
INSIK-5
(P2796)

DiaSorin

English	p. 1
Italiano.....	p. 9
Français	p. 17
Español	p. 26

INSULIN RADIOIMMUNOASSAY KIT

Procedure for quantitative determination of insulin in human serum or plasma samples

For in vitro diagnostic use only

1. INTRODUCTION

Insulin is a polypeptide hormone of molecular weight 6000 daltons, composed of two peptide chains, A and B, joined by two cross-linked disulphide bonds and synthesized by the beta cells of the islets of Langerhans of the pancreas.

Insulin influences most of the metabolic functions of the body. Its best known action is to lower the blood glucose concentration by increasing the rate at which glucose is converted to glycogen in the liver and muscles and to fat in adipose tissue, by stimulating the rate of glucose metabolism and by depressing gluconeogenesis.

Insulin stimulates the synthesis of proteins, DNA and RNA in cells generally, and promotes the uptake of amino acids and their incorporation into muscle protein. It increases the uptake of glucose in adipose tissue and its conversion into fat and inhibits lipolysis.

Insulin primary action is on the cell membrane, where it probably facilitates the transport of glucose and amino acids into the cells. At the same time it may activate intracellular enzymes such as glycogen synthetase, concerned with glycogen synthesis.

2. PRINCIPLE OF THE ASSAY

The principle of the assay is based on the competition between labelled insulin and insulin contained in calibrators or samples to be assayed for a fixed and limited number of antibody binding sites. After the incubation, the amount of labelled insulin bound to the antibody is inversely related to the concentration of unlabelled insulin present in calibrators or samples. The method adopted for B/F separation is based on the use of a precipitating reagent, in which a second antibody is pre-precipitated and in excess.

3. REAGENTS PROVIDED IN THE KIT

¹²⁵ I-labelled insulin	1 vial
Insulin antiserum	1 vial
Insulin calibrators	6 vials
Control serum	1 vial
Precipitating reagent	2 bottles
Number of tubes	100

STORAGE: Upon receipt, the kit should be stored at 2-8°C. Do not freeze. Once opened, the reagents of this kit are stable until the kit expiry date when properly stored. The kit has been designed to perform 4 assay runs when used throughout the day at room temperature and stored overnight at 2-8°C.

Reagents should not be used past the expiry date. The expiry date of the kit is reported on the external label and corresponds to the expiry date of the tracer. The expiry date of each component is reported on the respective vial label.

When reconstituting the contents of the vials, mix gently to avoid foaming.

Reagents from different batches must not be mixed.

3.1. ¹²⁵I-labelled insulin (red): lyophilized reagent

The vial contains porcine insulin labelled with ¹²⁵I, BSA, phosphate buffer, preservatives and an inert red dye. Radioactivity is 51 kBq (1.37 µCi) or less on the calibration date.

Reconstitute the vial contents with 10 mL distilled water. The resulting solution is stable for four weeks at 2-8°C. Store in deep-frozen aliquots (-20°C or below) for extended storage.

3.2. Insulin antiserum (blue): lyophilized reagent

The vial contains antiserum raised in guinea-pigs, BSA, phosphate buffer, preservatives and an inert blue dye. Reconstitute the vial contents with 10 mL distilled water. The resulting solution is stable for four weeks at 2-8°C. Store in deep-frozen aliquots (-20°C or below) for extended storage.

3.3. Insulin calibrators: lyophilized reagent

The vials contain increasing amounts of human insulin, human serum and preservatives. The calibrators are referenced to WHO 66/304 international standard. *The kit calibrators demonstrate commutability with patient samples when used with reagents and operating procedure of this in vitro diagnostic test as the manufacturer recommends.*

Reconstitute the contents of the zero calibrator vial with 2 mL distilled water and the contents of the 1-5 calibrator vials with 1 mL distilled water. The resulting solutions contain 0 - 10 - 25 - 50 - 100 - 200 µIU/mL insulin respectively and are stable for four weeks at 2-8°C. Store in deep-frozen aliquots (-20°C or below) for extended storage.

3.4. Control serum: lyophilized reagent

The vial contains human insulin, human serum and preservatives. The range of concentrations of each control is reported on the certificate of analysis and indicates the limits established by DiaSorin for control values that can be obtained in reliable assay runs.

Reconstitute the vial contents with 1 mL distilled water. The resulting solution is stable for four weeks at 2-8°C. Store in deep-frozen aliquots (-20°C or below) for extended storage.

3.5. Precipitating reagent: ready-to-use reagent

Each bottle contains 53 mL polyethylene glycol, TRIS buffer, antibody to guinea-pig IgG raised in goats, non-specific guinea-pig IgG and preservatives.

4. EQUIPMENT AND MATERIALS REQUIRED, BUT NOT SUPPLIED

- Distilled or deionized water.
- Disposable polystyrene tubes.
- Micropipettes with disposable tips (100, 1000 µL) (trueness ± 2%, precision 1%).
- Test tube rack.
- Vortex mixer.
- Multisample centrifuge capable of achieving 1500-2000 x g*.
- Water aspirator (optional).
- Gamma counter suitable for counting ¹²⁵I (counter window setting: 15-80 keV - counter efficiency: 70% - counting time: 1 min). If counter efficiency is below 60%, counting time should be prolonged to 2 min.

5. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Either human serum or plasma may be used. The anticoagulant EDTA has been tested and may be used with this assay. Blood should be collected aseptically by venipuncture, allowed to clot, and the serum separated from the clot as soon as possible. Samples having particulate matter, turbidity, lipaemia, or erythrocyte debris may require clarification by filtration or centrifugation before testing. Grossly haemolyzed or lipaemic samples as well as samples containing particulate matter or exhibiting obvious microbial contamination should not be tested. If the assay is performed within 24 hours of sample collection, the samples should be kept at 2-8°C; otherwise they should be aliquoted and stored deep-frozen (-20°C or below). If samples are stored frozen, mix thawed samples well before testing. Avoid repeated freeze-thaw cycles.

If insulin levels greater than 200 µIU/mL are expected, the samples should be diluted with the zero calibrator.

6. ASSAY PROCEDURE

Bring all reagents to room temperature (20-25°C) before assaying. Perform the assay at least in duplicate. Calibrators must be run with each series of patient specimens. Calibrators and samples should be subjected to the same process and incubation time.

Perform all assay steps in the order given and without any appreciable delays between the steps.

$$*g = (1118 \times 10^{-8}) (\text{radius in cm}) (\text{rpm})^2$$

A clean, disposable tip should be used for dispensing each calibrator and sample.

- Operate according to the following scheme:

reagents \ tubes	Total activity	Calibrators 0-5	Samples
Calibrators	-	100 μ L	-
Samples	-	-	100 μ L
Tracer	100 μ L	100 μ L	100 μ L
Antiserum	-	100 μ L	100 μ L

- **Mix** the contents of tubes with a Vortex and **incubate for 1.5 hours at room temperature** (procedure A) or **overnight** (18-24 hours) **at 2-8°C** (procedure B).
- Let the bottle of **precipitating reagent reach room temperature** and **mix** well by repeatedly tilting end over end.
- **Dispense 1 mL precipitating reagent** into all tubes (except for total activity).
- **Mix** the contents of tubes with a Vortex and **let stand for 15 min at room temperature**.
- **Centrifuge** all tubes for 15 min at 1500-2000 x g*.
- **Discard the supernatant** by aspiration or decantation. When aspirating, avoid disturbing the precipitate. When decanting, let the tubes drain mouth down on blotting paper.
- **Measure the radioactivity** of precipitate.

7. CALCULATION OF RESULTS

Compute the mean net counts for each group of tubes. Evaluate the binding ability as follows:

$$(B/T)_0\% = \frac{\text{zero calibrator mean counts}}{\text{total activity mean counts}} \times 100$$

Express the mean counts for each calibrator and unknown sample as a percentage of zero calibrator mean counts:

$$B/B_0\% = \frac{\text{calibrator or sample mean counts}}{\text{zero calibrator mean counts}} \times 100$$

Plot in linear-linear or semilog coordinates the mean percent value for each calibrator on the ordinate (y axis) as a function of insulin concentration expressed as μ U/mL on the abscissa (x axis). A calibration curve is thus obtained (Fig. 1). Directly from the calibration curve, read the insulin concentration of each sample expressed as μ U/mL. If the sample was diluted, the insulin concentration value derived from the diluted specimen must be multiplied by the dilution factor.

$$*g = (1118 \times 10^{-8}) (\text{radius in cm}) (\text{rpm})^2$$

Calculation example

The following data must only be considered an example and should not be employed instead of the data obtained by the user.

Description	cpm	B/Bo x 100
Total activity	18,622	–
Zero calibrator	9,738	100
10 $\mu\text{IU/mL}$	8,287	85.1
25 $\mu\text{IU/mL}$	6,213	63.8
50 $\mu\text{IU/mL}$	4,460	45.8
100 $\mu\text{IU/mL}$	3,009	30.9
200 $\mu\text{IU/mL}$	2,220	22.8
Sample	4,966	51.0

By interpolation from the calibration curve, the sample is found to contain 35 $\mu\text{IU/mL}$ insulin.

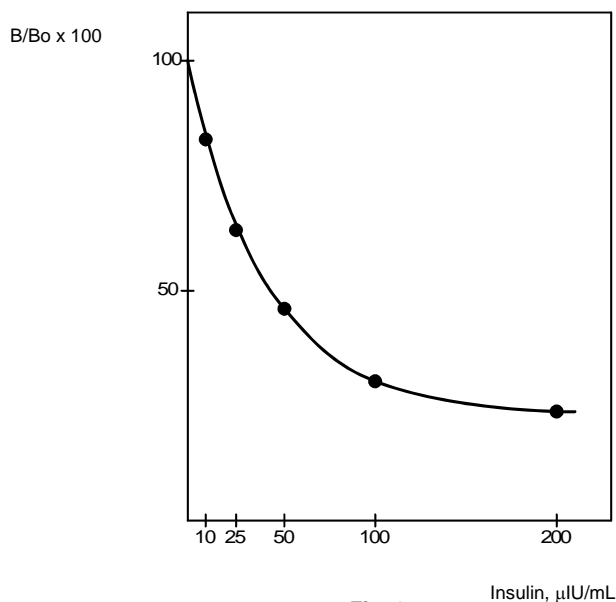


Fig. 1

8. EXPECTED VALUES

Insulin levels normally range from 5 to 25 $\mu\text{IU/mL}$. However, the range given is merely indicative: each laboratory should establish its own reference ranges.

9. SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

9.1. Analytical specificity

Analytical specificity may be defined as the ability of the assay to accurately detect specific analyte in the presence of potentially interfering factors in the sample matrix (e.g., anticoagulants, haemolysis, effects of sample treatment), or cross-reactive analytes.

Interference. Controlled studies of potentially interfering substances or conditions showed that the assay performance was not affected by EDTA, haemolysis (up to 1000 mg/dL haemoglobin), lipaemia (up to 500 mg/dL triglycerides), bilirubinaemia (up to 20 mg/dL bilirubin) or one freeze-thaw cycle of samples. Insulin values determined in plasma samples obtained with heparin or citrate are significantly lower than those determined in serum samples.

Cross-reactions. The percentage of cross-reactions, calculated according to Abraham, shows the specificity of the antiserum used.

- Human insulin	100%
- Bovine insulin	100%
- Porcine insulin	100%
- Rat insulin	100%
- Porcine proinsulin	28.0%
- Bovine glucagone	0.46%
- Porcine glucagone	0.03%
- Porcine C-peptide	< 0.01%
- Human C-peptide	< 0.01%

9.2. Analytical sensitivity

Analytical sensitivity may also be expressed as the limit of detection, which is the minimal amount of specific analyte detectable by the assay. The limit of detection is 3.0 $\mu\text{IU}/\text{mL}$ at 95% confidence limit. This was calculated as the apparent concentration of analyte which was distinguishable from the zero calibrator, that is, two standard deviations below zero.

9.3. Precision

Different sample pools, containing different concentrations of specific analyte, were assayed to determine repeatability and reproducibility of the assay (i.e., within- and between-assay variability).

Repeatability	A	B	C
Number of determinations	10	10	10
Mean ($\mu\text{IU}/\text{mL}$)	24.1	73.6	130.8
Standard deviation	1.6	7.8	7.2
Coefficient of variation (%)	6.6	10.6	5.5

Reproducibility	A	B	C
Number of determinations	20	20	20
Mean ($\mu\text{IU}/\text{mL}$)	22.6	79.6	135.5
Standard deviation	1.4	8.6	13.1
Coefficient of variation (%)	6.2	10.8	9.7

9.4. Trueness

The assay trueness has been checked by the dilution and recovery tests.

Dilution test. One serum with high insulin concentration was tested after serially diluting with the zero calibrator.

Dilution	Expected concentration, $\mu\text{U/mL}$	Measured concentration, $\mu\text{U/mL}$	% Recovery
neat	–	93.0	–
1:2	46.5	45.1	97.0
1:4	23.3	21.8	93.9
1:8	11.6	11.2	96.0
1:16	5.8	5.4	92.2

Recovery test. Two sera containing insulin were tested as such and after mixing with increasing amounts of insulin.

Added concentration, $\mu\text{U/mL}$	Expected concentration, $\mu\text{U/mL}$	Measured concentration, $\mu\text{U/mL}$	% Recovery
–	–	32.2	–
114	145.0	160.0	110.5
57	88.0	87.0	98.9
27	58.0	61.0	105.2
15	46.0	48.0	105.7
–	–	57.8	–
114	169.0	168.0	99.5
57	112.0	105.0	94.0
27	82.0	80.0	97.7
15	70.0	65.0	93.4

10. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

Diagnosis should not be established on the basis of a single test result, but should be determined in conjunction with clinical findings and other diagnostic procedures as well as in association with medical judgement.

Bacterial contamination or repeated freeze-thaw cycles of the specimens may affect the assay results.

A skillful technique and strict adherence to the instructions are necessary to obtain reliable results. In particular, precise pipetting and accurate aspiration or decanting are essential.

Non-reproducible results may arise from methodological factors, such as:

- cross-exchange of vial caps
- use of the same tip when withdrawing from different vials or dispensing different samples
- leaving the vials open for long
- exposure of reagents or samples to intense heat or heavy sources of bacterial contamination
- inadequate aspiration or decanting of incubation mixture
- contamination of tube rims by tracer or samples
- casual oscillations or inadequate handling of the gamma counter
- use of reagents from different master batches.

11. WARNINGS AND PRECAUTIONS

Test components contain sodium azide as a preservative. Because sodium azide may form explosive lead or copper azide in plumbing, it is recommended that drains be thoroughly flushed with water after disposal of solutions containing sodium azide (Council Directive 99/45/EC).

- R 22 – Harmful if swallowed.
- R 31 – Contact with acids liberates toxic gas.
- S 28 – After contact with skin, wash immediately with plenty of water.
- S 45 – In case of accident or if you feel unwell, seek medical advice immediately (show the label where possible).

Sodium merthiolate (Council Directive 99/45/EC):

- R 20/21/22 – Harmful by inhalation, in contact with skin and if swallowed.
- R 33 – Danger of cumulative effects.
- S 28 – After contact with skin, wash immediately with plenty of water.
- S 45 – In case of accident or if you feel unwell, seek medical advice immediately (show the label where possible).

All serum and plasma units used to produce the components provided in this kit have been tested for the presence of HBsAg, anti-HCV, and anti-HIV-1/2 and found to be non-reactive. As, however, no test method can offer absolute assurance that pathogens are absent, all specimens of human origin should be considered potentially infectious and handled with care.

12. SAFETY PRECAUTIONS

- Do not eat, drink, smoke or apply cosmetics in the assay laboratory.
- Do not pipette solutions by mouth.
- Avoid direct contact with all potentially infectious materials by using protective clothing such as lab coats, protective glasses and disposable gloves. Wash hands thoroughly at the end of each assay.
- Avoid splashing or forming an aerosol. Any reagent spills should be washed with a 5% sodium hypochlorite solution and disposed of as though potentially infectious.
- All samples, biological reagents and materials used in the assay must be considered potentially able to transmit infectious agents. They should therefore be disposed of in accordance with the prevailing regulations and guidelines of the agencies holding jurisdiction over the laboratory, and the regulations of each Country. Disposable materials must be incinerated; liquid waste must be decontaminated with sodium hypochlorite at a final concentration of 5% for at least half an hour. Any materials to be reused must be autoclaved using an *overkill* approach (USP 24, 2000, p. 2143). A minimum of one hour at 121°C is usually considered adequate, though the users must check the effectiveness of their decontamination cycle by initially validating it and routinely using biological indicators.

13. BASIC RULES OF RADIATION SAFETY

Reagents Containing Iodine-125

This kit contains radioactive material that does not exceed 1.5 µCi (54 kBq) of iodine-125. Appropriate precautions and good laboratory practices should be used in the storage, handling, and disposal of this material.

For practitioners or institutions receiving radioisotopes under a general license:

This radioactive material may be received, acquired, possessed, and used only by physicians, veterinarians in the practice of veterinary medicine, clinical laboratories or hospitals, and only for in vitro clinical or laboratory tests not involving internal or external administration of the material, or the radiation therefrom, to human beings or animals. Its receipt, acquisition, possession, use, and transfer are subject to the regulations and the general license of the U.S. Nuclear Regulatory Commission or of the state with which the Commission has entered into an agreement for the exercise of regulatory authority.

1. Storage of radioactive material should be limited to a specifically designated area.
2. Access to radioactive materials must be limited to authorized personnel only.
3. Do not pipette radioactive material by mouth.
4. Do not eat or drink within designated radioactive work areas.
5. Areas where spills may occur should be wiped up, then washed with an alkali detergent or radiological decontamination solution. Any glassware used must be rinsed completely with water before washing with other laboratory glassware.

For practitioners or institutions receiving radioisotopes under a specific license:

The receipt, use, transfer, and disposal of radioactive materials are subject to the regulations and conditions of your specific license.

ATTENTION: Radioactivity printed in the package insert may be slightly different from the radioactivity printed on the box label and on the tracer vial label. The box label and the tracer vial label indicate the actual amount of radioactivity at the calibration date where the package insert indicates the theoretical radioactivity of the kit.

SCHEME OF THE ASSAY

- 1 - RECONSTITUTE REAGENTS.
- 2 - IDENTIFY ASSAY TUBES IN DUPLICATE.
- 3 - DISPENSE REAGENTS BY THE FOLLOWING SCHEME AND MIX THE INCUBATION MIXTURE:

REAGENTS \ TUBES	T	CAL 0-5	SAMPLES
CALIBRATORS	-	100 μ L	-
SAMPLES	-	-	100 μ L
TRACER	100 μ L	100 μ L	100 μ L
ANTISERUM	-	100 μ L	100 μ L

- 4 - INCUBATE FOR 1.5 HOURS AT ROOM TEMPERATURE (PROCEDURE A) OR OVERNIGHT AT 2-8°C (PROCEDURE B).
- 5 - ADD 1 mL PRECIPITATING REAGENT TO ALL TUBES (except for total activity) AND THOROUGHLY MIX.
- 6 - LET STAND FOR 15 MIN AT ROOM TEMPERATURE.
- 7 - CENTRIFUGE FOR 15 MIN AT 1500-2000 x g*.
- 8 - DISCARD SUPERNATANT.
- 9 - MEASURE THE RADIOACTIVITY OF PRECIPITATE

$$*g = (1118 \times 10^{-8}) (\text{radius in cm}) (\text{rpm})^2$$

KIT PER IL DOSAGGIO RADIOIMMUNOLOGICO DELL'INSULINA

Procedimento per l'analisi quantitativa dell'insulina in campioni di siero o plasma umano

Solo per uso in vitro

1. INTRODUZIONE

L'insulina è un ormone polipeptidico di peso molecolare 6000 dalton, formato da due catene peptidiche, A e B, legate insieme da due ponti disolfuro. È sintetizzata dalle cellule beta delle isole del Langerhans del pancreas. L'insulina influenza la maggior parte delle funzioni metaboliche. La sua azione più nota è di abbassare la concentrazione ematica di glucosio aumentando la velocità di conversione del glucosio in glicogeno nel fegato e nei muscoli e del glucosio in grasso nel tessuto adiposo stimolando la velocità del metabolismo glicidico ed inibendo la gluconeogenesi.

L'insulina stimola la sintesi di proteine, DNA e RNA nelle cellule e promuove la captazione di aminoacidi e la loro incorporazione nelle proteine muscolari. Inoltre aumenta la captazione di glucosio nel tessuto adiposo e la sua conversione in grasso e inibisce la lipolisi.

L'azione primaria dell'insulina si attua a livello della membrana cellulare dove probabilmente facilita il trasporto di glucosio e aminoacidi nelle cellule. Contemporaneamente attiva probabilmente gli enzimi intracellulari come glicogeno sintetasi, coinvolti nella sintesi di glicogeno.

2. PRINCIPIO DEL DOSAGGIO

Il principio del dosaggio consiste nella competizione tra insulina marcata e insulina contenuta nei calibratori o nei campioni per il numero fisso e limitato di siti anticorpali. Dopo l'incubazione, la quantità di insulina marcata legata all'anticorpo è inversamente proporzionale alla concentrazione di insulina non marcata presente nei calibratori o nei campioni. Il metodo adottato per la separazione libero/legato è basato sull'impiego di un reattivo precipitante in cui il secondo anticorpo è pre-precipitato e in eccesso.

3. REATTIVI FORNITI NEL KIT

Insulina marcata con ¹²⁵ I	1 flacone
Antisiero anti-insulina	1 flacone
Calibratori di insulina	6 flaconi
Siero di controllo	1 flacone
Reattivo precipitante	2 flaconi
Numero di dosaggi	100

MODALITÀ DI CONSERVAZIONE: Al momento dell'arrivo, conservare il kit a 2-8°C. Non congelare. Dopo l'apertura, i reattivi di questo kit sono stabili fino alla data di scadenza del kit se conservati in modo adeguato. Il kit è garantito per 4 serie analitiche se utilizzato durante il giorno a temperatura ambiente e conservato durante la notte a 2-8°C.

Non usare i reattivi oltre la data di scadenza. La data di scadenza del kit è indicata sull'etichetta esterna e corrisponde alla data di scadenza del tracciante. La data di scadenza di ciascun componente è riportata sulle etichette dei rispettivi flaconi.

Nel ricostituire il contenuto dei flaconi, agitare delicatamente per evitare la formazione di schiuma.

Non mescolare reattivi provenienti da lotti differenti.

3.1. Insulina marcata con ¹²⁵I (rossa): reattivo liofilo

Il flacone contiene insulina porcina marcata con ¹²⁵I, sieroalbumina bovina, tampone fosfato, conservanti e un colorante rosso inerte. La radioattività massima è 51 kBq (1,37 µCi) alla data di taratura.

Ricostituire il contenuto del flacone con 10 mL di acqua distillata. La soluzione risultante è stabile per quattro settimane a 2-8°C. Conservare in aliquote congelate a -20°C o a temperature inferiori per una più lunga conservazione.

3.2. Antisiero anti-insulina (blu): reattivo liofilo

Il flacone contiene antisiero da cavia, sieroalbumina bovina, tampone fosfato, conservanti e un colorante blu inerte. Ricostituire il contenuto del flacone con 10 mL di acqua distillata. La soluzione risultante è stabile per quattro settimane a 2-8°C. Conservare in aliquote congelate a -20°C o a temperature inferiori per una più lunga conservazione.

3.3. Calibratori di insulina: reattivo liofilo

I flaconi contengono quantità crescenti di insulina umana, siero umano e conservanti. I calibratori sono tarati contro lo standard internazionale WHO 66/304. *I calibratori del kit sono commutabili con i campioni in esame quando sono utilizzati con i reattivi e la procedura operativa di questo test diagnostico in vitro, secondo quanto raccomandato dal fabbricante.*

Ricostituire il contenuto del flacone del calibratore zero con 2 mL di acqua distillata e il contenuto dei flaconi dei calibratori 1-5 con 1 mL di acqua distillata. Le soluzioni risultanti contengono 0 - 10 - 25 - 50 - 100 - 200 µIU/mL di insulina e sono stabili per quattro settimane a 2-8°C. Conservare in aliquote congelate a -20°C o a temperature inferiori per una più lunga conservazione.

3.4. Siero di controllo: reattivo liofilo

Il flacone contiene insulina umana, siero umano e conservanti. Il range delle concentrazioni di ogni controllo è riportato sul certificato di analisi ed indica i limiti stabiliti da DiaSorin per i valori di controllo ottenibili in sessioni di analisi affidabili.

Ricostituire il contenuto del flacone con 1 mL di acqua distillata. La soluzione risultante è stabile per quattro settimane a 2-8°C. Conservare in aliquote congelate a -20°C o a temperature inferiori per una più lunga conservazione.

3.5. Reattivo precipitante: reattivo pronto per l'uso

Ogni flacone contiene 53 mL di glicole polietilenico, tampone TRIS, anticorpi anti-IgG di cavia da capra, IgG di cavia aspecifiche e conservanti.

4. ATTREZZATURE E REATTIVI AUSILIARI

- Acqua distillata e deionizzata.
- Provette in plastica monouso.
- Micropipette con puntali monouso da 100, 1000 µL (esattezza ± 2%, precisione 1%).
- Portaprovette.
- Agitatore Vortex.
- Centrifuga multicampione in grado di raggiungere 1500-2000 gravità.
- Pompa aspirante (facoltativa).
- Contatore gamma per contare lo iodio ¹²⁵I (impostazione della finestra del contatore: 15-80 keV - efficienza del contatore: 70% - tempo di conteggio: 1 min). Se l'efficienza del contatore è inferiore al 60%, si deve prolungare il tempo di conteggio a 2 min.

5. PRELIEVO E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Il dosaggio può essere effettuato in campioni di siero o plasma umano. Può essere utilizzato EDTA come anticoagulante. Prelevare il sangue per puntura venosa, lasciarlo coagulare e separare il siero dal coagulo al più presto. Chiarificare per filtrazione o centrifugazione prima del test i campioni che presentano materiale in sospensione, opalescenza, lipemia o residui eritrocitari. Non usare campioni fortemente emolizzati o lipemici, né

campioni che presentano materiale in sospensione o evidente contaminazione microbica. Se il dosaggio è eseguito nelle 24 ore successive al prelievo, i campioni possono essere conservati a 2-8°C. In caso contrario, devono essere suddivisi in aliquote congelate a -20°C o a temperature inferiori. Se i campioni sono stati scongelati, agitare con cura prima di dosarli. Evitare cicli ripetuti di congelamento e scongelamento.

Se si prevedono livelli di insulina maggiori di 200 µIU/mL, diluire con il calibratore zero.

6. PROCEDIMENTO OPERATIVO

Portare i reattivi a temperatura ambiente (20-25°C) prima del dosaggio. Prevedere determinazioni almeno in duplicato. Eseguire la determinazione dei calibratori per ogni serie di campioni analizzati. Il procedimento operativo deve essere rigorosamente identico per calibratori e campioni in esame.

Eseguire le fasi del dosaggio nell'ordine previsto, senza interruzioni.

Utilizzare un puntale monouso nuovo per dispensare calibratori e campioni.

- Operare secondo lo schema seguente:

reattivi \ provette	Attività totale	Calibratori 0-5	Campioni
Calibratori	-	100 µL	-
Campioni	-	-	100 µL
Tracciante	100 µL	100 µL	100 µL
Antisiero	-	100 µL	100 µL

- **Agitare** il contenuto delle provette su Vortex ed **incubare per un'ora e mezza a temperatura ambiente** (procedura A) o **18-24 ore a 2-8°C** (procedura B).
- Portare **il reattivo precipitante a temperatura ambiente** ed **agitare** vigorosamente mediante ripetuti capovolgimenti.
- **Distribuire 1 mL di reattivo precipitante** in tutte le provette (eccetto attività totale).
- **Agitare** il contenuto delle provette su Vortex e **incubare per 15 min a temperatura ambiente**.
- **Centrifugare** le provette a 1500-2000 gravità per 15 min.
- **Eliminare il surnatante** per aspirazione o decantazione. Se si preferisce aspirare, evitare di toccare il precipitato. Se si preferisce decantare, capovolgere le provette e lasciare scolare su carta da filtro.
- **Misurare la radioattività** del precipitato.

7. CALCOLO DEI RISULTATI

Calcolare la media dei conteggi per ogni gruppo di provette dopo aver sottratto il valore del fondo. Calcolare la capacità legante come segue:

$$(B/T)0\% = \frac{\text{conteggio medio calibratore zero}}{\text{conteggio medio attività totale}} \times 100$$

Esprimere la media dei conteggi di calibratori e campioni come percentuale rispetto al calibratore zero:

$$B/Bo\% = \frac{\text{conteggio medio calibratori o campioni}}{\text{conteggio medio calibratore zero}} \times 100$$

Riportare su grafico lineare-lineare o semilog la percentuale media calcolata per ciascun calibratore sulle ordinate (asse delle y) in funzione della concentrazione di insulina espressa in µIU/mL sulle ascisse (asse delle x). Si ottiene così una curva di taratura (Fig. 1). Direttamente dalla curva di taratura leggere la concentrazione di insulina di ciascun campione espressa in µIU/mL. Se il campione è stato diluito, la concentrazione d'insulina trovata deve essere moltiplicata per il fattore di diluizione.

Esempio di calcolo

I dati seguenti devono essere considerati solo un esempio e non devono essere usati in luogo dei dati ottenuti dall'utilizzatore.

Descrizione	cpm	B/Bo x 100
Attività totale	18.622	–
Calibratore zero	9.738	100
10 μ IU/mL	8.287	85,1
25 μ IU/mL	6.213	63,8
50 μ IU/mL	4.460	45,8
100 μ IU/mL	3.009	30,9
200 μ IU/mL	2.220	22,8
Campione	4.966	51,0

Interpolando dalla curva di taratura, il campione risulta contenere 35 μ IU/mL di insulina.

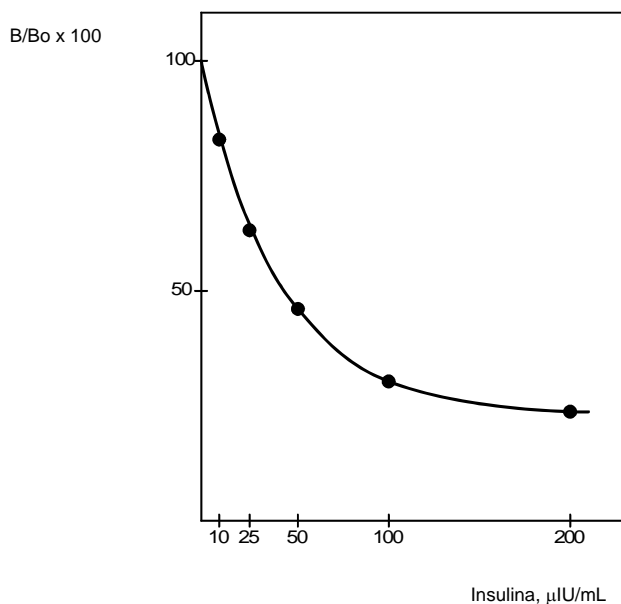


Fig. 1

8. DATI CLINICI

I valori di insulina sono generalmente compresi tra 5 e 25 μ IU/mL. Tuttavia, i valori riportati sono solamente indicativi. Si raccomanda a ciascun laboratorio di stabilire i propri intervalli di riferimento.

9. PRESTAZIONI METODOLOGICHE DEL KIT

9.1. Specificità analitica

La specificità analitica è definita come la capacità del test di rilevare esattamente l'analita in presenza di fattori potenzialmente interferenti nella matrice del campione (per esempio, anticoagulanti, emolisi, effetti di trattamenti del campione) o di reazioni crociate con analiti potenzialmente interferenti.

Interferenze. Studi controllati su fattori potenzialmente interferenti hanno dimostrato che le prestazioni del test non sono influenzate da EDTA, emolisi (fino a 1000 mg/dL di emoglobina), lipemia (fino a 500 mg/dL di trigliceridi), bilirubinemia (fino a 20 mg/dL di bilirubina) o un congelamento dei campioni. I valori di insulina ottenuti con i campioni di plasma contenenti eparina o citrato risultano significativamente inferiori a quelli ottenuti con i campioni di siero.

Reazioni crociate. Le percentuali di reazioni crociate, calcolate secondo Abraham, mostrano la specificità dell'antisiero usato.

- Insulina umana	100%
- Insulina bovina	100%
- Insulina porcina	100%
- Insulina di ratto	100%
- Proinsulina porcina	28.0%
- Glucagone bovino	0.46%
- Glucagone porcino	0.03%
- C-peptide porcino	< 0.01%
- C-peptide umano	< 0.01%

9.2. Sensibilità analitica

La sensibilità analitica può essere espressa anche come limite di rilevazione, ossia la quantità minima di analita rilevabile dal test. Il limite di rilevazione è 3,0 μ IU/mL al 95% di confidenza. È stato calcolato come la concentrazione apparente di analita distinguibile dal calibratore zero, ossia due deviazioni standard sotto lo zero.

9.3. Precisione

La ripetibilità e la riproducibilità del saggio (ossia la variabilità intra-saggio e inter-saggio) sono state determinate utilizzando dei campioni di riferimento a diverse concentrazioni di analita.

Ripetibilità	A	B	C
Numero di determinazioni	10	10	10
Media (μ IU/mL)	24,1	73,6	130,8
Deviazione standard	1,6	7,8	7,2
Coefficiente di variazione (%)	6,6	10,6	5,5

Riproducibilità	A	B	C
Numero di determinazioni	20	20	20
Media (μ IU/mL)	22,6	79,6	135,5
Deviazione standard	1,4	8,6	13,1
Coefficiente di variazione (%)	6,2	10,8	9,7

9.4. Esattezza

L'esattezza del dosaggio è stata controllata mediante i test di diluizione e recupero.

Test di diluizione. Sono state dosate diluizioni scalari di un siero a concentrazione elevata d'insulina effettuate nel calibratore zero.

Diluizione	Concentrazione attesa, $\mu\text{IU/mL}$	Concentrazione misurata, $\mu\text{IU/mL}$	% Recupero
in toto	–	93,0	–
1:2	46,5	45,1	97,0
1:4	23,3	21,8	93,9
1:8	11,6	11,2	96,0
1:16	5,8	5,4	92,2

Test di recupero. Sono stati dosati due sieri contenenti insulina, sia in toto sia dopo averli addizionati con quantità crescenti d'insulina.

Concentrazione addizionata, $\mu\text{IU/mL}$	Concentrazione attesa, $\mu\text{IU/mL}$	Concentrazione misurata, $\mu\text{IU/mL}$	% Recupero
–	–	32,2	–
114	145,0	160,0	110,5
57	88,0	87,0	98,9
27	58,0	61,0	105,2
15	46,0	48,0	105,7
–	–	57,8	–
114	169,0	168,0	99,5
57	112,0	105,0	94,0
27	82,0	80,0	97,7
15	70,0	65,0	93,4

10. LIMITI DEL DOSAGGIO

La diagnosi non deve essere formulata sulla base del risultato di un singolo dosaggio, ma questo deve essere valutato insieme ad altri riscontri clinici, procedure diagnostiche e al giudizio del medico.

Contaminazione batterica o cicli ripetuti di congelamento/scongelo dei campioni possono modificare i risultati del dosaggio.

Per ottenere risultati affidabili è necessario attenersi strettamente alle istruzioni per l'uso e possedere un'adeguata manualità tecnica. In particolare è essenziale una buona precisione nelle fasi di ricostituzione e distribuzione dei reattivi e in quella d'aspirazione o decantazione.

Risultati non riproducibili sono dovuti principalmente a fattori metodologici, come ad esempio:

- scambio di capsule tra i flaconi
- uso dello stesso puntale per i prelievi da flaconi diversi o da campioni diversi
- flaconi lasciati aperti per lunghi periodi di tempo
- esposizione dei reattivi o campioni a calore intenso o a forti sorgenti d'inquinamento batterico
- aspirazione o decantazione non adeguate della miscela di incubazione
- contaminazione del bordo delle provette con il tracciante o con i campioni
- oscillazioni casuali o cattiva manutenzione del contatore gamma
- scambio di reattivi provenienti da lotti diversi.

11. AVVERTENZE E PRECAUZIONI

I componenti del kit contengono sodio azide come conservante. Poiché la sodio azide può formare azidi di piombo o di rame esplosive nelle tubature, si raccomanda di far fluire acqua in abbondanza negli scarichi dopo l'eliminazione di soluzioni contenenti sodio azide (Council Directive 99/45/EC).

- R 22 – Nocivo per ingestione.
- R 31 – A contatto con acidi libera gas tossico.
- S 28 – In caso di contatto con la pelle lavarsi immediatamente ed abbondantemente con acqua.
- S 45 – In caso di incidente o di malessere consultare immediatamente il medico (se possibile, mostrargli l'etichetta).

Sodio mertiolato (Council Directive 99/45/EC):

- R 20/21/22 – Nocivo per inalazione, contatto con la pelle e per ingestione.
- R 33 – Pericolo d'effetti cumulativi.
- S 28 – In caso di contatto con la pelle lavarsi immediatamente ed abbondantemente con acqua.
- S 45 – In caso d'incidente o di malessere consultare immediatamente il medico (se possibile, mostrargli l'etichetta).

Tutte le unità di siero e plasma utilizzate per la fabbricazione dei componenti di questo kit sono state analizzate e trovate non reattive per HBsAg, anti-HCV e per anti-HIV-1/2. Tuttavia, poiché nessun metodo può dare assoluta certezza che siano assenti agenti patogeni, tutto il materiale di origine umana dovrebbe essere considerato potenzialmente infettivo e manipolato come tale.

12. REGOLE DI SICUREZZA

- Non mangiare, bere, fumare o applicare cosmetici durante l'esecuzione del dosaggio.
- Non pipettare con la bocca.
- Evitare il contatto diretto con il materiale potenzialmente infetto indossando indumenti da laboratorio, occhiali protettivi e guanti monouso. Lavare accuratamente le mani al termine del dosaggio.
- Evitare di provocare schizzi o aerosol. Ogni goccia di reattivo biologico deve essere rimossa con una soluzione di sodio ipoclorito al 5% ed il mezzo utilizzato deve essere trattato come materiale di rifiuto infetto.
- Tutti i campioni, tutti i reattivi biologici del kit e tutti i materiali usati per effettuare il saggio devono essere considerati in grado di trasmettere agenti infettivi; pertanto i rifiuti devono essere smaltiti secondo le disposizioni legislative e la regolamentazione vigente in ciascun Paese. Il materiale monouso deve essere incenerito; i rifiuti liquidi devono essere decontaminati con sodio ipoclorito ad una concentrazione finale del 5% per almeno mezz'ora. Qualsiasi materiale che deve essere riutilizzato va trattato in autoclave con un approccio di *overkill* (USP 24, 2000, p. 2143). Generalmente si considera che un'ora a 121°C sia un tempo di sterilizzazione adeguato; tuttavia si raccomanda a ciascun utilizzatore di verificare l'efficacia del ciclo di decontaminazione mediante una convalida iniziale e l'uso routinario d'indicatori biologici.

13. REGOLE DI BASE DI RADIOPROTEZIONE

Reagenti contenenti iodio-125

Questo kit contiene materiale radioattivo che non supera 1,5 µCi (54 kBq) di iodio-125. Adottare precauzioni adeguate e le buone pratiche di laboratorio per la conservazione, la manipolazione e lo smaltimento di questo materiale.

Per i professionisti o gli istituti che utilizzano radioisotopi con una licenza generale:

Questo materiale radioattivo può essere consegnato, acquisito, conservato e usato unicamente da personale medico, veterinari abilitati alla pratica di medicina veterinaria, laboratori clinici o ospedali e unicamente per test in vitro clinici o di laboratorio che non prevedano la somministrazione interna o esterna del materiale, o di radiazioni da esso derivanti, su persone o animali. L'acquisto, il possesso, la conservazione, l'uso e il trasferimento sono soggetti alle norme e alla licenza generale della Nuclear Regulatory Commission statunitense dello stato con cui la Commissione ha stipulato un accordo per l'esercizio dell'autorità normativa.

1. La conservazione del materiale radioattivo deve essere limitata ad un'area specificatamente designata.
2. L'accesso ai materiali radioattivi deve essere limitato esclusivamente al personale autorizzato.
3. Non usare la bocca per versare con la pipetta materiale radioattivo.
4. Non mangiare o bere nelle aree di lavoro designate per materiale radioattivo.
5. Le zone dove possono verificarsi perdite devono essere pulite, quindi lavate con detergente alcalino o soluzione per la decontaminazione radiologica. Tutti gli oggetti in vetro usati devono essere accuratamente risciacquati con acqua prima di lavarli con altri oggetti in vetro del laboratorio.

Per i professionisti o gli istituti che utilizzano radioisotopi con una licenza specifica:

L'acquisto, l'uso, il trasferimento e lo smaltimento di materiali radioattivi sono soggetti alle norme e alle condizioni della licenza specifica.

ATTENZIONE: La radioattività stampata sulle istruzioni allegate alla confezione può essere leggermente diversa dalla radioattività stampata sull'etichetta della scatola e sull'etichetta della fiala di tracciante. L'etichetta sulla scatola e sulla fiala di tracciante indicano la quantità effettiva di radioattività alla data di calibrazione, mentre il materiale informativo della confezione indica la radioattività teorica del kit.

SCHEMA DEL DOSAGGIO

- 1- RICOSTITUIRE I REATTIVI.
- 2- CONTRASSEGNARE LE PROVETTE IN DUPLICATO.
- 3- DISTRIBUIRE I REATTIVI SECONDO LO SCHEMA SEGUENTE ED AGITARE LA MISCELA DI INCUBAZIONE:

REATTIVI	PROVETTE	T	CAL 0-5	CAMPIONI
CALIBRATORI		-	100 µL	-
CAMPIONI		-	-	100 µL
TRACCIANTE		100 µL	100 µL	100 µL
ANTISIERO		-	100 µL	100 µL

- 4- INCUBARE PER UN'ORA E MEZZA A TEMPERATURA AMBIENTE (PROCEDURA A) O 18-24 ORE A 2-8°C (PROCEDURA B).
- 5- AGGIUNGERE 1 mL DEL REATTIVO PRECIPITANTE IN TUTTE LE PROVETTE (eccetto attività totale) E AGITARE VIGOROSAMENTE.
- 6- INCUBARE PER 15 MIN A TEMPERATURA AMBIENTE.
- 7- CENTRIFUGARE PER 15 MIN A 1500-2000 GRAVITÀ.
- 8- ELIMINARE IL SURNATANTE.
- 9- MISURARE LA RADIOATTIVITÀ DEL PRECIPITATO.

**TROUSSE POUR LE DOSAGE
RADIOIMMUNOLOGIQUE DE L'INSULINE**

**Technique pour la détermination quantitative de l'insuline
dans le sérum ou le plasma humain**

Usage in vitro

1. INTRODUCTION

L'insuline est une hormone polypeptidique, d'un poids moléculaire de 6000 daltons, formée de deux chaînes peptidiques, A et B, réunies par deux ponts disulfures. Elle est synthétisée par les cellules bêta des îlots de Langerhans du pancréas.

L'insuline agit sur la plupart des fonctions métaboliques. D'ailleurs son action la plus connue est d'abaisser le niveau de glucose dans le sang en accélérant la conversion du glucose, d'une part en glycogène dans le foie et les muscles et, d'autre part, en graisse dans le tissu adipeux. Ce dernier procédé a lieu en stimulant la vitesse du métabolisme glucidique et en provoquant l'inhibition de la gluconéogenèse.

L'insuline stimule la synthèse des protéines, ADN et ARN dans les cellules et favorise la captation des acides aminés ainsi que leur incorporation dans les protéines musculaires. Elle augmente en outre la captation de glucose dans le tissu adipeux, sa conversion en graisse et elle inhibe la lipolyse.

L'insuline agit primordialement sur la membrane cellulaire où, probablement, elle facilite le transport du glucose et des acides aminés dans les cellules. En même temps, elle semblerait activer les enzymes intracellulaires comme la glycogène synthétase, qui participent à la synthèse du glycogène.

2. PRINCIPE DU DOSAGE

Le principe du dosage repose sur la compétition entre, d'une part, l'insuline marquée et, de l'autre, l'insuline contenue dans les étalons ou les échantillons vis-à-vis des sites d'anticorps, en nombre limité et fixe. Après l'incubation, la quantité d'insuline marquée liée à l'anticorps est inversement proportionnelle à la concentration d'insuline non marquée présente dans les étalons ou les échantillons. Le moyen de séparation lié/libre est basé sur l'emploi d'un réactif précipitant dans lequel un second anticorps en excès est pré-précipité.

3. REACTIFS FOURNIS DANS LA TROUSSE

Insuline marquée à I^{125}	1 flacon
Sérum anti-insuline	1 flacon
Etalons insuline	6 flacons
Sérum de contrôle	1 flacon
Réactif précipitant	2 flacons
Nombre de dosages	100

STOCKAGE: Conserver la trousse à 2-8°C dès réception. Ne pas congeler. Après l'ouverture, les réactifs de cette trousse restent stables jusqu'à la date de péremption de la trousse, s'ils sont conservés de manière adéquate. La trousse est garantie pour réaliser 4 séries analytiques si elle est utilisée pendant le jour à température ambiante et conservée pendant la nuit à 2-8°C.

Ne pas utiliser les réactifs ayant dépassé la date de péremption. La date de péremption de la trousse est indiquée sur l'étiquette extérieure et correspond à la date de péremption du traceur. La date de péremption de chaque composant est reportée sur les étiquettes des flacons respectifs.

Agiter doucement les flacons lors de la reconstitution de leur contenu, afin d'éviter la formation de mousse. Ne pas mélanger des réactifs provenant de lots différents.

3.1. Insuline marquée à l'¹²⁵I (rouge): réactif lyophilisé

Le flacon contient de l'insuline de porc marquée à l'iode ¹²⁵I, de la sérumalbumine bovine, du tampon phosphaté, des conservateurs et un colorant rouge inerte. La radioactivité maximale est de 51 kBq (1,37 µCi) à la date d'étalonnage.

Reconstituer le contenu du flacon avec 10 mL d'eau distillée. La solution ainsi obtenue reste stable à 2-8°C pendant quatre semaines. Congeler la solution divisée en parties aliquotes à -20°C ou à des températures plus basses dans le cas d'un stockage prolongé.

3.2. Sérum anti-insuline (bleu): réactif lyophilisé

Le flacon contient de l'antisérum de cobaye, de la sérumalbumine bovine, du tampon phosphaté, des conservateurs et un colorant bleu inerte.

Reconstituer le contenu du flacon avec 10 mL d'eau distillée. La solution ainsi obtenue reste stable à 2-8°C pendant quatre semaines. Congeler la solution divisée en parties aliquotes à -20°C ou à des températures plus basses dans le cas d'un stockage prolongé.

3.3. Etalons insuline: réactif lyophilisé

Les flacons contiennent des quantités croissantes d'insuline humaine, du sérum d'origine humaine et des conservateurs. Les étalons de la trousse sont étalonnés par rapport au Standard International de l'OMS 66/304. *Les étalons de la trousse sont commutables avec les échantillons examinés s'ils sont utilisés avec les réactifs et le mode opératoire de ce test diagnostique in vitro, d'après les recommandations du fabricant.*

Reconstituer le contenu du flacon d'étalon zéro avec 2 mL d'eau distillée et celui des flacons d'étalons 1-5 avec 1 mL d'eau distillée. Les solutions obtenues contiennent 0 - 10 - 25 - 50 - 100 - 200 µUI/mL d'insuline et restent stables pendant quatre semaines à 2-8°C. Congeler les solutions divisées en parties aliquotes à -20°C ou à des températures plus basses dans le cas d'un stockage prolongé.

3.4. Sérum de contrôle: réactif lyophilisé

Le flacon contient de l'insuline humaine, du sérum d'origine humaine et des conservateurs. La plage de concentrations pour chaque contrôle est indiquée dans le certificat d'analyse et indique les limites établies par DiaSorin pour les valeurs de contrôle qui peuvent être obtenues dans des séries analytiques fiables.

Reconstituer le contenu du flacon avec 1 mL d'eau distillée. La solution ainsi obtenue reste stable à 2-8°C pendant quatre semaines. Congeler la solution divisée en parties aliquotes à -20°C ou à des températures plus basses dans le cas d'un stockage prolongé.

3.5. Réactif précipitant: réactif prêt à l'emploi

Chaque flacon contient 53 mL de polyéthylène-glycol, du tampon TRIS, des anticorps anti-IgG de cobaye obtenus en chèvre, des IgG de cobaye non spécifiques et des conservateurs.

4. PRECAUTIONS D'UTILISATION

Certains réactifs contenus dans cette trousse renferment de l'azide de sodium. Ce sel peut réagir avec les installations sanitaires en plomb ou cuivre et former des azides métalliques extrêmement explosives. Pour évacuer ces réactifs, rincer à grande eau afin d'éviter les accumulations d'azide (Council Directive 99/45/EC).

- R 22 – Nocif en cas d'ingestion.
- R 31 – Au contact d'un acide, dégage un gaz toxique.
- S 28 – Après contact avec la peau, se laver immédiatement et abondamment avec de l'eau.
- S 45 – En cas d'accident ou de malaise, consulter immédiatement un médecin (si possible, lui montrer l'étiquette).

Merthiolate de sodium (Council Directive 99/45/EC):

- R 20/21/22 – Nocif par inhalation, par contact avec la peau et par ingestion.
- R 33 – Danger d'effets cumulatifs.
- S 28 – Après contact avec la peau, se laver immédiatement et abondamment avec de l'eau.
- S 45 – En cas d'accident ou de malaise, consulter immédiatement un médecin (si possible, lui montrer l'étiquette).

Toutes les unités de sérum et de plasma utilisées pour la fabrication des composants de cette trousse ont été analysées et ont été trouvées négatives en Ag HBs, en anticorps anti-VHC et en anticorps anti-HIV-1/2. Toutefois, puisqu'il n'existe aucune méthode garantissant l'absence totale d'agents pathogènes, on doit considérer tout matériau d'origine humaine comme étant potentiellement infectieux. C'est pourquoi il faudra le manipuler avec précaution.

5. REGLES DE SECURITE

- Ne pas manger, ni boire, ni fumer ou se maquiller pendant le dosage.
- Ne pas pipeter avec la bouche.
- Eviter le contact direct avec le matériel potentiellement infectieux en portant des vêtements de laboratoire, des lunettes de protection et des gants à usage unique. Se laver soigneusement les mains à la fin du dosage.
- Eviter de provoquer des éclaboussures ou des vaporisations. Si cela arrivait, chaque goutte de réactif doit être nettoyée avec une solution d'hypochlorite de sodium à 5% et traitée comme du matériel infectieux.
- Tous les échantillons, tous les réactifs biologiques de la trousse et tout le matériel utilisés pour effectuer l'essai doivent être considérés comme capables de transmettre des agents étiologiques. Toute élimination de déchets se fera conformément aux réglementations en vigueur. Le matériel à usage unique doit être incinéré; les déchets liquides doivent être décontaminés avec de l'hypochlorite de sodium à concentration finale de 5% pendant au moins une demi-heure. Tout matériel réutilisable doit être stérilisé en autoclave par un traitement à l'excès (*overkill*) (USP 24, 2000, p. 2143). On considère qu'un temps de stérilisation d'une heure à 121°C est convenable. Nous conseillons toutefois à chaque laboratoire de vérifier l'efficacité du cycle de décontamination en effectuant un contrôle au début et en utilisant de façon régulière les indicateurs biologiques.

6. REGLES DE BASE DE RADIOPROTECTION

Réactifs contenant de l'Iode 125

Cette trousse contient un produit radioactif qui ne dépasse pas 1,5 μCi (54 kBq) d'iode-125. Les précautions appropriées et les bonnes pratiques de laboratoire doivent être utilisées pour la conservation, la manipulation et la mise au rebut de ce produit.

Pour les praticiens ou les établissements recevant des radio-isotopes dans le cadre d'une licence générale :

Ce produit radioactif peut être reçu, réceptionné, détenu et utilisé uniquement par des médecins, des laboratoires cliniques, des hôpitaux, des vétérinaires et des centres de recherche dans le cadre de la pratique de médecine vétérinaire, de laboratoires cliniques ou des hôpitaux, et uniquement pour des analyses cliniques ou de laboratoire in vitro n'impliquant pas l'administration interne ou externe du produit, ni par rayonnement, à l'homme ou à l'animal. Sa réception, son acquisition, sa détention, son utilisation et son transfert sont sujets aux réglementations et à la licence générale de l'U.S. Nuclear Regulatory Commission de l'État avec lequel la Commission a conclu un accord pour l'exercice de l'autorité réglementaire.

1. Le produit radioactif doit être conservé à un endroit désigné.
2. L'accès aux produits radioactifs doit être limité au personnel autorisé uniquement.
3. Ne pas pipeter des solutions radioactives avec la bouche.
4. Ne pas manger, ni boire dans les zones de travail radioactives.
5. En cas de déversement de produits radioactifs dans une zone, nettoyer la zone, puis la laver à l'aide d'un produit détergent à base d'alcali ou d'une solution de décontamination radioactive. Tout article de verre utilisé doit être entièrement lavé à l'eau avant de laver les autres articles de verre du laboratoire.

Pour les praticiens ou les établissements recevant des radio-isotopes dans le cadre d'une licence spécifique :

La réception, l'utilisation, le transfert et la mise au rebut de produits radioactifs sont sujets aux réglementations et conditions de votre licence spécifique.

ATTENTION : La radioactivité imprimée sur la notice d'utilisation peut être légèrement différente de celle qui est imprimée sur l'étiquette de la boîte et sur l'étiquette du flacon du traceur. Les étiquettes de la boîte et du flacon du traceur indiquent la dose réelle de radioactivité à la date de calibrage, alors que la notice d'utilisation indique la radioactivité théorique de la trousse.

Déchets radioactifs

Tout utilisateur ou détenteur de radioéléments en sources scellées ou non scellées en est responsable et comptable devant les autorités de Santé Publique et, de ce fait, n'est pas autorisé à s'en dessaisir par d'autres voies que celles définies par les procédures réglementaires. Les modalités d'élimination des déchets radioactifs provenant de sources non scellées sont définies par l'avis aux utilisateurs paru au Journal Officiel du 6 juin 1970. Conformément aux dispositions de cet avis et du décret N° 86-1103 du 2 octobre 1986 relatif à la protection des travailleurs contre les dangers des rayonnements ionisants paru au Journal Officiel du 12 octobre 1986, l'OPRI⁽¹⁾ et les organismes désignés par lui sont seuls habilités à procéder à la prise en charge des déchets radioactifs correspondants. Les laboratoires de notre filiale en France sont autorisés à céder les trousseaux conformément aux instructions de l'Arrêté du 3 avril 2002 et dans le respect de la réglementation sur le transport de matériel radioactif.

7. MATERIEL NECESSAIRE, MAIS NON FOURNI

- Eau distillée et déminéralisée.
- Tubes en polystyrène à usage unique.
- Micropipettes avec embouts à usage unique de 100, 1000 µL (justesse ± 2%, fidélité 1%).
- Portoir pour tubes.
- Mélangeur Vortex.
- Centrifugeuse multi-échantillons capable d'atteindre 1500-2000 x g*.
- Trompe à vide (facultative).
- Compteur gamma pour compter l'iode ¹²⁵I (définition de la fenêtre du compteur: 15-80 keV - efficacité du compteur: 70% - temps de comptage: 1 min). Si l'efficacité du compteur est inférieure à 60%, le temps de comptage doit être prolongé à 2 min.

8. PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

Le dosage peut être effectué sur du sérum ou du plasma humain. On peut employer l'EDTA comme anticoagulant. Pour obtenir le sérum prélever le sang par piqûre intraveineuse, le laisser coaguler et séparer le sérum du caillot dès que possible. Clarifier par filtration ou centrifugation avant le test les échantillons troubles, lipémiques et ceux contenant du matériel en suspension ou des déchets érythrocytaires. Ne pas utiliser des échantillons fortement hémolysés ou lipémiques, ni des échantillons contenant des particules en suspension ou une contamination microbienne évidente. Si le dosage est exécuté dans les 24 heures suivant le prélèvement, les échantillons peuvent être conservés à 2-8°C. Dans le cas contraire, ils doivent être aliquotés et congelés à -20°C ou à des températures plus basses. Si les échantillons ont été congelés, attendre qu'ils soient complètement décongelés et les homogénéiser avant le dosage. Il faut éviter les cycles de congélation/décongélation répétés.

Si l'on prévoit des niveaux d'insuline supérieurs à 200 µUI/mL, diluer avec l'étalon zéro.

9. MODE OPERATOIRE

Amener les réactifs à température ambiante (20-25°C) avant le dosage. Effectuer le dosage au moins en doublets. Les étalons doivent être dosés avec chaque série d'échantillons examinés. Le mode opératoire doit être rigoureusement identique pour les étalons et les échantillons à tester.

Exécuter toutes les phases du dosage dans l'ordre prévu, sans interruption.

$$*g = (1118 \times 10^{-8}) (\text{rayon en cm}) (\text{tr/min})^2$$

⁽¹⁾O.P.R.I. BP 35 - 78110 Le Vésinet.

Utiliser un embout à usage unique neuf pour distribuer les étalons et les échantillons.

- Procéder d'après le schéma suivant:

réactifs \ tubes	Activité totale	Etalons 0-5	Echantillons
Etalons	-	100 µL	-
Echantillons	-	-	100 µL
Traceur	100 µL	100 µL	100 µL
Antisérum	-	100 µL	100 µL

- **Agiter** le contenu des tubes au Vortex puis **incuber pendant une heure et demie à température ambiante** (protocole A) ou **pendant 18-24 heures à 2-8°C** (protocole B).
- Amener **le réactif précipitant à température ambiante** puis **agiter** énergiquement par retournements successifs.
- **Distribuer 1 mL de réactif précipitant** dans tous les tubes (sauf dans ceux réservés à l'activité totale).
- **Agiter** le contenu des tubes au Vortex puis **incuber pendant 15 min à température ambiante**.
- **Centrifuger** les tubes à 1500-2000 x g* pendant 15 min.
- **Éliminer le surnageant** par aspiration ou décantation. Dans le cas de l'aspiration, éviter de toucher le précipité. Si l'on préfère procéder à la décantation, il faut renverser les tubes et les laisser égoutter sur un papier buvard.
- **Mesurer la radioactivité** du précipité.

10. CALCUL DES RESULTATS

Calculer la moyenne des coups par minute pour chaque groupe de tubes après avoir soustrait la valeur du bruit de fond. Calculer la capacité de liaison comme suit:

$$(B/T)_0\% = \frac{\text{moyenne des coups par minute de l'étalon zéro}}{\text{moyenne des coups par minute de l'activité totale}} \times 100$$

Calculer la moyenne des coups par minute des étalons et des échantillons en pourcentage par rapport à l'étalon zéro:

$$B/B_0\% = \frac{\text{moyenne des coups par minute des étalons ou des échantillons}}{\text{moyenne des coups par minute de l'étalon zéro}} \times 100$$

Reporter sur du papier bi-linéaire ou semilogarithmique le pourcentage moyen calculé pour chaque étalon sur l'axe des ordonnées (y) en fonction de la concentration d'insuline exprimée en µUI/mL sur l'axe des abscisses (x). La Fig. 1 présente un exemple de la courbe d'étalonnage ainsi obtenue. Lire la concentration d'insuline de chaque échantillon exprimée en µUI/mL directement de la courbe d'étalonnage. Si l'échantillon a été dilué, la concentration obtenue doit être multipliée par le facteur de dilution.

$$*g = (1118 \times 10^{-8}) (\text{rayon en cm}) (\text{tr/min})^2$$

Exemple de calcul

Les valeurs suivantes ne constituent qu'un exemple et ne doivent pas être employées à la place des données obtenues par l'utilisateur.

Description	cpm	B/Bo x 100
Activité totale	18.622	–
Etalon zéro	9.738	100
10 $\mu\text{UI/mL}$	8.287	85,1
25 $\mu\text{UI/mL}$	6.213	63,8
50 $\mu\text{UI/mL}$	4.460	45,8
100 $\mu\text{UI/mL}$	3.009	30,9
200 $\mu\text{UI/mL}$	2.220	22,8
Echantillon	4.966	51,0

En effectuant l'interpolation de la courbe d'étalonnage, l'échantillon contient 35 $\mu\text{UI/mL}$ d'insuline.

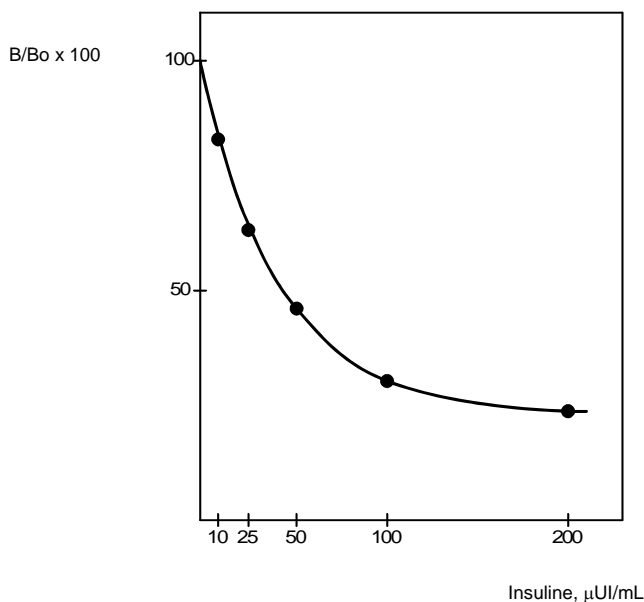


Fig. 1

11. VALEURS DE REFERENCE

Les valeurs d'insuline chez des sujets apparemment sains sont comprises entre 5 et 25 $\mu\text{UI/mL}$. Ces valeurs ne sont données qu'à titre indicatif; chaque laboratoire doit établir ses propres intervalles des valeurs de référence.

12. CARACTERISTIQUES DU DOSAGE

12.1. Spécificité analytique

La spécificité analytique est définie comme la capacité du test à détecter exactement l'analyte en présence de facteurs pouvant interférer dans la matrice de l'échantillon (par exemple anticoagulants, hémolyse, effets de traitement de l'échantillon) ou d'autres analytes pouvant provoquer des réactions croisées.

Interférences. Des études contrôlées sur des facteurs potentiellement interférents ont démontré que les caractéristiques du test ne sont pas modifiées par de l'EDTA, une hémolyse (jusqu'à 1000 mg/dL d'hémoglobine), une lipémie (jusqu'à 500 mg/dL de triglycérides), une bilirubinémie (jusqu'à 20 mg/dL de bilirubine) ou par une congélation des échantillons. Les valeurs d'insuline obtenues avec des échantillons de plasma sur héparine ou citrate sont inférieures de façon significative aux valeurs obtenues avec des échantillons de sérum.

Réactions croisées. Les pourcentages de réactions croisées calculés selon la méthode d'Abraham, montrent la spécificité de l'antisérum utilisé dans la trousse.

- Insuline humaine	100%
- Insuline bovine	100%
- Insuline de porc	100%
- Insuline de souris	100%
- Proinsuline de porc	28.0%
- Glucagon bovin	0.46%
- Glucagon de porc	0.03%
- Peptide C de porc	< 0.01%
- Peptide C humain	< 0.01%

12.2. Sensibilité analytique

La sensibilité analytique peut être exprimée aussi comme la limite de détection, c'est-à-dire la quantité d'analyte minimum que le test peut détecter. La limite de détection est de 3,0 µUI/mL avec des limites de confiance à 95%, calculée comme étant la concentration apparente d'analyte qui peut être différenciée de l'étalon zéro, c'est-à-dire deux écarts type au-dessous de zéro.

12.3. Fidélité

Plusieurs pools de référence à différentes concentrations d'analyte ont été testés pour déterminer la répétabilité et la reproductibilité du dosage (c'est-à-dire, la variabilité intra-essai et inter-essais).

Répétabilité	A	B	C
Nombre de déterminations	10	10	10
Moyenne (µUI/mL)	24,1	73,6	130,8
Ecart type	1,6	7,8	7,2
% de coefficient de variation	6,6	10,6	5,5

Reproductibilité	A	B	C
Nombre de déterminations	20	20	20
Moyenne (µUI/mL)	22,6	79,6	135,5
Ecart type	1,4	8,6	13,1
% de coefficient de variation	6,2	10,8	9,7

12.4. Justesse

La justesse du dosage a été vérifiée à l'aide des tests de dilution et de surcharge.

Test de dilution. Le test de dilution a été réalisé sur un sérum de concentration élevée en insuline dilué en série à l'aide de l'étalon zéro.

Dilution	Concentration attendue, $\mu\text{UI}/\text{mL}$	Concentration mesurée, $\mu\text{UI}/\text{mL}$	% Récupération
pur	–	93,0	–
1/2	46,5	45,1	97,0
1/4	23,3	21,8	93,9
1/8	11,6	11,2	96,0
1/16	5,8	5,4	92,2

Test de surcharge. Le test de surcharge a été réalisé sur deux sérums contenant de l'insuline soit purs soit par ajouts de quantités croissantes d'insuline.

Concentration ajoutée, $\mu\text{UI}/\text{mL}$	Concentration attendue, $\mu\text{UI}/\text{mL}$	Concentration mesurée, $\mu\text{UI}/\text{mL}$	% Récupération
–	–	32,2	–
114	145,0	160,0	110,5
57	88,0	87,0	98,9
27	58,0	61,0	105,2
15	46,0	48,0	105,7
–	–	57,8	–
114	169,0	168,0	99,5
57	112,0	105,0	94,0
27	82,0	80,0	97,7
15	70,0	65,0	93,4

13. LIMITES DU DOSAGE

Le diagnostic ne doit pas être établi d'après le résultat d'un seul dosage, mais il faut prendre en considération les investigations cliniques, les autres procédures diagnostiques et l'avis d'un médecin.

La contamination bactérienne des échantillons ou leurs cycles répétés de congélation/ décongélation peuvent modifier les résultats du dosage.

Afin d'obtenir des résultats fiables, il faut suivre strictement le mode opératoire et effectuer les manipulations de façon appropriée. En particulier, la précision et le soin apportés durant les phases de reconstitution et de distribution des réactifs ainsi que d'aspiration ou décantation sont indispensables à la fiabilité du test.

Des résultats qui ne sont pas reproductibles sont dus principalement à des erreurs de manipulation comme par exemple:

- échange de bouchons entre les flacons
- utilisation du même embout pour prélever dans différents flacons ou distribuer les différents échantillons
- flacons restés trop longtemps ouverts
- exposition des réactifs ou des échantillons à une température élevée ou à de fortes sources de contamination bactérienne
- aspiration ou décantation inadéquates du mélange d'incubation
- contamination du bord des tubes avec le traceur ou avec les échantillons
- oscillations accidentelles ou mauvais entretien du compteur gamma
- mélange de réactifs provenant de lots différents.

SCHÉMA DU DOSAGE

- 1 - RECONSTITUER LES RÉACTIFS.
- 2 - IDENTIFIER AU MOYEN D'UN REPERE LES TUBES EN DOUBLETS.
- 3 - DISTRIBUER LES RÉACTIFS EN FONCTION DU SCHÉMA SUIVANT PUIS AGITER LE MÉLANGE D'INCUBATION:

RÉACTIFS \ TUBES	T	ÉTALONS 0-5	ÉCHANTILLONS
ÉTALONS	-	100 µL	-
ÉCHANTILLONS	-	-	100 µL
TRACEUR	100 µL	100 µL	100 µL
ANTISÉRUM	-	100 µL	100 µL

- 4 - INCUBER PENDANT UNE HEURE ET DEMIE A TEMPÉRATURE AMBIANTE (PROTOCOLE A) OU PENDANT 18-24 HEURES A 2-8°C (PROTOCOLE B).
- 5 - AJOUTER 1 mL DE RÉACTIF PRÉCIPITANT DANS TOUS LES TUBES (sauf dans ceux réservés à l'activité totale) PUIS AGITER SOIGNEUSEMENT.
- 6 - INCUBER PENDANT 15 MIN A TEMPÉRATURE AMBIANTE.
- 7 - CENTRIFUGER PENDANT 15 MIN A 1500-2000 x g*.
- 8 - ÉLIMINER LE SURNAGEANT.
- 9 - MESURER LA RADIOACTIVITÉ DU PRÉCIPITÉ.

*g = $(1118 \times 10^{-8}) (\text{rayon en cm}) (\text{tr/min})^2$

**KIT PARA LA DETERMINACIÓN RADIOINMUNOLÓGICA
DE LA INSULINA**

**Procedimiento para el análisis cuantitativo de la insulina
en muestras de suero o plasma humano**

Sólo para uso in vitro

1. INTRODUCCIÓN

La insulina es una hormona polipeptídica con un peso molecular de 6000 daltons, compuesta por dos cadenas de péptidos, A y B, unidas por dos enlaces disulfuros cruzados y sintetizada por las células beta de los islotes de Langherans pancreáticos.

La insulina influye en la mayor parte de las funciones metabólicas del organismo. Su acción más conocida es la de reducir la concentración de glucosa en la sangre aumentando el ritmo al que la glucosa se convierte en glucógeno en el hígado y en los músculos y en grasa en el tejido adiposo, estimulando el ritmo de metabolización de la glucosa y reduciendo la gluconeogénesis.

La insulina estimula la síntesis de proteínas, ADN y ARN generalmente en las células, y se encarga de la absorción de aminoácidos y de su incorporación en las proteínas de los músculos. Aumenta la absorción de glucosa en el tejido adiposo y su conversión en grasas, inhibiendo la lipólisis.

La acción principal de la insulina se lleva a cabo en la membrana celular, donde probablemente facilita el transporte de la glucosa y los aminoácidos dentro de las células. Al mismo tiempo, puede activar enzimas intracelulares, como la glucógeno sintetasa, implicadas en la síntesis del glucógeno.

2. PRINCIPIO DEL ENSAYO

El principio del ensayo está basado en la competición entre insulina marcada y insulina contenida en los calibradores o en las muestras a analizar para un número fijo y limitado de sitios de enlace en los anticuerpos. Después de la incubación, la cantidad de insulina marcada enlazada al anticuerpo está inversamente relacionada con la concentración de insulina no marcada presente en los calibradores o en las muestras. El método adoptado para la separación libre/enlazado está basado en el empleo de un reactivo precipitante en el que un segundo anticuerpo se precipita previamente y está presente en exceso.

3. REACTIVOS SUMINISTRADOS EN EL KIT

Insulina marcada con ¹²⁵ I	1 vial
Antisuero de insulina	1 vial
Calibradores de insulina	6 viales
Suero de control	1 vial
Reactivo precipitante	2 viales
Número de ensayos	100

MODO DE CONSERVACIÓN: A su llegada, conserve el kit a 2-8°C. No congele. Después de la apertura, los reactivos de este kit son estables hasta la fecha de caducidad del kit si se conservan de manera adecuada. El kit está garantizado para 4 sesiones analíticas si se utiliza a lo largo del día a temperatura ambiente y si se conserva durante la noche a 2-8°C.

No use los reactivos pasada la fecha de caducidad. La fecha de caducidad del kit está escrita en la etiqueta exterior y corresponde a la fecha de caducidad del trazador. La fecha de caducidad de cada componente está indicada en las etiquetas de los respectivos viales.

Al reconstituir el contenido de los viales, agite delicadamente para evitar la formación de espuma.

No mezcle los reactivos provenientes de lotes diferentes.

3.1. Insulina marcada con ^{125}I (roja): reactivo liofilizado

El vial contiene insulina porcina marcada con ^{125}I , albúmina sérica bovina, tampón fosfato, conservantes y un colorante rojo inactivo. La radioactividad máxima es de 51 kBq (1,37 μCi) en la fecha de calibración. Reconstituya el contenido del vial con 10 mL de agua destilada. La solución que resulta es estable durante cuatro semanas a 2-8°C. Congele el reactivo a -20°C o a temperaturas inferiores subdividido en alícuotas en caso de conservación prolongada.

3.2. Antisuero de insulina (azul): reactivo liofilizado

El vial contiene antisuero producido en conejillos de Indias, albúmina sérica bovina, tampón fosfato, conservantes y un colorante azul inactivo.

Reconstituya el contenido del vial con 10 mL de agua destilada. La solución que resulta es estable durante cuatro semanas a 2-8°C. Congele el reactivo a -20°C o a temperaturas inferiores subdividido en alícuotas en caso de conservación prolongada.

3.3. Calibradores de insulina: reactivo liofilizado

Los viales contienen cantidades crecientes de insulina humana, suero humano y conservantes. Los calibradores están calibrados contra el estándar internacional WHO 66/304. *Los calibradores del kit son conmutables con las muestras en examen cuando se utilizan con los reactivos y con el procedimiento operativo de este test diagnóstico in vitro, según las recomendaciones del fabricante.*

Reconstituya el contenido del vial del calibrador cero con 2 mL de agua destilada y el contenido de los viales de los calibradores 1-5 con 1 mL de agua destilada. Las soluciones que resultan contienen 0 - 10 - 25 - 50 - 100 - 200 $\mu\text{UI/mL}$ de insulina respectivamente y son estables durante cuatro semanas a 2-8°C. Congele el reactivo a -20°C o a temperaturas inferiores subdividido en alícuotas en caso de conservación prolongada.

3.4. Suero de control: reactivo liofilizado

El vial contiene insulina humana, suero humano y conservantes. El rango de concentraciones de cada control aparece en el certificado de análisis, e indica los límites definidos por DiaSorin para los valores de control que se pueden obtener a partir de ensayos fiables.

Reconstituya el contenido del vial con 1 mL de agua destilada. La solución que resulta es estable durante cuatro semanas a 2-8°C. Congele el reactivo a -20°C o a temperaturas inferiores subdividido en alícuotas en caso de conservación prolongada.

3.5. Reactivo precipitante: reactivo listo para el uso

Cada vial contiene 53 mL de polietilenglicol, tampón TRIS (tris-hidroximetil-aminometano), anticuerpos contra la IgG de conejillos de Indias producidos en cabras, IgG de conejillos de Indias no específica y conservantes.

4. MATERIALES E INSTRUMENTOS REQUERIDOS, PERO NO SUMINISTRADOS

- Agua destilada y desionizada.
- Tubos de poliestireno desechables.
- Micropipetas con puntas desechables de 100 y 1000 μL (veracidad $\pm 2\%$, precisión 1%).
- Gradillas para tubos.
- Agitador Vórtex.
- Centrifugadora para múltiples muestras capaz de llegar a las 1500-2000 x g*.
- Aspirador de agua (facultativo).
- Contador gamma para contar el yodo ^{125}I (establecimiento de la ventana del contador: 15-80 keV - eficiencia del contador: 70% - tiempo de cómputo: 1 min). Si la eficiencia del contador es inferior al 60%, el tiempo de cómputo debe ser prolongado a 2 min.

$$*g = (1118 \times 10^{-8}) (\text{radio en cm}) (\text{rpm})^2$$

5. RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

El ensayo se puede efectuar en muestras de suero o plasma humano. Se puede utilizar el anticoagulante EDTA. Recoja la sangre mediante punción venosa, déjela coagular y separe el suero del coágulo lo antes posible. Clarifique por filtración o centrifugación antes del ensayo las muestras que presenten material en suspensión, opalescencia, lipemia o residuos eritrocitarios. No use muestras fuertemente hemolizadas o lipémicas, ni muestras que presenten material suspendido o evidente contaminación microbiana. Si el ensayo se lleva a cabo dentro de las 24 horas sucesivas a la recogida, las muestras se pueden conservar a 2-8°C. En caso contrario, se deben subdividir en alícuotas congeladas a -20°C o a temperaturas inferiores. Si las muestras han sido descongeladas, agítelas con cuidado antes de realizar el ensayo. Evite repetidas congelaciones y descongelaciones.

Si se prevén niveles de insulina mayores de 200 $\mu\text{UI/mL}$, diluya con el calibrador cero.

6. PROCEDIMIENTO OPERATIVO

Ponga los reactivos a temperatura ambiente (20-25°C) antes del ensayo. Prevea determinaciones por duplicado como mínimo. Se debe realizar la determinación de los calibradores para cada serie de muestras analizadas. El procedimiento operativo debe ser exactamente idéntico para los calibradores y para las muestras en examen. Realice todas las fases del ensayo en el orden previsto, sin interrupción.

Utilice puntas desechables nuevas para dispensar calibradores y muestras.

- Actúe según el siguiente esquema:

reactivos	tubos	Actividad total	Calibradores 0-5	Muestras
Calibradores		-	100 μL	-
Muestras		-	-	100 μL
Trazador		100 μL	100 μL	100 μL
Antisuero		-	100 μL	100 μL

- **Agite** el contenido de los tubos en el Vórtex e **incube durante 1,5 horas a temperatura ambiente** (procedimiento A) o **durante 18-24 horas a 2-8°C** (procedimiento B).
- Deje que el vial del **reactivo precipitante alcance la temperatura ambiente** y **agítelo** bien inclinándolo repetidas veces hacia atrás y hacia adelante.
- **Distribuya 1 mL del reactivo precipitante** en todos los tubos (excepto de los tubos para la actividad total).
- **Agite** el contenido de los tubos en el Vórtex y **incube durante 15 min a temperatura ambiente**.
- **Centrifugue** todos los tubos durante 15 min a 1500-2000 $\times g^*$.
- **Deseche el sobrenadante** mediante aspiración o decantación. A la hora de aspirar, evite mover el precipitado. A la hora de decantar, permita que los tubos se vacíen colocándolos hacia abajo sobre un papel secante.
- **Mida la radioactividad** del precipitado.

7. CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

Calcule la media de los cómputos para cada grupo de tubos después de haber substraído el valor del fondo. Evalúe la capacidad de enlace de la siguiente manera:

$$(B/T)_0\% = \frac{\text{cómputo medio del calibrador cero}}{\text{cómputo medio de la actividad total}} \times 100$$

Expresé la media de los cómputos de los calibradores y las muestras como porcentaje del cómputo medio del calibrador cero:

$$B/Bo\% = \frac{\text{cómputo medio de calibradores o muestras}}{\text{cómputo medio del calibrador cero}} \times 100$$

$$*g = (1118 \times 10^{-8}) (\text{radio en cm}) (\text{rpm})^2$$

Indique en un gráfico lineal-lineal o semilog el porcentaje medio calculado para cada calibrador en la ordenada (eje de las y) en función de la concentración de insulina expresada en $\mu\text{UI}/\text{mL}$ en la abscisa (eje de las x). De esta manera se obtiene una curva de calibración (Fig. 1). Lea directamente de la curva de calibración la concentración de insulina de cada muestra expresada en $\mu\text{UI}/\text{mL}$. Si la muestra ha sido diluida, la concentración de insulina encontrada debe ser multiplicada por el factor de dilución.

Ejemplo de cálculo

Los siguientes datos deben ser considerados sólo un ejemplo y no deben usarse en lugar de los datos obtenidos por el utilizador.

Descripción	cpm	B/Bo x 100
Actividad total	18.622	–
Calibrador cero	9.738	100
10 $\mu\text{UI}/\text{mL}$	8.287	85,1
25 $\mu\text{UI}/\text{mL}$	6.213	63,8
50 $\mu\text{UI}/\text{mL}$	4.460	45,8
100 $\mu\text{UI}/\text{mL}$	3.009	30,9
200 $\mu\text{UI}/\text{mL}$	2.220	22,8
Muestra	4.966	51,0

Interpolando de la curva de calibración, la muestra contiene 35 $\mu\text{UI}/\text{mL}$ de insulina.

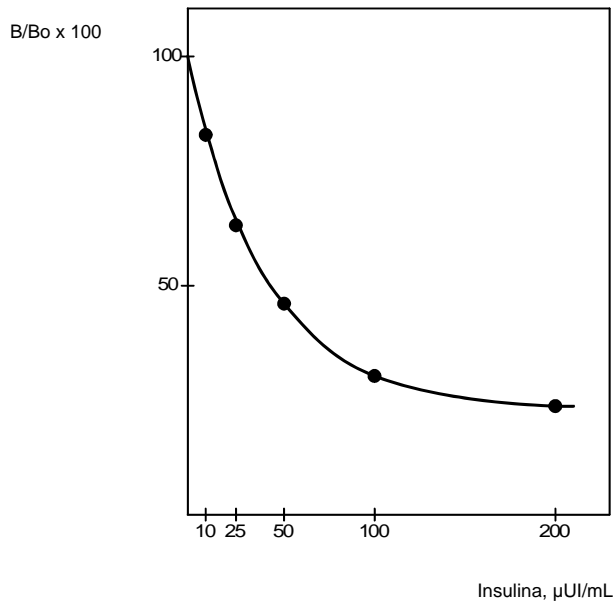


Fig. 1

8. DATOS CLÍNICOS

Los niveles de insulina varían normalmente de 5 a 25 $\mu\text{UI}/\text{mL}$. Sin embargo, los valores que se indican son exclusivamente indicativos. Se recomienda a cada laboratorio que establezca sus propios intervalos de referencia.

9. PRESTACIONES METODOLÓGICAS DEL KIT

9.1. Especificidad analítica

La especificidad analítica se define como la capacidad que tiene el test para detectar exactamente el analito ante la presencia de factores potencialmente interferentes en la matriz de la muestra (por ejemplo, anticoagulantes, hemólisis, efectos de tratamientos de la muestra), o de reacciones cruzadas con analitos potencialmente interferentes.

Interferencias. Estudios controlados sobre los factores potencialmente interferentes han demostrado que las prestaciones del test no están influenciadas por EDTA, hemólisis (hasta 1000 mg/dL de hemoglobina), lipemia (hasta 500 mg/dL de triglicéridos), bilirrubinemia (hasta 20 mg/dL de bilirrubina) o por una congelación de las muestras. Los valores de insulina hallados en las muestras de plasma obtenidas con heparina o citrato son considerablemente inferiores a los valores hallados en las muestras de suero.

Reacciones cruzadas. Los porcentajes de reacciones cruzadas, calculados según el método de Abraham, muestran la especificidad del antisuero usado.

- Insulina humana	100%
- Insulina bovina	100%
- Insulina porcina	100%
- Insulina de rata	100%
- Proinsulina porcina	28.0%
- Glucagón bovino	0.46%
- Glucagón porcino	0.03%
- Péptido C porcino	< 0.01%
- Péptido C humano	< 0.01%

9.2. Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica se puede expresar también como el límite de detección, es decir la cantidad mínima de analito específico que el test puede detectar. El límite de detección es de 3,0 μ UI/mL al 95% de confianza. Ha sido calculado como la concentración aparente de analito distinguible del calibrador cero, es decir, dos desviaciones estándar por debajo de cero.

9.3. Precisión

La repetibilidad y la reproducibilidad del ensayo (es decir las variaciones intra-ensayo e inter-ensayo) han sido determinadas utilizando las muestras de referencia en diferentes concentraciones de analito.

Repetibilidad	A	B	C
Número de determinaciones	10	10	10
Media (μ UI/mL)	24,1	73,6	130,8
Desviación estándar	1,6	7,8	7,2
Coefficiente de variación (%)	6,6	10,6	5,5

Reproducibilidad	A	B	C
Número de determinaciones	20	20	20
Media (μ UI/mL)	22,6	79,6	135,5
Desviación estándar	1,4	8,6	13,1
Coefficiente de variación (%)	6,2	10,8	9,7

9.4. Veracidad

La veracidad del ensayo ha sido controlada mediante los test de dilución y recuperación.

Test de dilución. Se han determinado diluciones en serie de un suero de concentración elevada de insulina realizadas en el calibrador cero.

Dilución	Concentración esperada, $\mu\text{UI/mL}$	Concentración medida, $\mu\text{UI/mL}$	% Recuperación
no diluido	–	93,0	–
1:2	46,5	45,1	97,0
1:4	23,3	21,8	93,9
1:8	11,6	11,2	96,0
1:16	5,8	5,4	92,2

Test de recuperación. Se han determinado dos sueros que contengan insulina tanto no diluidos como después de la adición de cantidades crecientes de insulina.

Concentración adicionada, $\mu\text{UI/mL}$	Concentración esperada, $\mu\text{UI/mL}$	Concentración medida, $\mu\text{UI/mL}$	% Recuperación
–	–	32,2	–
114	145,0	160,0	110,5
57	88,0	87,0	98,9
27	58,0	61,0	105,2
15	46,0	48,0	105,7
–	–	57,8	–
114	169,0	168,0	99,5
57	112,0	105,0	94,0
27	82,0	80,0	97,7
15	70,0	65,0	93,4

10. LIMITACIONES DEL ENSAYO

El diagnóstico no se debe formular en base al resultado de un solo ensayo, sino que éste se debe validar con otras pruebas clínicas, procedimientos diagnósticos y con la opinión del médico.

La contaminación bacteriana o las repetidas congelaciones/descongelaciones de las muestras pueden modificar los resultados del test.

Para obtener resultados fiables, es necesario respetar estrictamente las instrucciones de utilización y poseer una adecuada técnica manual. En concreto, la precisión y el cuidado en las fases de reconstitución y distribución de los reactivos y de aspiración y trasvase son indispensables para la fiabilidad del ensayo.

Resultados no reproducibles se deben principalmente a factores metodológicos, como por ejemplo:

- cambio de las tapas entre los viales
- uso de la misma punta para la recogida de diferentes viales o para dispensar diferentes muestras
- viales que se han dejado abiertos durante un largo período de tiempo
- exposición de los reactivos o de las muestras a calor intenso o a fuertes fuentes de contaminación bacteriana
- aspiración o trasvase inadecuado de la mezcla de incubación
- contaminación del borde de los tubos con el trazador o bien con las muestras
- oscilaciones casuales o mal mantenimiento del contador gamma
- intercambio de reactivos procedentes de diferentes lotes.

11. ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Los componentes del kit contienen azida sódica como conservante. Ya que, la azida sódica puede formar azidas de plomo o de cobre explosivas en las tuberías, se recomienda dejar fluir agua en abundancia en los desagües después de la eliminación de soluciones que contengan azida sódica (Directiva 99/45/CE del Consejo).

- R 22 – Nocivo por ingestión.
- R 31 – En contacto con ácidos libera gases tóxicos.
- S 28 – En caso de contacto con la piel, lávese inmediata y abundantemente con agua.
- S 45 – En caso de accidente o malestar, acúdase inmediatamente al médico (si es posible, muéstresele la etiqueta).

Mertiolato sódico (Council Directive 99/45/EC):

- R 20/21/22 – Nocivo por inhalación, por ingestión y en contacto con la piel.
- R 33 – Peligro de efectos acumulativos.
- S 28 – En caso de contacto con la piel, lávese inmediata y abundantemente con agua.
- S 45 – En caso de accidente o malestar, acúdase inmediatamente al médico (si es posible, muéstresele la etiqueta).

Todas las unidades de suero o plasma utilizadas para la fabricación de los componentes de este kit se han analizado y se han determinado no reactivas para HBsAg, para anti-HCV y para anti-HIV-1/2. Sin embargo, visto que ningún método puede asegurar que los agentes patógenos estén ausentes, todo el material de origen humano se debería considerar potencialmente infeccioso y ser manipulado como tal.

12. NORMAS DE SEGURIDAD

- No coma, beba, fume o se maquille durante la ejecución del ensayo.
- No pipetee las soluciones con la boca.
- Evite el contacto directo con el material potencialmente infeccioso usando batas de laboratorio, gafas de protección y guantes desechables. Lávese cuidadosamente las manos al terminar el ensayo.
- Evite salpicaduras o formación de aerosoles. En caso de que esto sucediera, cada gota de reactivo se debe eliminar con una solución de hipoclorito sódico al 5% y el medio utilizado se deberá tratar como material residuo potencialmente infeccioso.
- Todas las muestras, los reactivos biológicos del kit y los materiales usados para efectuar el ensayo se deben considerar capaces de transmitir agentes infecciosos; por lo tanto los residuos se deberán eliminar de acuerdo con las reglamentaciones de las agencias autorizadas que tengan jurisdicción sobre el laboratorio, y con las normativas de cada país. El material desechable deberá ser incinerado; los residuos líquidos deberán ser descontaminados con una solución de hipoclorito sódico a una concentración final del 5% durante media hora como mínimo. Cualquier material que pueda ser reutilizado deberá ser tratado en autoclave con un tratamiento de exceso (*overkill*) (USP 24, 2000, p. 2143). Generalmente se considera que una hora a 121°C es un tiempo de esterilización adecuado; sin embargo se recomienda a cada usuario que verifique la eficacia del ciclo de descontaminación mediante una validación inicial y el uso rutinario de indicadores biológicos.

13. REGLAS BÁSICAS DE SEGURIDAD CONTRA LAS RADIACIONES

Reactivos con contenido de azida sódica

Este equipo contiene material radiactivo que no supera de 1,5 μCi (54 kBq) de yodo-125. Para almacenar, manejar y desechar este material, deben adoptarse las precauciones necesarias y prácticas de laboratorio correctas.

Para facultativos o instituciones que reciben radioisótopos con licencia genérica:

Este material radiactivo sólo deben recibirlo, adquirirlo, poseerlo y utilizarlo médicos, veterinarios que practiquen la medicina veterinaria, laboratorios clínicos u hospitales, y sólo para pruebas in vitro clínicas o de laboratorio que no conlleven la administración interna o externa del material ni su radiación a seres humanos ni animales. Su recepción, adquisición, posesión, uso y transferencia se rigen por la normativa y la licencia genérica de la Comisión Reguladora Nuclear del estado en el que la Comisión haya llegado a un acuerdo para el ejercicio de su autoridad reguladora.

1. El almacenamiento del material radiactivo debe limitarse a un área destinada específicamente a tal efecto.
2. El acceso a materiales radiactivos debe estar limitado a personal autorizado únicamente.
3. No recoja material radiactivo con la pipeta usando la boca.
4. No coma ni beba dentro de las áreas destinadas a trabajos radiactivos.

- Las áreas donde puedan producirse derrames deben enjugarse y después lavarse con un detergente alcalino o una solución decontaminante radiológica. Todo recipiente de vidrio utilizado debe enjuagarse completamente con agua antes de lavarse con otros recipientes de laboratorio.

Para facultativos o instituciones que reciben radioisótopos con licencia específica:

La recepción, uso, transferencia y eliminación de los materiales radiactivos se rigen por la normativa y las condiciones de la licencia en cuestión.

ATENCIÓN: La radiactividad impresa en el interior del paquete puede diferir ligeramente de la impresa en la etiqueta de la caja y en la del vial del trazador. La etiqueta de la caja y la del trazador indican la cantidad real de radiactividad en la fecha de la calibración, mientras que el impreso del interior del paquete indica la radiactividad teórica del equipo.

ESQUEMA DEL ENSAYO

- RECONSTITUYA LOS REACTIVOS.
- MARQUE LOS TUBOS DE ENSAYO POR DUPLICADO.
- DISTRIBUYA LOS REACTIVOS SEGÚN EL SIGUIENTE ESQUEMA Y AGITE LA MEZCLA DE INCUBACIÓN:

REACTIVOS \ TUBOS	T	CAL 0-5	MUESTRAS
CALIBRADORES	–	100 µL	–
MUESTRAS	–	–	100 µL
TRAZADOR	100 µL	100 µL	100 µL
ANTISUERO	–	100 µL	100 µL

- INCUBE DURANTE 1,5 HORAS A TEMPERATURA AMBIENTE (PROCEDIMIENTO A) O DURANTE 18-24 HORAS A 2-8°C (PROCEDIMIENTO B).
- AÑADA 1 mL DE REACTIVO PRECIPITANTE A TODOS LOS TUBOS (excepto de los tubos para la actividad total) Y AGÍTELO BIEN.
- INCUBE DURANTE 15 MIN A TEMPERATURA AMBIENTE.
- CENTRIFUGUE DURANTE 15 MIN A 1500-2000 x g*.
- DESECHE EL SOBRENADANTE.
- MIDA LA RADIOACTIVIDAD DEL PRECIPITADO.

$$*g = (1118 \times 10^{-8}) (\text{radio en cm}) (\text{rpm})^2$$

REFERENCES/BIBLIOGRAFIA/BIBLOGRAPHIE/BIBLIOGRAFÍA

- S. BABA et al.
Metabolism of insulin and proinsulin.
Excerpta Med. I.C.S., **468** : 270 (1979).
- R.A. DE FRONZO, J.D. TOBIN, R. ANDRES
Glucose tramp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance.
Am. J. Physiol., **237** : E214-E223 (1979).
- E. FERRANNINI, A. PILO
Pattern of insulin delivery after intravenous glucose injection in man and its relation to plasma glucose disappearance.
J. Clin. Invest., **64** : 243 (1979).
- E. FERRANNINI et al.
Independent stimulation of glucose metabolism and Na⁺-K⁺ exchange by insulin in the human forearm.
Am. J. Physiol., **255** : E953-E958 (1988).
- A.M. FOURNIER et al.
Blood pressure, insulin, and glycemia in nondiabetic subjects.
Am. J. Med., **80** : 861-864 (1986).
- R.O.B. GANS et al.
Renal and cardiovascular effects of exogenous insulin in healthy volunteers.
Clin. Sci., **80** : 219-225 (1991).
- R.O.B. GANS et al.
The effect of angiotensin I-converting enzyme inhibition on insulin action in healthy volunteers.
Eur. J. Clin. Invest., **21** : 527-533 (1991).
- L.C. GIUDICE et al.
Insulin-like growth factors and their binding proteins in the term and preterm human fetus and neonate with normal and extremes of intrauterine growth.
J. Clin. Endocrinol. Metab., **80** : 1548-1555 (1995).
- G. GRAGNOLI, A.M. SIGNORINI, S. TANGANELLI
Plasma levels of insulin, C-peptide and glucagon in liver cirrhosis.
J. Endocrinol. Invest., **4** : 1 (1981).
- K. KOSAKA, Y. AKAUMA, R. HOGURA, T. KUZUYA
Plasma insulin response during the 100 g glucose tolerance test in diabetic patients.
Excerpta Med. I.C.S., **468** : 283 (1979).
- H. KUZUKA et al.
Dissociation of peripheral insulin and C-peptide responses in diabetes mellitus.
Excerpta Med. I.C.S., **468** : 217 (1979).
- M. LAAKSO, S.V. EDELMAN, G. BRECHTEL, A.D. BARON
Decreased effect of insulin to stimulate skeletal muscle blood flow in obese man. A novel method for insulin resistance.
J. Clin. Invest., **85** : 1844-1852 (1990).
- G. MARCHESINI et al.
Insulin and glucagon levels in liver cirrhosis. Relationship with plasma amino-acid imbalance of chronic hepatic encephalopathy.
Dig. Dis. Sci., **24** : 594 (1979).
- M. MODAN et al.
Hyperinsulinemia. A link between hypertension, obesity and glucose intolerance.
J. Clin. Invest., **75** : 809-817 (1985).
- S. MÜLLNER, H. NEUBAUER, W. KÖNIG
A radioimmunoassay for the determination of insulins from several animal species, insulin derivatives and insulin precursors in both their native and denatured state.
J. Immunol. Meth., **140** : 211-218 (1991).
- T. POLLARE, H. LITHELL, C. BERNE
A comparison of the effects of hydrochlorothiazide and captopril on glucose and lipid metabolism in patients with hypertension.
N. Engl. J. Med., **321** : 868-873 (1989).
- D. PORTE, J.B. HALTER
The endocrine pancreas and diabetes mellitus.
In: Textbook of Endocrinology, R.H. Williams ed., W.B. Saunders, Philadelphia, p. 715 (1971).
- A. P. ROCCHINI et al.
Insulin and renal sodium retention in obese adolescents.
Hypertension, **14** : 367-374 (1989).

J.I. STARR et al.

Insulin, proinsulin and C-peptide.

In: Methods of Hormone Radioimmunoassay, B.M. Jaffe, H.R. Behrman eds., Academic Press, New York, p. 613 (1979).

K.W. TAYLOR

Insulin.

In: Hormone Assays and Their Clinical Application, J.A. Loraine, E.T. Bell eds., Churchill Livingstone, Edinburgh, p. 333 (1976).

R. TREVISAN et al.

Role of insulin and atrial natriuretic peptide in sodium retention in insulin-treated IDDM patients during isotonic volume expansion.

Diabetes, **39** : 289-298 (1990).

M. TROVATI et al.

Insulin influences the renin-angiotensin-aldosterone system in humans.

Metabolism, **38** : 501-503 (1989).

M.A. WILSON, L.E.M. MILES

Radioimmunoassay of insulin.

In: Handbook of Radioimmunoassay, G.E. Abraham ed., M. Dekker Inc., New York, p. 275 (1977).

R.L. YOUNG, R.J. FUCHS, M.J. WALTJEN, M.T. COOPERMAN

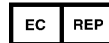
Glucose insulin response to oral glucose in a healthy obese population.

Diabetes, **28** : 208 (1979).



DiaSorin Inc.
1951 Northwestern Avenue
P.O. Box 285
Stillwater, MN 55082-0285 U.S.A.
Phone: 651-439-9710
FAX: 651-351-5669

APM0134



DiaSorin S.p.A.,
13040 Saluggia (VC) Italy

34672 7/10