

Reactivos para la Determinación de Anticuerpos Anti-Insulina

Solo para diagnóstico In Vitro

Para uso exclusivo de Laboratorios Clínicos o de Gabinetes
Conservar entre 2°C a 8°C

RESUMEN

La Insulina es la principal hormona en el control del metabolismo de la glucosa. Es sintetizada por las células β presentes en el islote de Langerhans al igual que su precursora, la Proinsulina, la cual es procesada para formar Péptido C e Insulina. Ambas son secretadas en cantidades equimolares. La molécula madura de Insulina está formada por dos cadenas polipeptidas, la cadena A y la cadena B (formadas por 21 y 30 aminoácidos respectivamente). Ambas cadenas están unidas por dos puentes disulfuro intra catenarios. Existe además otro puente disulfuro intra catenario en la cadena A. Las concentraciones de insulina se ven severamente reducidas en casos de Diabetes Mellitus Insulino Dependiente (IDDM) y en otras condiciones tales como el hipopituitarismo. Los niveles se ven elevados en casos de Diabetes Mellitus Insulino Independiente (NIDDM), obesidad, insulinoma y otras disfunciones endocrinales tales como Síndrome de Cushing y Acromegalia.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

Este kit de Insulina es un método ELISA de dos sitios en fase sólida. Está basado en la técnica de sándwich directo en que dos anticuerpos monoclonales son dirigidos a dos determinados antígenos separados en la molécula de Insulina. Durante la incubación, la Insulina en la muestra reacciona al conjugado enzimático anti-Insulina-HRP y al anticuerpo anti Insulina unido al micropozo. Un simple paso de lavado remueve el conjugado enzimático no unido. El conjugado HRP unido es detectado gracias a la aplicación del sustrato. La reacción es frenada al agregar ácido para brindar una concentración colorimétrica que es leída utilizando un lector de ELISA.

REACTIVOS

Materiales abastecidos con el equipo de prueba

1. Micropozos recubiertos con Anti-Insulina Mab
2. Estándares de Insulina. Listos para su uso. 6 viales
3. Conjugado enzimático. 1 vial
4. Diluyente del ensayo. Listo para su uso. 1 frasco
5. Sustrato TMB. Listo para su uso. 1 frasco
6. Solución de paro. Listo para su uso. 1 frasco.
7. Solución de lavado concentrado 20X. 1 frasco.

Materiales requeridos pero no abastecidos

1. Agua destilada o desionizada.
2. Pipetas de precisión.
3. Puntas de pipetas desechables.
4. Lector Microelisas con lente a 450nm de longitud de onda con una banda de amplitud de 10nm o menor y un rango de densidad óptica de 0-2 OD o mayor.
5. Papel absorbente o toalla de papel.
6. Papel cuadriculado.

ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

1. Almacene el kit a 2 - 8°C.
2. Mantenga las tiras de los pocillos selladas en la bolsa de aluminio.
3. Todos los compuestos son estables hasta su fecha de expiración siempre y cuando las condiciones de almacenaje sean estrictamente llevadas a cabo como aquí se indica.
4. No exponga los reactivos al calor, luz solar o intensa luz eléctrica.

CUIDADOS Y PRECAUCIONES

1. Potencial de los materiales de riesgo biológico: Los calibradores contienen componentes de origen humano, que se han sido probados y encontrados no reactivos para el antígeno de superficie de hepatitis B y anticuerpos contra el VIH Aprobado por la FDA. Sin embargo no hay método de prueba que puede ofrecer completa seguridad de que el virus VIH, Hepatitis B u otros agentes infecciosos estén presentes. Estos reactivos deben ser manejados según el Nivel de Bioseguridad 2, como se recomienda en los Centros para el Control de Enfermedades / Institutos Nacionales de Salud manuales. "Bioseguridad en laboratorios microbiológicos y biomédicos" 1984.
2. No pipetee con la boca. No fume, coma, o beba en el área donde maneje este equipo.
3. Los componentes en este equipo son para uso como una unidad integral. Los componentes de diferentes lotes no se deben mezclar.
4. Es recomendable que los estándares, controles y muestras de suero se corran por duplicado.
5. Para obtener óptimos resultados, debe apegarse estrictamente al protocolo. Pipeteado exacto y preciso, así como después de la hora exacta y requerimientos de temperatura prescritos son esenciales. Cualquier desviación de este pueden dar datos no válidos.

RECOLECCION DE LA MUESTRA

1. Recolectar la sangre por venopunción y separar el suero de inmediato.
2. En caso de no llevar a cabo el examen inmediatamente, refrigerar la muestra a (2-8° C) por cinco días. En caso de exceder dicho plazo, congelar a -20° C hasta un mes.
3. Evitar múltiples ciclos de congelación - descongelación.
4. Previo al ensayo, la muestra deberá ser debidamente descongelada y mezclada.
5. Evitar utilizar muestras con exceso de lípidos.

PREPARACIÓN DEL REACTIVO

1. Conjugado Enzimático: Prepara una solución de trabajo 1X a 1:20 con el diluyente de ensayo requerido. Por ej. 0.1 ml del conjugado en 1.9 ml de diluyente de ensayo es suficiente para 20 micropozos. El conjugado diluido debe ser utilizado a la brevedad
2. Solución de Lavado: Preparar una solución de lavado a 1X, adicionando el contenido de la botella (25 ml, 20 X) a 475 ml de agua destilada o des ionizada. Conservar a temperatura ambiente (18-26° C).

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

Previo al ensayo, todas las muestras y reactivos deben ser llevados a temperatura ambiente (18-26° C). Mezclar gentilmente todos los reacti-



"Rápida solución a tus necesidades clínicas"

Distribuido por:

DIAGNÓSTICA INTERNACIONAL S.A. de C.V.
Rudyard Kipling 4886 Col. Jardines de la Patria
CP 45110 Zapopan, Jalisco, México
Lada sin costo: 01 800 440 0404 c/ 10 líneas
Tel: 01 (33) 3770 1940 c/ 10 líneas

vos previos a su uso.

1. Corte el número de pozos a utilizar. Cierre y selle el resto de los pozos no utilizados y refrigérelos a 2-8° C.
2. Dispensar 25µl de los estándares, control y muestras en los pozos designados.
3. Agregar 100µl del conjugado enzimático en cada pozo.
4. Agitar suavemente la microplaca por 10 segundos.
5. Incubar a temperatura ambiente (18-25° C) por 60 minutos.
6. Remover el líquido de los pozos. Lavar en tres tiempos con 300 µl de solución de lavado a 1x. Golpee los pozos sobre una toalla o papel absorbente.
7. Agregar 100 µl de sustrato TMB en cada pozo.
8. Incubar a temperatura ambiente (18-25° C) por 15 minutos.
9. Frenar la reacción agregando 50 µl de Solución de paro a cada pozo. Agitar gentilmente por 15-20 segundos para facilitar el mezclado.
10. Leer la densidad óptica a 450nm con un lector de placa de micro valoración en un plazo de 15 minutos después de haber agregado la solución de frenado.

Ejemplo de curva estándar

	OD 450 nm	Conc. µIU/mL
Std 1	0.05	0.0
Std 2	0.11	6.25
Std 3	0.22	12.5
Std 4	0.49	25.0
Std 5	1.00	50.0
Std 6	2.11	100.0

VALORES ESPERADOS

Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios rangos normales sobre la base de una muestra representativa de la población local. En un estudio realizado sobre adultos aparentemente sanos se obtuvo el siguiente resultado: < 25 µIU/ml.

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

1) Correlación con un kit ELISA de referencia

Un total de 62 muestras de suero fueron analizadas utilizando el presente kit ELISA y otro kit de referencia. Los resultados se resumen en la siguiente tabla:

Correlación	Inclinación	Intercepción
0.91	0.80	0.24

2) Precisión

Intraensayo

Suero	Replicas	Resultado µIU/mL	SD	CV
1	10	9.26	0.58	6.3
2	10	7.01	0.57	8.1

Interensayo

Suero	Replicas	Resultado µIU/mL	SD	CV
1	10	6.79	0.58	8.5
2	10	9.27	0.69	7.4

3. Linealidad

Dos muestras diferentes fueron diluidas con el calibrador "0" a 1:2, 1:4, 1:8. Fueron calculados los valores de Insulina y los resultados corregidos con el factor de dilución.

Valor original		Porcentaje de recuperación		
Suero	ng/ml	1/2	1/4	1/8
1	30	95.1	91.5	88.6
2	71	106	95.5	105

4) Sensibilidad

La sensibilidad fue determinada al calcular la media más dos desvíos estándar del estándar cero, analizados 20 veces en la misma prueba:

Suero	Replicas	Media	SD	Media + 2SD
Estándar cero	20	0.477	0.495	1.467

5) Especificidad

Los anticuerpos utilizados en este kit tuvieron reactividad cruzada con Insulina bovina (20-25%) y con Insulina porcina, pero no con Proinsulina de ninguna especie ni con otros complejos insulinos.

6) Recuperación

Las muestras fueron enriquecidas con la adición de soluciones de insulina en concentraciones conocidas en una proporción de 1:1

LIMITACIONES DE LA PRUEBA

1. Los resultados obtenidos por medio presente test solo deben ser utilizados como ayuda en el diagnóstico y deben ser interpretados en relación a la historia clínica del paciente, pruebas físicas y otros procesos de diagnóstico.
2. No utilice ácido de sodio como preservante ya que inhibe la actividad de la enzima HRP.

REFERENCIAS

1. Ashby, J. and Frier, B.: *Circulating C-Peptide: Measurement and Clinical Applications. Annals of Clinical Biochemistry.* 18:125, 1981
2. Beischer, W.: *Proinsulin and C-Peptide in Humans. Hormones in Normal and Abnormal Human Tissues. Volume 3K, Fotherby and Pal, S., ed. (Berlin: Walter DeGruyter). pp. 1-43, 1983*
3. Beyer, J., Krause V., Cordes V.: *C-Peptide: Its Biogenesis, Structure, Determination and Clinical Significance. Giornale Italiano di Chimica Clinica 4 Supp. 9:22, 1979*
4. Bongor, A. and Garcia-Webb, P.: *C-Peptide Measurement: Methods and Clinical Utility. CRC Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences.* 19:297, 1984.
5. Chevenne D., Ruiz J., Lohmann L., et al.: *Immunoradiometric Assay of Human Intact Proinsulin Applied to Patients with Type 2 Diabetes, Impaired Glucose Tolerance, and Hyperandrogenism. Clinical Chemistry.* 40/5:754, 1994
6. Bowsher R. R., Wolny J. D. and Frank B. H.: *A Rapid and Sensitive Radioimmunoassay for the Measurement of Proinsulin in Human Serum. Diabetes.* 41:1084, 1992
7. Kao P. C., Taylor R. L. and Service F. J.: *Proinsulin by Immunochemiluminometric Assay for the Diagnosis of Insulinoma. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.* 78:1048, 1994.

Diagnóstica
Internacional



"Rápida solución a tus necesidades clínicas"

FABRICADO POR:
CALBIOTECH, INC
10461 AUSTIN DRIVE,
SPRING VALLEY, CA 91978, U.S.A