ml (συνιστάται η χρήση πιπετών ακριβείας με αναλόμενα πλαστικά ρύγχη)
3. Αναμεικτής στροβίλισμού
4. Μαγνητικός αναδευτήρας
5. Συσκευή πλύσης για πλάκες μικροτιτλοδότησης
6. Συσκευή ανάγνωσης πλάκων μικροτιτλοδότησης με δυνατότητα ανάγνωσης στα 450 nm, και 650 nm (Διχρωματική ανάγνωση)

#### VII. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟΥ

- A. **αθμονομητές:** Ανασυστήστε το μηδενικό βαθμονομητή με 2,0 ml απεσταγμένου νερού και άλλους βαθμονομητές με 1 ml απεσταγμένου νερού.
- B. **Οροί ελέγχου:** Ανασυστήστε τους ορούς ελέγχου με 1 ml απεσταγμένου νερού.
- C. Γ. **Διάλυμα πλύσης εργασίας:** Προετοιμάστε επαρκή όγκο διαλύματος πλύσης εργασίας με προσθήκη 199 όγκων απεσταγμένου νερού σε 1 όγκο διαλύματος πλύσης (200x). 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.
- Οι μη χρησιμοποιημένες υποδοχές πρέπει να φυλάσσονται στους 2-8° C, σε σφραγισμένη σακούλα που περιέχει αποξηραντικό παράγοντα, μέχρι την ημερομηνία λήξης.
- Μετά την ανασύσταση, οι βαθμονομητές και οι οροί ελέγχου παραμένουν σταθεροί για μία εβδομάδα σε θερμοκρασία 2 έως 8° C. Για μεγαλύτερες περιόδους φύλαξης, πρέπει να σχηματίζονται κλάσματα/δόσεις μιας χρήσης και να διατηρούνται στους -20° C. Αποφύγετε τους επανειλημμένους κύκλους απόψυξης-κατάψυξης.
- Το συμπυκνωμένο διάλυμα πλύσης είναι σταθερό σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι την ημερομηνία λήξης.
- Φρέσκο, παρασκευασμένο διάλυμα πλύσης εργασίας θα πρέπει να χρησιμοποιείται την ίδια ημέρα.
- Μετά την πρώτη χρήση του, το σύζευγμα παραμένει σταθερό 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

- Ο ορός πρέπει να φυλάσσεται στους 2 - 8° C.
- Εάν η εξέταση δεν πραγματοποιηθεί εντός 24 ωρών, συνιστάται η φύλαξη σε κλάσματα/δόσεις μιας χρήσης στους -20° C. Αποφύγετε τους επακόλουθους κύκλους κατάψυξης-απόψυξης.
- Φέρετε όλα τα δείγματα σε θερμοκρασία δωματίου πριν από τη χρήση. Συνιστάται η ανάμειξη των δειγμάτων σε συσκευή στροβίλισμού πριν από τη χρήση.
- 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. Εκτελέστε εις διπλούν ανάλυση των βαθμονομητών, των ορών ελέγχου και των δειγμάτων. Συνιστάται κάθετη ευθυγράμμιση. Χρησιμοποιήστε ένα καθαρό, πλαστικό δοχείο για να ετοιμάσετε το διάλυμα πλύσης. Χρησιμοποιείτε ένα καθαρό αναλόμενο ρύγχος πιπέτας για την προσθήκη κάθε διαφορετικού αντιδραστηρίου και δείγματος προκειμένου να αποφύγετε την επιμόλυνση. Για τη διανομή του χρωμογόνου διαλύματος και του ανασχετικού διαλύματος αποφύγετε πιπέτες με μεταλλικά μέρη.

Για τη διανομή του αποκαλυπτικού διαλύματος και του ανασχετικού διαλύματος αποφύγετε πιπέτες με μεταλλικά μέρη. Η ακρίβεια βελτιώνεται με χρήση πιπετών υψηλής ακρίβειας ή αυτοματοποιημένου εξοπλισμού διανομής με πιπέτες. Τηρείτε τους χρόνους επώασης.

Για να αποφύγετε τη μετατόπιση, ο χρόνος μεταξύ της διανομής με πιπέτα του πρώτου βαθμονομητή και του τελευταίου δείγματος δεν πρέπει να είναι μεγαλύτερος από 30 λεπτά.

Προετοιμάστε μια καμπύλη βαθμονόμησης για κάθε ανάλυση και μη χρησιμοποιείτε δεδομένα από προηγούμενες αναλύσεις.

Διανείμετε το χρωμογόνο διάλυμα εντός 15 λεπτών μετά την πλύση της πλάκας μικροτιτλοδότησης.

Κατά τη διάρκεια της επώασης με το χρωμογόνο διάλυμα αποφύγετε απευθείας έκθεση στον ήλιο της πλάκας μικροτιτλοδότησης.

#### B. Διαδικασία

1. Επιλέξτε τον απαιτούμενο αριθμό υποδοχών για την εκτέλεση. Οι αχρησιμοποίητες υποδοχές θα πρέπει να ξανασφραγίζονται στη σακούλα που περιέχει αποξηραντική ουσία και να φυλάσσονται 2-8°C.
2. Ασφαλίστε τις υποδοχές στη διάταξη συγκράτησης.
3. Διανείμετε με πιπέτα 50 μl από κάθε βαθμονομητή, ορό ελέγχου και δείγμα στις κατάλληλες υποδοχές.
4. Διανείμετε με πιπέτα 50 μl συζεύγματος αντι-INS μέσα σε όλες τις υποδοχές.
5. Επώστε για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
6. Αναρροφήστε το υγρό από κάθε υποδοχή.
7. Πλύνετε την πλάκα 3 φορές:
  - διανέμοντας 0,4 ml διαλύματος πλύσης σε κάθε υποδοχή.
  - αναρροφώντας το περιεχόμενο κάθε υποδοχής
8. Διανείμετε με πιπέτα 100 μl χρωμογόνου διαλύματος σε κάθε υποδοχή εντός 15 λεπτών μετά το στάδιο πλύσης.
9. Επώστε την πλάκα μικροτιτλοδότησης για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου .
10. Διανείμετε με πιπέτα 100 μl ανασχετικού αντιδραστηρίου σε κάθε υποδοχή.
11. Κάντε ανάγνωση των απορροφήσεων στα 450 nm (φίλτρο αναφοράς 630 nm ή 650 nm) εντός 1 ώρας και υπολογίστε τα αποτελέσματα όπως περιγράφεται στην ενότητα XI.

#### XI. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

1. Κάντε ανάγνωση της πλάκας στα 450 nm έναντι ενός φίλτρου αναφοράς που ρυθμίζεται στα 650 nm (ή τα 630 nm).
2. Υπολογίστε τη μέση τιμή των διπλών προσδιορισμών.
3. Σε ημιλογαριθμικό ή γραμμικό χαρτί γραφημάτων, παραστήστε γραφικά τις τιμές OD (τεταγμένη) για κάθε βαθμονομητή έναντι της αντίστοιχης συγκέντρωσης της INS (τετμημένη) και σχεδιάστε μια καμπύλη βαθμονόμησης μέσω των σημείων του βαθμονομητή, συνδέοντας με ευθείες γραμμές τα αποτυπωμένα σημεία.
4. Διαβάστε τη συγκέντρωση για κάθε ορό ελέγχου και δείγμα με αναγωγή στην καμπύλη βαθμονόμησης.
5. 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 παράδειγμα και δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται ποτέ αντί της καμπύλης βαθμονόμησης πραγματικού χρόνου.

INS-ELISA		Μονάδες OD Πολυχρωματικό μοντέλο
Βαθμονομητής	0 μIU/ml	0.025
	5.1 μIU/ml	0.070
	13.8 μIU/ml	0.13
	44.4 μIU/ml	0.507
	128 μIU/ml	1.313
	250 μIU/ml	2.34

#### XIII. ΑΠΟΔΟΣΗ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

##### A. Όριο ανίχνευσης

Μετρήθηκαν 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 OD σε μηδενική δέμευση, ήταν 0,17 μIU/ml.

##### B. Ειδικότητα

Ορμόνες διασταυρούμενης αντίδρασης 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 διασταυρούμενη αντίδραση ενώ ανθρώπινες, χοίρειες και βόειες προΐνσουλίνες δεν παρουσιάζουν διασταυρούμενη αντίδραση.

Προσθεθείσα αναλύσιμη 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
Ανθρώπινη προΐνσουλίνη 32ng/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	23	13.09 ± 0.6	4.8	A	8	13.29 ± 1.08	8.1
B	23	32.9 ± 1.9	6.0	B	7	34.12 ± 3.1	9.0

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

#### Δ. Ορθότητα

##### ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΝΑΚΤΗΣΗΣ

Δείγμα	Προσθεθείσα INS (μIU/ml)	Ανακτηθείσα INS (μIU/ml)	Ανάκτηση (%)
Ορός	182.1	174.5	95.8
	86.7	80	92.3
	39.6	37.4	94.4
	15.1	13.6	90

##### ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΡΑΙΩΣΗΣ

Δείγμα	Αραίωση	Θεωρητική συγκέντρωση (μIU/ml)	Μετρηθείσα συγκέντρωση (μIU/ml)
Ορός 1	1/1	-----	82.3
	1/2	41.2	42.21
	1/4	20.6	22.86
	1/8	10.3	11.04
	1/16	5.15	5.9
	1/32	2.58	3.3
Ορός 2	1/1	-----	57.5
	1/2	28.7	27.7
	1/4	14.4	14.5
	1/8	7.2	8.0
	1/16	3.6	4.4
	1/32	1.8	2.3

Τα δείγματα αραιώθηκαν με μηδενικό βαθμονομητή.

#### E. Μεσοδιάστημα μεταξύ της διανομής τελευταίου βαθμονομητή και δείγματος

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

	T0	10 λεπτά	20 λεπτά	30 λεπτά
C I	12.8	12.7	12.4	12.9
C II	31.3	30.7	30	28.6

## ΣΤ. Φαινόμενο αγκίστρου (hook)

Δείγμα που εμβολιάστηκε με INS έως 10000 μIU/ml δίνει υψηλότερες μετρήσεις οπτικής πυκνότητας (OD) από το σημείο του τελευταίου βαθμονομητή.

## XIV. ΕΣΩΤΕΡΙΚΟΣ ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

- Εάν τα αποτελέσματα που λαμβάνονται για τον ορό ελέγχου 1 ή/και τον ορό 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 (pools), τα οποία πρέπει να διατηρούνται κατενυγμένα σε κλάσματα/δόσεις μιας χρήσης.
- Τα κριτήρια αποδοχής για τη διαφορά μεταξύ των διπλών αποτελεσμάτων των δειγμάτων θα πρέπει να βασίζονται σε ορθές εργαστηριακές πρακτικές.
- Συνιστάται οι οροί ελέγχου να υποβάλλονται σε προσδιορισμό τακτικά ως άγνωστα δείγματα για να μετράται η μεταβλητότητα του προσδιορισμού. Η απόδοση του προσδιορισμού πρέπει να παρακολουθείται με διαγράμματα ποιοτικού ελέγχου των ορών ελέγχου.
- Είναι καλό το να ελέγχετε οπτικά την προσαρμογή της καμπύλης που επιλέχθηκε από τον υπολογιστή.

## XV. ΤΙΜΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Το πεδίο τιμών των επιπέδων της ινσουλίνης σε 29 υποκείμενα με φυσιολογικές εξετάσεις ανοχής σε γλυκόζη ληφθείσα από το στόμα βασίζεται στα ποσοστά επί τους εκατό από 2,5 έως 97,5 του συνόλου των δεδομένων

Οι τιμές αυτές παρέχονται μόνον ως οδηγός. Κάθε εργαστήριο θα πρέπει να καθιερώσει το δικό του πεδίο φυσιολογικών τιμών.

## XVI. ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ

### Ασφάλειας

Μόνο για διαγνωστική χρήση *in vitro*.

Τα συστατικά ανθρώπινου αίματος που περιλαμβάνονται στο κιτ 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 πλάσματος 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.

Αποφύγετε κάθε επαφή με το δέρμα με όλα τα αντιδραστήρια. Το ανασχετικό διάλυμα περιέχει HCl. Σε περίπτωση επαφής, πλύνετε σχολαστικά με νερό.

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 γάντια μιας χρήσης.

## XVII. 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).  
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.

## XVIII. ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΤΟΥ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟΥ

	ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΤΕΣ (μl)	ΔΕΙΓΜΑ(ΤΑ) ΟΡΟΙ ΕΛΕΓΧΟΥ (μl)
Βαθμονομητές (0-5) Δείγματα, οροί ελέγχου Σύζευγμα αντι-INS-HRP	50 - 50	- 50 50
Επωάστε για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Αναρροφήστε το περιεχόμενο κάθε υποδοχής. Πλύνετε 3 φορές με 400 ml διαλύματος πλύσης και αναρροφήστε.		
χρωμογόνου διαλύματος	100	100
Επωάστε για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.		
Ανασχετικό διάλυμα	100	100
Κάντε ανάγνωση σε συσκευή ανάγνωσης πλακών μικροτιτλοδότησης και καταγράψτε την απορρόφηση κάθε υποδοχής στα 450 nm (έναντι 630 ή 650		



Használat előtt olvassa el a teljes használati utasítást.

## INS-ELISA

### I. VIZSGÁLAT CÉLJA

Immunoenzimatikus vizsgálat a humán inzulin (INS) szérumból történő *in vitro* kvantitatív meghatározására.

### II. ÁLTALÁNOS INFORMÁCIÓK

- A. **Bejegyzett név:** DIAsource INS-ELISA Reagenskészlet
- B. **Katalógusszám:** KAP1251 : 96 vizsgálat
- C. **Gyártó :** DIAsource ImmunoAssays S.A.  
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

**Gyakorlati jellegű vagy rendeléssel kapcsolatos kérdésekkel hívja a következő számot:**

**Tel : +32 (0)10 84.99.11**

**Fax : +32 (0)10 84.99.91**

### III. KLINIKAI HÁTTER

#### A Az inzulin biológiai szerepe

Az inzulin 5800 Da molekulásúlyú polipeptid hormon, melyet a hasnyálmirigy Langerhans-szigeteinek béta sejtjei termelnek. A szervezetben sokféle feladatot lát el. Serkenti a sejtek glükózfelvételét, a glükóz oxidációját, a glükogenezist, a lipogenezist, a proteogenezist és a DNS és RNS termelését. Kulcsszerepet játszik a plazma glükózszintjének szabályozásában (a máj glükózleadását gátolja, a perifériális glükózfelhasználást serkenti). Az inzulin hatására kialakuló hipoglikémiát hiperglikémiás hatású hormonok (glukagon, növekedési hormon, kortizol, epinefrin) ellensúlyozzák. Az inzulin termelődését elsősorban a plazma glükózszintje szabályozza: hiperglikémia esetén azonnal, nagy mértékben nő a vérkeringésben az inzulinszint. Idegrendszeri hatások, valamint különböző anyagcsere- és hormonális faktorok (aminosavak, glukagon, gasztrointesztinális hormon) is részt vesznek az inzulinszekréció szabályozásában. Az I. típusú (inzulinfüggő: "juvenilis") diabéteszt a béta sejtek pusztulása okozza, ekkor egyáltalán nem termelődik inzulin. A II. típusú (nem inzulinfüggő: "felnőttkorban kialakuló") cukorbetegség esetében egyrészt az inzulinrezisztencia játszhat fontos szerepet, illetve sok évi fejlődés után a béta sejtek működése rendellenessé válhat. Ez relatív inzulinhiányhoz vezet, egyes esetekben inzulinkezelésre is szükség van. Az inzulinrezisztenciát akkor alakul ki, ha a keringésben nagy mennyiségben jelen van a hormon. Az esetek többségében az ilyen beteg túlsúlyos. Különböző hormonális betegségek (akromegália, Cushing-szindróma), valamint ritkán az inzulinreceptorok hibás működése, illetve az inzulinreceptor elleni antitestek jelenléte esetén is kialakulhat glükóz intolerancia, vagy akár diabetes is az inzulinrezisztencia miatt. A plazma inzulinszintjének meghatározása fontos adatot szolgáltat a hipoglikémia diagnózisának felállításához. A magas inzulinszint inzulínómát is jelezhet (béta-sejt tumor). A funkcionális posztprandiális hipoglikémiát az is okozhatja, hogy a szénhidrátfelvételt követően nem megfelelő az inzulinfelszabadulás. Az inzulinszint két módon vizsgálható, éhgyomri állapotban vagy dinamikus teszttel:

- stimulációs teszt : szénhidrátban gazdag étkezés, orális glükóz tolerancia teszt (OGTT), arginin infúzió, tolbutamid, vagy más szulfonilurea beadása.
- inhibíciós teszt : böjtölés, szomatostatatin infúzió




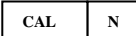
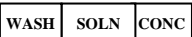
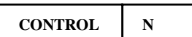
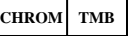
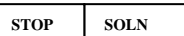
#### B. Az inzulinmeghatározás klinikai felhasználása

- A béta-sejt tartalékok meghatározása glükóz tolerancia teszt során, vagy szénhidrátban gazdag étkezés után, útmutatóul az inzulininterápia beállításához;
- Segítség az inzulinfüggő és nem inzulinfüggő diabetes diagnózisának felállításához;
- A glükóz intolerancia státuszának jellemzése és követése;
- Az inzulinrezisztenciás esetek felismerése és tanulmányozása;
- Inzulínóma és más hipoglikémiás esetek diagnosztizálása.

#### IV. A MÓDSZER ELVE

A DIAsource INS-ELISA kitje szilárd fázisú fokozott érzékenyséű enzimesszé, mely egyenként leválasztható vályulatokat tartalmazó mikrotiter lemez formában kerül leszállításra. A készlet olyan monoklonális ellenanyagokat (Mab) használ, amelyek az inzulin különböző epitópjait ismerik fel. A kalibrátorok és a minták reagálnak a mikrotiter lemez teszthelyeinek felületére kötött monoklonális ellenanyaggal (MAB 1), valamint a másik monoklonális ellenanyaggal (MAB 2), amely torma peroxidázzal (HRP) van jelölve. Az inkubációs idő alatt kialakul a szendvics: a felülethez kapcsolt MAB 1 – humán inzulin – MAB 2 – HRP összekapcsolódik, majd a lemez mosásával pedig eltávozik a szabadon maradt enzimmel jelölt ellenanyag. A megkötött, enzimmel jelölt ellenanyag mennyiségét színreakció segítségével lehet mérni. A kromogén oldat (használatra kész TMB) hozzáadása után inkubálni kell a lemezeket. A reakciót a Stop oldat hozzáadásával kell leállítani, ekkor a megfelelő hullámhosszon leolvashatók az eredmények. A szubsztrátum mennyiségére a mért abszorbanciából lehet következtetni, ami arányos az inzulin-koncentrációval. Kalibrációs görbét kell felállítani, amelyről interpolációval leolvasható a minták inzulin-koncentrációja.

#### V. A REAGENSZÉSZLET TARTALMA

Reagens	Mennyiség 96 mintához	Szín	Feloldás
 Mikrotiter lemez 96 anti-inzulinnal (monoklonális ellenanyag) fedett egyenként törhető vályulatokban	96 teszthely	kék	Használatra kész
 Konjugátum: HRP-vel jelölt anti-inzulin (monoklonális ellenanyag) TRIS-HCl pufferben, bovin szérum albuminnal és thymollal	1 ampulla 6 ml	piros	Használatra kész
 Nulla kalibrátor emberi plazma, thymollal	1 ampulla líoifilizált	sárga	Adjon hozzá 2 ml desztillált vizet
 Kalibrátorok - N = 1 - 5 (a pontos értékeket l. az ampullák címkéin) emberi plazma, thymollal	5 ampulla líoifilizált	sárga	Adjon hozzá 1 ml desztillált vizet
 Mosóoldat (TRIS-HCl)	1 ampulla 10 ml	barna	Hígítsa 200 x desztillált vízzel (használgjon mágneses keverőt).
 Kontrollok - N = 1 vagy 2 thymolt tartalmazó emberi plazma	2 ampulla líoifilizált	ezüst	Adjon hozzá 1 ml desztillált vizet
 Kromogén TMB (Tetrametilbenzidin)	1 ampulla 12 ml	fekete	Használatra kész
 Stop oldat: HCl 1,0 N	1 ampulla 12 ml	fehér	Használatra kész

**Megjegyzés :**

- Minták hígításához használja a nulla kalibrátort
- A kalibrátor reagens 1 µIU mennyisége megfelel 1 µIU IRP66/304-nek.

#### VI. A FELHASZNÁLÓ ÁLTAL BIZTOSÍTOTT ESZKÖZÖK

A következő eszközöket a készlet nem tartalmazza, de szükségesek a vizsgálat elvégzéséhez:

- Kiváló minőségű desztillált víz
- Pipetták: 50 µl, 500 µl és 2 ml beméréséhez (ajánlott pontos pipetták és eldobható műanyag pipettahegyek használata)

- Vortex
- Mágneses keverő
- Mikrotiter lemez mosó
- Mikrotiter lemez leolvasó, mely egyaránt képes 450 nm-en és 650 nm-en (Bikromatikus leolvasás)

#### VII. REAGENSEK ELŐKÉSZÍTÉSE

- Kalibrátorok:** Oldja fel a nulla kalibrátort 2 ml, a többi kalibrátort pedig 1 ml desztillált vízben.
- Kontrollok:** Oldja fel a kontrollokat 1 ml desztillált vízben.
- Hígított mosóoldat:** Készítsen megfelelő mennyiségű hígított mosóoldatot úgy, hogy 199 rész desztillált vízhez 1 rész mosóoldatot (200x) kever. Homogenizálja mágneses keverő segítségével. A napi vizsgálatok végeztével öntse ki a megmaradt hígított mosóoldatot.

#### VIII. A REAGENSEK TÁROLÁSA ÉS ELTARTHATÓSÁGA

- Felnyitás és feloldás nélkül a reagens 2-8°C-on tárolva a címkén feltüntetett időpontig használható.
- A használatlan csíkok 2-8°C-on, lezárt, nedvszívó anyagot tartalmazó tasakban a lejárati idejükig eltarthatók.
- Feloldás után a kalibrátorok és kontrollok 2-8°C-on egy hétig tarthatók el. Hosszabb tárolás esetén ossza őket több esőbe, és fagyassza le -20°C-ra. Kerülje a többszöri lefagyasztást és felolvasztást.
- A tömény Mosóoldat szobahőmérsékleten a lejárati idejéig felhasználható. A frissen készült hígított mosóoldatot még aznap fel kell használni.
- Az első használat után a konjugátum a feltüntetett lejárati idejéig eltartható, ha 2-8°C-on, az eredeti ampullában, jól visszazárva tárolja.
- A reagens fizikai tulajdonságainak megváltozása valószínűleg azt jelzi, hogy megromlottak.

#### IX. MINTAVÉTEL ÉS ELŐKÉSZÍTÉS

- A savómintákat 2-8°C-on kell tárolni.
- Amennyiben nem végzi el a vizsgálatot 24 órán belül, ajánlott a mintákat -20°C-on szétosztva tárolni. Kerülje a minták többszöri lefagyasztását és felolvasztását.
- Használat előtt várja meg, amíg a reagens szobahőmérsékletre melegednek. A mintákat bemérés előtt ajánlott alaposan megkeverni.
- Ne használjon hemolizált mintákat.

#### X. A VIZSGÁLAT MENETE

- Tudnivalók**  
Ne használja a reagenset a lejárati idejükön túl.  
Ne keverjen össze eltérő gyártási számú reagenskészletekből származó anyagokat.  
Használat előtt várja meg, amíg a reagens felmelegednek szobahőmérsékletre  
Minden reagent és mintát alaposan keverjen meg enyhe rázással vagy forgatással.  
A kalibrátorokkal, a kontrollokkal és a mintákkal is két párhuzamos mérést végezzen. A függőleges elrendezés javasolt.  
A Mosóoldat elkészítéséhez használjon tiszta műanyag edényt.  
A keresztszennyeződés elkerülése érdekében minden reagens és minta beméréséhez használjon új eldobható pipettahegyet.  
A Kromogén TMB és a Stop oldat pipettázására ne használjon fém részeket tartalmazó pipettázót!  
Nagypontosságú pipetták és automata pipettázó készülék használata növeli a mérés pontosságát.  
Tartsa be az inkubációs időket.  
Hogy elkerülje a csúszást, ügyeljen, hogy az első kalibrátor és az utolsó minta bemérése között legfeljebb 30 perc teljen el.  
Állítson fel kalibrációs görbét minden méréskor, ne használja a korábbi mérések adatait.  
A Kromogén oldatot a mikrotiter lemez mosását követő 15 percen belül pipettázza a vályulatokba. A Kromogén oldattal történő inkubálás során ügyeljen arra, hogy a lemezt ne érje közvetlen napsugárzás.

#### B. A vizsgálat menete

- Válassza ki a megfelelő számú vályulatot a vizsgálatához. A fel nem használt vályulatok 2-8°C között szárítószert tartalmazó, lezárt zacskóban tárolhatók.
- A vályulatokat rögzítse a mikrotiter lemez keretébe.
- Mérjen 50 µl-t minden kalibrátorból, kontrollból és mintából a megfelelő teszthelyekre.
- Pipettázzon 50 µl anti-INS-HRP konjugátumot minden teszthelyre.
- Inkubálja 30 percig szobahőmérsékleten.

6. Szívja le a folyadékot a teszthelyekről.
7. Mossa a lemezt 3-szor így:
  - mérjen be 0,4 ml Mosóoldatot minden teszthelyre
  - szívja le a teszthelyek tartalmát
8. A mosási lépést követő 15 percen belül pipettázzon minden egyes vályulatba 100 µl Kromogén oldatot. Inkubálja 15 percig szobahőn.
9. Inkubálja 15 percig szobahőmérsékleten.
10. Mérjen 100 µl Stop oldatot minden teszthelyre.
11. Olvassa le az abszorbanciákat 450 nm-en (referencia szűrő 630 nm vagy 650 nm) 1 órán belül, és a XI. fejezet alapján számolja ki az eredményeket.

#### XI. EREDMÉNYEK KISZÁMÍTÁSA

1. Olvassa le a lemezt 450 nm-en, a referencia szűrőt állítsa 650 nm-re (vagy 630 nm-re).
2. Számítsa ki a párhuzamos mérések átlagát.
3. Féllogaritmikus vagy lineáris koordináta-rendszerben ábrázolja az egyes kalibrátorok OD értékeit (ordináta) a megfelelő INS koncentráció függvényében (abszcissa), és rajzolja fel a kalibrációs görbét úgy, hogy a bejelölt pontokat összeköti egyenes vonalakkal.
4. Olvassa le a kontrollok és a minták koncentrációit a kalibrációs görbéről interpoláció segítségével.
5. A számítógépes értékelés leegyszerűsíti ezeket a számításokat. Ha automatikus eredményfeldolgozást alkalmaz, javasolt a 4-paraméteres logisztikus függvény görbéjének illesztése.

#### XII. JELLEMZŐ MÉRÉSI EREDMÉNYEK

A következő adatok csak példaként szolgálnak, soha ne használja őket a valós idejű kalibráció helyett.

INS-ELISA		OD egységek, polikromatikus modell
Kalibrátor	0 µIU/ml	0.025
	5.1 µIU/ml	0.070
	13.8 µIU/ml	0.13
	44.4 µIU/ml	0.507
	128 µIU/ml	1.313
	250 µIU/ml	2.34

#### XIII. A VIZSGÁLAT JELLEMZŐI ÉS KORLÁTAI

##### A. A kimutathatóság alsó határa

Húsz nulla kalibrátort vizsgáltak meg egy másik kalibrátor soral együtt. A kimutathatóság alsó határa, ami a nulla kötődés esetén mért átlagos OD két standard deviációval megnövelt értéke, 0.17 µIU/ml-nek bizonyult.

##### B. Specificitás

Keresztreakgáló hormonokat adtak a magas koncentrációjú kalibrátorhoz (100 µIU/ml vagy 4 ng/ml). Ezután meghatározták a mintában mérhető inzulin-mennyiséget.

Ahogy ez az alábbiakból is látszik, többféle állati inzulin keresztreakgál (kivéve a patkányét), azonban az emberi, a sertésből, illetve a szarvasmarhából származó proinzulin nem mutat keresztreakciót.

A nagy koncentrációjú savóhoz hozzáadott vegyület	Elméleti INS konc. (ng/ml)	Mért INS konc. (ng/ml)	Keresztreakció (%)
Sertés inzulin	8 ng/ml	17,4	> 100
Szarvasmarha inzulin	8 ng/ml	17,8	> 100
Kutya inzulin	16 ng/ml	17,2	81
Nyúl inzulin	16 ng/ml	14,1	62
Rat insulin	16 ng/ml	3,7	0
Emberi proinzulin	32 ng/ml	4,3	0,3
Sertés proinzulin	16 ng/ml	4,3	2,5
Szarvasmarha proinzulin	16 ng/ml	4,3	0,6

#### C. Reprodukálhatóság

VIZSGÁLATON BELÜLI VIZSGÁLATOK KÖZÖTTI

Savó	N	<X> ± SD (µIU/ml)	CV (%)	Savó	N	<X> ± SD (µIU/ml)	CV (%)
A	23	13.09 ± 0.6	4.8	A	8	13.29 ± 1.08	8.1
B	23	32.9 ± 1.9	6.0	B	7	34.12 ± 3.1	9.0

SD: standard deviáció; CV: variációs koefficiens

#### D. Pontosság

VISSZANYERÉS

Minta	Hozzáadott INS (µIU/ml)	Visszanyert INS (µIU/ml)	Visszanyerés (%)
Savó	182.1	174.5	95.8
	86.7	80	92.3
	39.6	37.4	94.4
	15.1	13.6	90

HÍGÍTÁSI VIZSGÁLAT

Minta	Hígítás	Elméleti koncentráció (µIU/ml)	Mért koncentráció (µIU/ml)
Savó 1	1/1	-----	82.3
	1/2	41.2	42.21
	1/4	20.6	22.86
	1/8	10.3	11.04
	1/16	5.15	5.9
	1/32	2.58	3.3
Savó 2	1/1	-----	57.5
	1/2	28.7	27.7
	1/4	14.4	14.5
	1/8	7.2	8.0
	1/16	3.6	4.4
	1/32	1.8	2.3

A minták hígítása a nulla kalibrátorral történt.

#### E. Az utolsó kalibrátor és a minták bemérése között eltelt idő

Ahogy ezt az alábbi adatok is mutatják, a vizsgálat eredményeit nem befolyásolja, ha egy minta bemérése akár 30 perccel az utolsó kalibrátor után történik.

	0'	10'	20'	30'
C I	12.8	12.7	12.4	12.9
C II	31.3	30.7	30	28.6

#### F. Kioltási effektus

Az akár 10000 µIU/ml-re növelt inzulin koncentrációjú minták is magasabb OD értéket adnak a legmagasabb kalibrátornál.

#### XIV. BELSŐ MINŐSÉGELLENŐRZÉS

- Ha a kontroll 1-re és 2-re kapott eredmények kívül esnek az ampullák címkéin feltüntetett tartományon, a vizsgálat eredményei nem használhatók fel, kivéve, ha ismert az eltérés pontos oka.
- Igény esetén bármely laboratórium készíthet egy saját, kontrollként szolgáló savó-poolt, amit azután szétoztva, lefagyasztva kell tárolni.
- A párhuzamos vizsgálatok eredményei közötti eltérés elfogadható mértékét a GLP (Good Laboratory Practises) alapján kell meghatározni.
- Ajánlott a Kontrollokat ismeretlen mintákként rutinszerűen vizsgálni, hogy ellenőrizhető legyen a vizsgálat variabilitása. A reagenskészlet

működése a kontrollok minőségellenőrző táblázataival összehasonlítva ellenőrizhető.

- Érdemes szemmel is ellenőrizni a számítógép által illesztett görbét.

#### XV. REFERENCIATARTOMÁNY

Normál orális glukóz tolerancia tesztet adó kísérleti személyekben az inzulin szint 5-19 µIU/ml értéket adott az adathalmaz 2,5 - 97,5 percentiljében. Ezek az értékek csak irányadóak; minden laboratóriumnak fel kell állítania saját normál tartományát.

#### XVI. MUNKAVÉDELEM

##### **Biztonsági előírások**

Csak in vitro diagnosztikai felhasználásra.

A készlet emberi vérből készült reagenseit európai szabványok szerinti és/vagy az FDA által minősített módszerrel HBsAg-tól, valamint anti-HCV, és anti-HIV-1 és 2 ellenanyagoktól mentesnek találták. Azonban egyetlen ma ismert módszer alapján sem állítható biztosan, hogy az emberi vérből készült anyagok nem okozhatnak hepatitiszt, AIDS-et vagy más fertőző betegséget. Ezért minden ilyen reagenst és minden savó-, illetve plazmamintát a fertőző anyagokra vonatkozó helyi biztonsági előírásoknak megfelelően kell kezelni.

Minden állati eredetű reagens és termék egészséges állatokból származik. A szarvasmarha eredetű reagensek olyan országokból származnak, ahonnan eddig nem jelentettek BSE esetet. Ennek ellenére minden állati eredetű anyagot tartalmazó reagenst potenciálisan fertőzésveszélyesként kell kezelni.

Ügyeljünk arra, hogy egyetlen reagens se érintkezzen a bőrrel. A Stop oldat sósavat tartalmaz. Amennyiben mégis bőrre kerülne, mossa le őket alaposan. Ne dohányozzon, ne fogyasszon ételt vagy italt, illetve ne használjon kozmetikumokat a laboratóriumban. Ne pipetázzon szájjal. Munka közben viseljen laborköpenyt és egyszer használatos kesztyűt.

#### XVII. IRODALOM

- 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.

#### XVIII. AZ ELJÁRÁS ÖSSZEFOGLALÁSA

	KALIBRÁTOROK (µl)	MINTÁK, KONTROLLOK (µl)
Kalibrátorok (0-5) Minták, kontrollok Anti-INS-HRP konjugátum	50 - 50	- 50 50
Inkubáljuk 30 percig szobahőn. Szívja le a teszthelyek tartalmát. Mossa háromszor 400 µl mosóoldattal, majd szívja le a folyadékot.		
Kromogén oldatot	100	100
Inkubáljuk 15 percig szobahőn		
Stop oldat	100	100
Olvassa le a teszthelyek abszorbanciáját mikrotiter lemez leolvadó segítségével 450 nm-en (630 vagy 650 nm-es referenciával szemben)		