

Mercodia

Iso-Insulin ELISA

Directions for Use
Mode d'emploi
Istruzioni per l'uso
Bruksanvisning

Gebrauchsinformation
Instrucciones para el uso
Brugsanvisning

10-1128-01
REAGENTS FOR 96 DETERMINATIONS



Manufactured by/Hersteller/Fabriqué par/
Fabricado por/Prodotto da/Fremstillet af/
Tillverkad av

Mercodia AB, Sylveniusgatan 8A,
SE-754 50 Uppsala,
Sweden, Schweden, Suède, Suecia, Svezia, Sverige

EXPLANATION OF SYMBOLS USED ON LABELS/ERKLÄRUNG DER SYMBOLE AUF DEN ETIKETTEN/EXPLICATION DES SYMBOLES UTILISÉS SUR LES ÉTIQUETTES/EXPLICACIÓN DE LOS SÍMBOLOS UTILIZADOS EN LAS ETIQUETAS/SPIEGAZIONE DEI SIMBOLI USATI SULLE ETICHETTE/FORKLARING AF SYMBOLER ANVENDT PÅ ETIKETTER/FÖRKLARING AV SYMBOLERNA SOM ANVÄNDS PÅ ETIKETTERNA

 $\Sigma = 96$	Reagents for 96 determinations Reagenzien für 96 Bestimmungen Réactifs pour 96 mesures Reactivos para 96 determinaciones Reagenti per 96 rilevazioni Reagens til 96 bestemmelser Reagenser för 96 bestämningar
	Expiry date Verfallsdatum A utiliser avant Fecha de caducidad Data di scadenza Udløbsdato Utgångsdatum
	Store between 2–8°C Lagerungstemperatur 2–8°C A conserver entre 2 et 8°C Conservar a entre 2–8°C Conservare tra i 2–8°C Opbevar ved 2–8°C Förvara vid 2–8°C
	Lot No. Lot Nr. N° de lot N° lote Lotto n. Partinr. Lotnr.
	For <i>in vitro</i> diagnostic use Zum Gebrauch in der <i>in vitro</i> -Diagnose Ce kit est réservé à l'utilisation diagnostique <i>in vitro</i> Para uso diagnóstico <i>in vitro</i> Per l'uso diagnostico <i>in vitro</i> Til <i>in vitro</i> -diagnosticering För <i>in vitro</i> diagnostiskt bruk

Directions for Use	5
Gebrauchsinformation	13
Mode d'emploi	21
Instrucciones para el uso	29
Istruzioni per l'uso	37
Brugsanvisning	45
Bruksanvisning	53

INTENDED USE

Mercodia Iso-Insulin ELISA provides a method for the quantitative determination of insulin in human serum or plasma.

SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

Insulin is the principal hormone responsible for the control of glucose metabolism. It is synthesised in the β -cells of the islets of Langerhans as the precursor, proinsulin, which is processed to form C-peptide and insulin. Both are secreted in equimolar amounts into the portal circulation. The mature insulin molecule comprises two polypeptide chains, the A chain and B chain (21 and 30 amino acids respectively). The two chains are linked together by two inter-chain disulphide bridges. There is also an intra-chain disulphide bridge in the A chain.

Secretion of insulin is mainly controlled by plasma glucose concentration, and the hormone has a number of important metabolic actions. Its principal function is to control the uptake and utilization of glucose in peripheral tissues via the glucose transporter. This and other hypoglycaemic activities, such as the inhibition of hepatic gluconeogenesis and glycogenolysis are counteracted by the hyperglycaemic hormones including glucagon, epinephrine (adrenaline), growth hormone and cortisol.

Insulin concentrations are severely reduced in insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) and some other conditions such as hypopituitarism. Insulin levels are raised in non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM), obesity, insulinoma and some endocrine dysfunctions such as Cushing's syndrome and acromegaly.

PRINCIPLE OF THE PROCEDURE

Mercodia Iso-Insulin ELISA is a solid phase two-site enzyme immunoassay. It is based on the direct sandwich technique in which two monoclonal antibodies are directed against separate antigenic determinants on the insulin molecule. During incubation insulin in the sample react with peroxidase-conjugated anti-insulin antibodies and anti-insulin antibodies bound to microtitre well. A simple washing step removes unbound enzyme labeled antibody. The bound conjugate is detected by reaction with 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine. The reaction is stopped by adding acid to give a colorimetric endpoint that is read spectrophotometrically.

WARNINGS AND PRECAUTIONS

- For *in vitro* diagnostic use.
- The contents of this kit and their residues must not be allowed to come into contact with ruminating animals or swine.
- The Stop Solution in this kit contains 0.5 M H_2SO_4 . Follow routine precautions for handling hazardous chemicals.
- All patient specimens should be handled as if capable of transmitting infections.

MATERIAL REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- Pipettes for 25, 50 and 200 μL (repeating pipettes preferred for addition of enzyme conjugate solution, Substrate TMB and Stop Solution).
- Beakers and cylinders for reagent preparation.
- Redistilled water.
- Microplate reader with 450 nm filter.
- Plate shaker (The recommended velocity is 700–900 cycles per minute, orbital movement).
- Microplate washing device.

REAGENTS

Each Mercodia Iso-Insulin ELISA kit contains reagents for 96 wells, sufficient for 43 samples and one calibrator curve in duplicate. For larger series of assays, use pooled reagents from packages bearing identical lot numbers. The expiry date for the complete kit is stated on the outer label. The recommended storage temperature is 2–8°C.

Coated Plate Mouse monoclonal anti-insulin. For unused microplate strips, reseal the bag using adhesive tape, store at 2–8°C and use within 8 weeks.	1 plate	96 wells 8-well strips	Ready for Use
Calibrators 1, 2, 3, 4 Color coded yellow Concentration stated on vial label.	4 vials	1000 μL	Ready for Use
Calibrator 0 Color coded yellow.	1 vial	5 mL	Ready for Use
Enzyme Conjugate 11X Peroxidase conjugated mouse monoclonal anti-insulin.	1 vial	600 μL	Preparation, see below
Enzyme Conjugate Buffer Color coded blue.	1 vial	6 mL	Ready for use
Wash Buffer 21X Storage after dilution: 2–8°C for 8 weeks.	1 bottle	50 mL	Dilute with 1000 mL redistilled water to make wash buffer 1X solution.
Substrate TMB Colorless solution <i>Note! Light sensitive!</i>	1 bottle	22 mL	Ready for Use
Stop Solution 0.5 M H_2SO_4	1 vial	7 mL	Ready for Use

Preparation of enzyme conjugate 1X solution

Prepare the needed volume of enzyme conjugate 1X solution by dilution of Enzyme Conjugate 11X, (1+10) in Enzyme Conjugate Buffer or according to the table below. When preparing enzyme conjugate 1X solution for the whole plate, pour all of the Enzyme Conjugate Buffer into the Enzyme Conjugate 11X vial. Mix gently.

Number of strips	Enzyme Conjugate 11X	Enzyme Conjugate Buffer
12 strips	1 vial	1 vial
8 strips	350 µL	3.5 mL
6 strips	250 µL	2.5 mL
4 strips	200 µL	2.0 mL

Storage after dilution: 2-8°C for 8 weeks

SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING

Serum

Collect blood by venipuncture, allow to clot, and separate the serum by centrifugation. Samples can be stored at 2–8°C up to 24 hours. For longer periods store samples at –20°C. Avoid repeated freezing and thawing.

Plasma

Collect blood by venipuncture into tubes containing heparin or EDTA as anticoagulant, and separate the plasma fraction. Samples can be stored at 2–8°C up to 24 hours. For longer periods store samples at –20°C. Avoid repeated freezing and thawing.

Preparation of samples

Samples containing >100 mU/L should be diluted e.g. 1/10 v/v with Calibrator 0.

TEST PROCEDURE

All reagents and samples must be brought to room temperature before use.
Prepare a calibrator curve for each assay run.

1. Prepare enzyme conjugate 1X solution and wash buffer 1X solution.
2. Prepare sufficient microplate wells to accommodate Calibrators and samples in duplicate.
3. Pipette 25 μ L each of Calibrators and samples into appropriate wells.
4. Add 50 μ L enzyme conjugate 1X solution to each well.
5. Incubate on a plate shaker for 1 hour (700-900 rpm) at room temperature (18–25°C).
6. Wash 6 times with 700 μ L wash buffer 1X solution per well using an automatic plate washer with overflow-wash function, after final wash, invert and tap the plate firmly against absorbent paper. Do not include soak step in washing procedure.
Or manually,
discard the reaction volume by inverting the microplate over a sink. Add 350 μ L wash buffer 1X solution to each well. Discard the wash buffer 1X solution, tap firmly several times against absorbent paper to remove excess liquid. Repeat 5 times.
Avoid prolonged soaking during washing procedure.
7. Add 200 μ L Substrate TMB.
8. Incubate for 15 minutes at room temperature (18–25°C)
9. Add 50 μ L Stop Solution to each well.
Place plate on a shaker for approximately 5 seconds to ensure mixing.
10. Read optical density at 450 nm and calculate results.
Read within 30 minutes.

Note! To prevent contamination between the conjugate and substrate, separate pipettes are recommended.

INTERNAL QUALITY CONTROL

Commercial controls such as Mercodia Diabetes Antigen Control (Code No. 10-1134-01/ 10-1164-01) and/or internal serum pools with low, intermediate and high insulin concentrations should routinely be assayed as samples, and results charted from day to day. It is good laboratory practice to record the following data for each assay: kit lot number, reconstitution dates of kit components, OD values for the blank, Calibrators and controls.

CALCULATION OF RESULTS

Computerized calculation

The concentration of insulin is obtained by computerized data reduction of the absorbance for the Calibrators, except for Calibrator 0, versus the concentration using cubic spline regression.

Manual calculation

1. Plot the absorbance values obtained for the Calibrators, except Calibrator 0, against the insulin concentration on a lin-log paper and construct a calibrator curve.
2. Read the concentration of the samples from the calibrator curve.

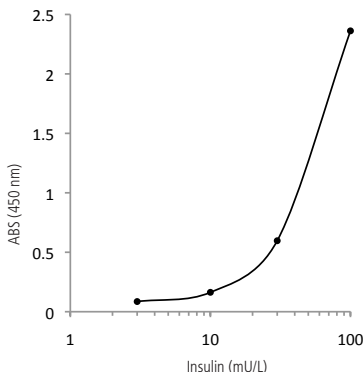
Example of worksheet

Wells	Identity	A ₄₅₀	Mean conc. mU/L
1A-B	Calibrator 0	0.066/0.067	
1C-D	Calibrator 1*	0.084/0.087	
1E-F	Calibrator 2*	0.161/0.165	
1G-H	Calibrator 3*	0.595/0.599	
2A-B	Calibrator 4*	2.377/2.347	
2C-D	Sample 1	0.270/0.272	16.4
2E-F	Sample 2	1.146/1.192	53.6
2G-H	Sample 3	2.044/2.150	92.7

*Concentration stated on vial label

Calibrator curve

A typical calibrator curve is shown here. Do not use this curve to determine actual assay results.



LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

As with all diagnostic tests, a definitive clinical diagnosis should not be based on the results of a single test, but should be made by the physician after all clinical findings have been evaluated. Application of this test to individuals already undergoing insulin therapy is complicated by formation of anti-insulin antibodies that are capable of interfering in the assay.

Grossly lipemic, icteric or hemolyzed samples do not interfere in the assay.

EXPECTED VALUES

Good practice dictates that each laboratory establishes its own expected range of values. The following results may serve as a guide until the laboratory has gathered sufficient data of its own.

Comparison studies between Mercodia Iso-Insulin ELISA and Mercodia Insulin ELISA, have been performed with 90 samples. The values found show a good correlation between the two techniques, $r=0.98$.

Thus, the expected values for Mercodia Insulin ELISA can be used for Mercodia Iso-Insulin ELISA as well.

Mean fasting levels for 137 tested, apparently healthy individuals, were 10 mU/L, a median of 7 mU/L and a range, corresponding to the central 95% of the observations, of 2–25 mU/L.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Detection limit

The detection limit is 1 mU/L calculated as two standard deviations above the Calibrator 0.

Recovery

Recovery upon addition is 101%.

Hook effect

Samples with a concentration of up to at least 2000 mU/L can be measured without giving falsely low results.

Precision

Each sample was analyzed in 4 replicates on eight different occasions.

Sample	Mean value mU/L	Coefficient of variation		
		within assay %	between assay %	total assay %
1	15.9	3.0	3.9	4.9
2	53.2	2.8	3.0	4.1
3	90.9	3.2	3.0	4.4

Specificity

Insulin	100%
Insulin lispro (Humalog®, Eli Lilly)	89%
Insulin aspart	80%
Insulin detemir	22%
Insulin glargin	44%
Insulin glulisine	100%
C-peptide	< 0.1%
Proinsulin	54%
Proinsulin des (31-32)	58%
Proinsulin split (32-33)	56%
Proinsulin des (64-65)	66%
Proinsulin split (65-66)	78%
IGF-I	< 0.02%
IGF-II	< 0.02%
Rat insulin	71%
Mouse insulin	49%
Porcine insulin	306%
Sheep insulin	131%
Bovine insulin	58%

CALIBRATION

Mercodia Iso-Insulin ELISA kit is calibrated against 1st International Reference Preparation 66/304 for human insulin.

CONVERSION FACTOR

1 µg/L = 29 mU/L; 1 mU/L = 6.0 pmol/L

WARRANTY

The performance data presented here was obtained using the procedure indicated. Any change or modification in the procedure not recommended by Mercodia AB may affect the results, in which event Mercodia AB disclaims all warranties expressed, implied or statutory, including the implied warranty of merchantability and fitness for use.

Mercodia AB and its authorized distributors, in such event, shall not be liable for damages indirect or consequential.

REFERENCES

Hedman CA, Lindstrom T, Arnqvist HJ (2001) Direct comparison of insulin lispro and aspart shows small differences in plasma insulin profiles after subcutaneous injection in type 1 diabetes. *Diabetes Care* 24:1120-1121

Heise T, Nosek L, Biilmann Ronn B, Endahl L, Heinemann L, Kapitza C, Draeger E (2004) Lower Within-Subject Variability of Insulin Detemir in Comparison to NPH Insulin and Insulin Glargine in People With Type 1 Diabetes. *Diabetes* 53:1614-1620

Lindstrom T, Hedman CA, Arnqvist HJ (2002) Use of a novel double-antibody technique to describe the pharmacokinetics of rapid-acting insulin analogs. *Diabetes Care* 25:1049-1054

ZIELSETZUNG

Mercodia Iso-Insulin ELISA bietet eine Methode zur quantitativen Bestimmung von Insulin in humanem Serum oder Plasma.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG DES TESTES

Insulin ist das prinzipielle Hormon, das für die Kontrolle des Glukosestoffwechsels verantwortlich ist. Es wird in den β -Zellen der Langerhans'schen Inselzellen gebildet. Ebenso die Vorstufe Proinsulin, welche in C-Peptide und Insulin umgeformt wird. Sowohl Insulin als auch C-Peptide werden in gleichmolaren Mengen in das Verdauungssystem abgesondert. Das ausgereifte Insulinmolekül besteht aus zwei Polypeptidketten, der A-Kette und der B-Kette (21 respektive 30 Aminosäuren). Die zwei Ketten sind durch zwei Intraketten-Disulphidbrücken miteinander verbunden. In der A-Kette befindet sich ebenfalls eine Intraketten-Disulphidbrücke.

Die Sekretion des Insulins wird hauptsächlich durch die Glukosekonzentration im Plasma kontrolliert. Dabei hat das Hormon eine Anzahl wichtiger Funktionen im Metabolismus. Seine hauptsächliche Funktion ist die Absorption und die Verwertung der Glukose im peripheren Gewebe via Glukosetransport. Hyperglykämische Hormone wie das Glukagon, Epinephrin (Adrenalin), Wachstumshormone und Kortisol wirken hypoglykämischen Aktivitäten entgegen, wie der Inhibition der Glukoneogenese und der Glykogenolyse.

Die Insulinkonzentration im Blut ist in der insulinabhängigen Diabetes Mellitus (IDDM) und unter einigen anderen Bedingungen, wie der Hypopituitarismus, beträchtlich reduziert. Insulin ist erhöht bei nichtinsulinabhängiger Diabetes Mellitus (NIDDM), Obesity, Insulinoma und einigen endokrinen Dysfunktionen wie das Cushing's Syndrom und Acromegaly.

DAS TESTPRINZIP

Mercodia Iso-Insulin ELISA ist ein enzymatischer, zweiseitiger Immunoassay mit einer Festphase. Der Test basiert auf der direkten Sandwichtechnik, in welcher zwei monoklonale Antikörper gegen ein bestimmtes Antigen im Insulinmolekül gerichtet sind. Während der Inkubation reagiert das Insulin in der Probe mit den anti-Insulin-Antikörpern im Peroxidase-Konjugat und den anti-Insulin-Antikörpern, welche auf der Mikrotiterplatte gebunden sind. Eine einfache Waschung entfernt die ungebundenen, enzymatisch gekennzeichneten Antikörper. Das gebundene Konjugat wird durch 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine sichtbar gemacht. Durch Zugabe von Säure wird die Reaktion gestoppt. Der dadurch erhaltene colorimetrische Endpunkt wird nun spektrophotometrisch abgelesen.

WARNUNG UND VORSICHTSMASSNAHMEN

- Nur für *in vitro* Diagnostik.
- Der Inhalt dieses Kits darf nicht in Kontakt mit Wiederkäuern oder Schweinen kommen.
- Die Stop Solution in diesem Kit enthält 0.5 M H_2SO_4 . Bitte Routinevorkehrungen für gefährliche Chemikalien beachten!
- Für sämtliche Patientenproben sollten die Vorsichtsmaßnahmen für den Umgang mit Blutderivaten beachtet werden.

ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL

- 25, 50 und 200 µL Multipipetten (vorzugsweise Mehrfachpipetten für die Zugabe der Enzymkonjugatlösung, des Substrate TMB und der Stop Solution).
- Becherglas und Messzylinder für die Aufbereitung der Reagenzien.
- Destilliertes Wasser.
- Mikroplattenleser (450 nm Filter).
- Plattenschüttler (Die empfohlene Geschwindigkeit liegt bei 700–900 Umdrehungen pro Minute, Orbitalbewegung).
- Waschvorrichtung für die Mikrotiterplatten.

REAGENZIEN

Jedes Mercodia Iso-Insulin ELISA Kit enthält Reagenzien für 96 Brunnen. Dies reicht aus für 43 Proben und eine Kalibratorcurve im Duplikat. Für grössere Assay-Serien ist es empfehlenswert zusammengemischte Reagenzien aus Packungen mit der selben Lot. Nummer anzuwenden. Das Haltbarkeitsdatum für das komplette Kit ist auf dem Etikett der Packung vermerkt. Die empfohlene Lagerungstemperatur ist 2–8°C.

Coated Plate Monoklonale Anti-Insulin der Maus. Die unbenutzten Mikrotiterstreifen können in der versiegelten Originalverpackung bei 2–8°C bis zu 8 Wochen lang aufbewahrt werden.	1 Platte	96 Brunnen 8 Brunnen-Strips	Gebrauchsfertig
Calibrators 1, 2, 3, 4 Gelbfärbung. Konzentrationen sind auf den Fläschchen angegeben.	4 Fläschchen	1000 µL	Gebrauchsfertig
Calibrator 0 Gelbfärbung.	1 Fläschchen	5 mL	Gebrauchsfertig
Enzyme Conjugate 11X Peroxidasekonjugierte monoklonale Anti-Insulin der Maus.	1 Fläschchen	600 µL	Zubereitung, siehe nachfolgend
Enzyme Conjugate Buffer Blaufärbung.	1 Fläschchen	6 mL	Gebrauchsfertig
Wash Buffer 21X Lagerung nach Verdünnung: 8 Wochen bei 2–8°C.	1 Flasche	50 mL	Mit 1000 mL redestilliertem Wasser die wash buffer1X Lösung herstellen
Substrate TMB Farblose Lösung <i>Achtung! Lichtempfindlich!</i>	1 Fläschchen	22 mL	Gebrauchsfertig
Stop Solution 0.5 M H ₂ SO ₄	1 Fläschchen	7 mL	Gebrauchsfertig

Vorbereitung der Enzyme Conjugate 1X Lösung

Vorbereiten der benötigten Enzyme Conjugate 1X Lösung durch Mischen von Enzyme Conjugate 11X (1+10) mit Enzyme Conjugate Buffer entsprechend der folgenden Tabelle. Sie die Enzymkonjugat 1X Lösung für die ganze Platte vorbereiten, schütten Sie den Enzym Conjugate Buffer komplett in das Fläschchen Enzyme Conjugate 11X. Wenn Vorsichtig mischen.

Anzahl Streifen	Enzyme Conjugate 11X	Enzyme Conjugate Buffer
12 Streifen	1 Fläschchen	1 Fläschchen
8 Streifen	350 µL	3.5 mL
6 Streifen	250 µL	2.5 mL
4 Streifen	200 µL	2.0 mL

Lagerung nach Verdünnung: 8 Wochen bei 2-8°C.

PRÄPARATGEWINNUNG UND HANDHABUNG

Serum

Gewinnen von Blut durch Venenpunktion, gerinnen lassen und das Serum durch Zentrifugieren abtrennen. Die Proben können bis zu 24 Stunden bei 2–8°C aufbewahrt werden. Längere Lagerzeiten erfordern eine Temperatur von –20°C. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen sollte vermieden werden.

Plasma

Gewinnen von Blut durch Venenpunktion. Verhinderung einer Koagulation des Venenblutes durch die Zugabe von Heparin oder EDTA. Anschließend Trennung der Plasmafraktion. Die Proben können bis zu 24 Stunden bei 2–8°C aufbewahrt werden. Längere Lagerzeiten erfordern eine Temperatur von –20°C. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen sollte vermieden werden.

Vorbereitung der Proben

Liegt die Konzentration über 100 mU/L wird eine Verdünnung von 1/10 v/v mit Calibrator 0 empfohlen.

TESTDURCHFÜHRUNG

Alle Reagenzien müssen vor Beginn auf Raumtemperatur gebracht werden. Ebenso sollte für jeden Test eine Kalibratorkurve gemacht werden.

1. Vorbereiten Sie die Enzyme Conjugate 1X Lösung und den Wash Buffer 1X Lösung.
2. Vorbereiten genügend Mikrotiterplatten für die Calibrators und die Proben im Dublikat.
3. Pipettieren von 25 μ L von jedem Calibrator und der Proben in die dafür vorgesehenen Brunnen.
4. Zugabe von 50 μ L Enzyme Conjugate 1X Lösung in die Brunnen.
5. Inkubation auf einem Schüttler (700-900 rpm) für 1 Stunde bei Raumtemperatur (18–25°C)
6. 6-mal waschen mit 700 μ L Wash Solution 1X Lösung pro Vertiefung unter Verwendung eines Platten-Waschautomaten mit Überlauf-Waschfunktion. Nach der letzten Waschung Wash Buffer-Reste gründlich entfernen, indem der Rahmen mit den Streifen (Öffnung nach unten) mehrmals kräftig auf eine saugfähige Unterlage aufgeschlagen wird. Die Waschprozedur sollte keine Einwirkzeit beinhalten.
Wird manuell gewaschen, bitte folgendermaßen vorgehen. Reaktionsvolumen verwerfen, durch Umdrehen der Mikrotiterplatte über einem Ausgussbecken. 350 μ L Wash buffer 1X Lösung in jede Vertiefung geben. Waschlösung verwerfen und mehrmals kräftig gegen saugfähiges Papier schlagen, um überschüssige Flüssigkeit zu entfernen. 5-mal wiederholen. Längere Einwirkzeiten während dieser Waschprozedur vermeiden.
7. 200 μ L TMB Substrate beifügen.
8. 15 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur (18–25°C)
9. Zugabe von 50 μ L Stop Solution in jeden Brunnen
Um eine gute Mischung von Substrat und Stop Solution zu gewährleisten, wird empfohlen, die Platte für 5 Sekunden auf den Schüttler zu stellen.
10. Messen der Absorbance bei 450 nm und auswerten
Das Resultat sollte innerhalb von 30 Minuten abgelesen werden.

Beachten Sie! Um Kontaminationen zwischen dem Konjugat und dem Substrat zu vermeiden, empfehlen wir Ihnen separate Pipetten zu verwenden.

QUALITÄTSKONTROLLE

Die Verwendung von kommerziellen Kontrollen, wie die Mercodia Diabetes Antigen Control (Produkte-Nr: 10-1134-01/10-1164-01) und/oder interne Serumpool mit tiefer, mittlerer und hoher Insulinkonzentrationen, angewandt als Proben, ist ratsam, um tägliche Gültigkeit der Resultate zu sichern. Es wird jedem Labor empfohlen, folgende Daten eines jeden Testes zu erfassen: Kit Lot-Nummer; rekonstruierte Daten von Kitkomponenten, OD Werte der Blanks, Kalibration und Kontrollen.

BERECHNUNG DER RESULTATE

Computergestützte Berechnung

Es kann eine computergestützte Berechnung der Absorbanzwerte der Calibrators, ausser Calibrator 0, und deren Konzentration mit Hilfe einer cubic spline regression erfolgen, um die Konzentration an Insulin zu ermitteln.

Manuelle Berechnung

1. Einzeichnen der für die Calibrators, ausser Calibrator 0, erhaltenen Absorbanzwerte im Verhältnis zur Insulin-Konzentration auf einem lin-log Papier und Erstellen einer Kalibratorkurve.
2. Die Konzentration der Proben aus der Kalibratorkurve ablesen.

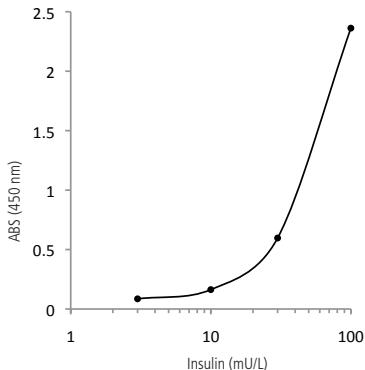
Beispiel von Resultaten

Brunnen	Identität	A ₄₅₀	Mittlerwert mU/L
1A–B	Calibrator 0	0.066/0.067	
1C–D	Calibrator 1*	0.084/0.087	
1E–F	Calibrator 2*	0.161/0.165	
1G–H	Calibrator 3*	0.595/0.599	
2A–B	Calibrator 4*	2.377/2.347	
2C–D	Probe 1	0.270/0.272	16.4
2E–F	Probe 2	1.146/1.192	53.6
2G–H	Probe 3	2.044/2.150	92.7

*Die Konzentration ist auf dem Fläschchen angegeben.

Beispiel einer Kalibratorkurve

Hier wird eine typische Kalibratorkurve gezeigt. Sie soll nicht zur Berechnung aktueller Testergebnisse benutzt werden.



GRENZEN DES VERFAHRENS

Wie bei allen diagnostischen Tests sollte auch hier eine endgültige klinische Beurteilung nicht auf den Resultaten eines Einzeltests beruhen, sondern erst nach Erhalt der Ergebnisse aller klinischen und Laborbefunde abgegeben werden. Proben von Individuen, die einer Insulinbehandlung unterzogen wurden, können den Test stören, da in diesen Anti-Insulin Antikörper vorhanden sind.

Lipemic, Icteric oder hämolysierte Proben beeinträchtigen den Versuch nicht.

ERWARTETE WERTE

Es wird empfohlen, dass jedes Labor eigene Referenzwerte etabliert. Die folgenden Resultate können als Richtlinie gelten, bis das Labor genügend eigene Daten gesammelt hat.

Mercodia machte vergleichende Studien mit 90 Proben zwischen Mercodia Iso-Insulin ELISA und Mercodia Insulin ELISA. Dabei wurde eine Korrelation von $r=0.98$ zwischen den beiden Techniken erreicht.

Deshalb können die erwarteten Werte für Mercodia Insulin ELISA auch für Mercodia Iso-Insulin ELISA angewendet werden.

Die Mittelwerte von 137 scheinbar gesunden und fastenden Personen erreichten einen Mittelwert von 10 mU/L und einen Medianwert von 7 mU/L. Die Spannweite betrug 2-25 mU/L bezüglich des Zentrums und beinhaltete 95% der beobachteten Werte.

TESTCHARAKTERISIERUNG

Nachweisgrenze

Die Nachweisgrenze liegt bei 1 mU/L, definiert durch zwei Standardabweichungen über dem Durchschnitt des Calibrator 0.

Wiederfindung

Die Wiederfindung nach Zugabe beträgt 101%.

Hookeffekt

Bei Proben mit einer Konzentration bis zu 2000 mU/L wurde kein Hook-Effekt festgestellt.

Präzision

Jede Probe wurde unter 8 verschiedenen Bedingungen 4 mal gemessen.

Probe	Mittelwert mU/L	Variationskoeffizient		
		während des Testes %	zwischen den Testen %	total Testen %
1	15.9	3.0	3.9	4.9
2	53.2	2.8	3.0	4.1
3	90.9	3.2	3.0	4.4

Spezifität

Insulin	100%
Insulin lispro (Humalog®, Eli Lilly)	89%
Insulin aspart	80%
Insulin detemir	22%
Insulin glargin	44%
Insulin glulisine	100%
C-peptide	< 0.1%
Proinsulin	54%
Proinsulin des (31-32)	58%
Proinsulin split (32-33)	56%
Proinsulin des (64-65)	66%
Proinsulin split (65-66)	78%
IGF-I	< 0.02%
IGF-II	< 0.02%
Ratteninsulin	71%
Mausinsulin	49%
Schweineinsulin	306%
Schafinsulin	131%
Rinderinsulin	58%

KALIBRIERUNG

Mercodia Iso-Insulin ELISA Kit wurde kalibriert gemäss der 1st International Reference Preparation 66/304 for human insulin.

UMRECHNUNGSFAKTOR

1 µg/L = 29 mU/L; 1 mU/L = 6.0 pmol/L

HAFTUNG

Die hier aufgeführten Durchführungsdaten wurden mit dem indizierten Verfahren gewonnen. Jede von Mercodia AB nicht empfohlene Änderung oder Modifikation des Verfahrens kann die Resultate beeinträchtigen. In diesem Fall lehnt Mercodia AB jede explizierte, implizierte oder gesetzliche Garantie ab, die implizierte Marktfähigkeit und Anwendbarkeit inbegriffen.

Mercodia AB und deren Vertreter können dann weder für direkte Schäden noch für Folgeschäden haftbar gemacht werden.

REFERENZEN

Hedman CA, Lindstrom T, Arnqvist HJ (2001) Direct comparison of insulin lispro and aspart shows small differences in plasma insulin profiles after subcutaneous injection in type 1 diabetes. *Diabetes Care* 24:1120-1121

Heise T, Nosek L, Biilmann Ronn B, Endahl L, Heinemann L, Kapitza C, Draeger E (2004) Lower Within-Subject Variability of Insulin Detemir in Comparison to NPH Insulin and Insulin Glargine in People With Type 1 Diabetes. *Diabetes* 53:1614-1620

Lindstrom T, Hedman CA, Arnqvist HJ (2002) Use of a novel double-antibody technique to describe the pharmacokinetics of rapid-acting insulin analogs. *Diabetes Care* 25:1049-1054

UTILISATION PREVUE

Le test Mercodia Iso-Insulin ELISA fournit une méthode de détermination des quantités d'insuline humaine dans le sérum ou le plasma.

RÉSUMÉ ET EXPLICATION DU TEST

L'insuline est la principale hormone impliquée dans le contrôle du métabolisme du glucose. Son précurseur, la proinsuline, est sécrété par les cellules β des îlots de Langerhans, puis transformé pour donner des peptides C et de l'insuline, sécrétés, en quantités équimolaires, dans la circulation portale. La molécule d'insuline elle-même comprend deux chaînes de polypeptides, la chaîne A et la chaîne B (composées, respectivement, de 21 et de 30 acides aminés). Ces deux chaînes sont rattachées par deux ponts disulfure interchaînes. La chaîne A comporte également un pont disulfure intrachaîne.

L'insuline, dont la sécrétion est principalement contrôlée par la concentration de glucose plasmatique, produit plusieurs effets métaboliques importants. Sa principale fonction consiste à contrôler l'absorption et l'utilisation du glucose dans les tissus périphériques, via le transporteur du glucose. Cette activité hypoglycémiante (ainsi que d'autres : inhibition de la gluconéogenèse et de la glycogénolyse hépatiques) est contrebalancée par les hormones hyperglycémiantes, notamment le glucagon, l'adrénaline, l'hormone de croissance et le cortisol.

Les concentrations en insuline sont fortement réduites dans le diabète insulino-dépendant (insulin-dependent diabetes mellitus, IDDM) et dans d'autres affections telles que l'insuffisance hypophysaire. Elles sont accrues dans le diabète non insulino-dépendant (non-insulin-dependent diabetes mellitus, NIDDM), l'obésité, l'insulinome et quelques autres dysfonctionnements endocriniens tels que le syndrome de Cushing et l'acromégalie.

PRINCIPE DE LA PROCÉDURE

Une caractéristique du test Mercodia Iso-Insulin ELISA est le dosage immunologique enzymatique à double site, en phase solide. Il repose sur une technique de type "sandwich direct", dans laquelle deux anticorps monoclonaux sont dirigés contre deux déterminants antigéniques distincts de l'insuline. En phase d'incubation, les molécules d'insuline de l'échantillon réagissent avec les anticorps anti-insuline correspondants dans le peroxydase conjugué et les anticorps anti-insuline correspondants fixés aux puits de microtitration.

Un rinçage simple élimine les anticorps marqués non liés. Le conjugué est détecté par réaction avec la 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine (TMB). Pour arrêter la réaction, on ajoute de l'acide. Cette solution fournit un point d'évaluation colorimétrique, qui sera lu par spectrophotométrie.

AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

- Ce kit est réservé à l'utilisation diagnostique *in vitro*.
- Vous devez éviter tout contact entre le contenu ou les résidus de ce kit et les ruminants ou les suidés.
- La Stop Solution fournie contient 0.5 M d'acide sulfurique (H_2SO_4). Respectez les précautions habituelles relatives à l'utilisation de produits chimiques dangereux.
- Tous les spécimens patient doivent être traités comme des échantillons contagieux.

MATÉRIEL NÉCESSAIRE NON FOURNI

- Pipettes de 25, 50 et 200 µL (pipettes à répétition recommandées pour l'ajout du conjugué enzymatique, de Substrate [TMB] et de Stop Solution).
- Bêchers et éprouvettes cylindriques pour la préparation des réactifs.
- Eau redistillée.
- Lecteur de microplaques (filtre de 450 nm).
- Agitateur secoueur de plaques (Le régime recommandé est de 700-900 tours par minute, mouvement orbital).
- Dispositif de rinçage de microplaques.

RÉACTIFS

Chaque kit Mercodia Iso-Insulin ELISA contient suffisamment de réactifs pour 96 puits, soit une quantité permettant de traiter 43 échantillons et une courbe d'étalonnage en double. Pour des séries de dosages plus importantes, mélangez les réactifs de kits portant des numéros de lot identiques. La date de péremption du kit figure sur l'étiquette apposée à l'extérieur. La température de stockage recommandée est 2 à 8 °C.

Coated Plate Monoclonal murin anti-insuline Les puits de microtitration non utilisés peuvent être conservés pendant 8 semaines entre 2-8°C après les avoir replacés dans leur emballage hermétiquement fermé à l'aide de papier adhésif.	1 plaque	96 puits Bandes de 8 puits	Prête à l'emploi
Calibrators 1, 2, 3, 4 Code couleur: jaune Conc. indiquée sur l'étiquette.	4 fioles	1000 µL	Prête à l'emploi
Calibrator 0 Code couleur: jaune.	1 fiole	5 mL	Prête à l'emploi
Enzyme Conjugate 11X Peroxidase conjugué monoclonal murin anti-insuline.	1 fiole	600 µL	A préparer, voir ci-dessous
Enzyme Conjugate Buffer Code couleur: bleu.	1 fiole	6 mL	Prête à l'emploi
Wash Buffer 21X Stockage après dilution: 2-8°C pour 8 semaines.	1 fiole	50 mL	Diluez avec 1000 mL d'eau distillée pour préparer la solution de wash buffer 1X
Substrate TMB Solution incolore. <i>Remarque! Cette solution est sensible à la lumière!</i>	1 fiole	22 mL	Prête à l'emploi
Stop Solution 0.5 M H ₂ SO ₄	1 fiole	7 mL	Prête à l'emploi

Préparation la solution d'enzyme conjuguée 1X

Préparez la solution d'enzyme conjuguée 1X nécessaire en diluant 11X l'Enzyme Conjugate (1+10) dans l'Enzyme Conjugate Buffer, en suivant les indications du tableau ci-dessous. Lors de la préparation la solution d'enzyme conjuguée 1X pour une plaque entière, transférer tout le tampon du Enzyme Conjugate Buffer dans le flacon du Enzyme Conjugate 11X. Mélangez sans agiter.

Nombre de bandes	Enzyme Conjugate 11X	Enzyme Conjugate Buffer
12 bandes	1 fiole	1 fiole
8 bandes	350 µL	3.5 mL
6 bandes	250 µL	2.5 mL
4 bandes	200 µL	2.0 mL

Stockage après dilution: à température comprise entre 2 et 8°C pendant 8 semaines.

COLLECTE ET MANIPULATION DES SPÉCIMENS

Sérum

Collectez le sang par ponction veineuse, attendez la coagulation, puis isolez le sérum par centrifugation. Les échantillons peuvent être stockés jusqu'à 24 heures à une température comprise entre 2 et 8°C. Pour les conserver plus longtemps, stockez-les à -20°C. Évitez de les congeler et de les décongeler plusieurs fois.

Plasma

Collectez le sang par ponction veineuse dans des tubes contenant de l'héparine ou de l'EDTA comme anticoagulant et isolez le plasma. Les échantillons peuvent être stockés jusqu'à 24 heures à une température comprise entre 2 et 8°C. Pour les conserver plus longtemps, stockez les à -20°C. Évitez de les congeler et de les décongeler plusieurs fois.

Préparation des échantillons

En général, les échantillons n'ont pas besoin d'être dilués ; toutefois, ceux dont la concentration est supérieure à 100 mU/L doivent être dilués à 1/10 v/v avec le Calibrator 0.

PROCÉDURE DE TEST

Tous les réactifs et échantillons doivent être mis à température ambiante avant utilisation. Préparez une courbe de Calibrator pour chaque dosage.

1. Préparez solution d'enzyme conjuguée 1X et solution de wash buffer 1X.
2. Préparez un nombre suffisant de puits de microplaques pour y loger les Calibrators et les échantillons en double.
3. Pipetez 25 µL de Calibrators et d'échantillons dans les puits appropriés.
4. Ajoutez 50 µL la solution d'enzyme conjuguée 1X dans chaque puits.
5. Laissez incuber sur un agitateur secoueur de plaques (700-900 rpm) pendant une heure à température ambiante (entre 18 et 25°C).
6. Lavez 6 fois avec 700 µL solution de wash buffer 1X par puit avec un laveur de plaques automatique en utilisant la fonction aspiration verticale. Après le dernier rinçage, retournez la plaque et appuyez-la fermement sur du papier absorbant. Evitez l'étape de trempage dans la procédure de lavage.

Ou lavez manuellement :

Jetez le volume réactionnel en retournant la plaque au-dessus d'un évier. Ajoutez 350 µL solution de wash buffer 1X dans chaque puit. Jetez la solution de wash buffer 1X, tapez fermement plusieurs fois sur un papier absorbant pour ôter l'excès de liquide. Répétez 5 fois. Evitez les trempages prolongés pendant l'étape de lavage.

7. Ajoutez 200 µL de Substrate TMB.
8. Laissez incuber pendant 15 minutes à température ambiante (18 et 25°C).
9. Ajoutez 50 µL de Stop Solution dans chaque puits.
Placez la plaque sur un agitateur secoueur pendant environ 5 secondes, afin que le mélange s'effectue bien.
10. Lisez la densité optique à 450 nm et calculez les résultats.
La lecture doit être réalisée sous 30 minutes.

Note: Pour éviter les contaminations du conjugué avec le substrat, il est recommandé d'utiliser des pipettes différentes.

CONTRÔLE QUALITÉ INTERNE

Les contrôles disponibles dans le commerce, tels que le Mercodia Diabetes Antigen Control (référence 10-1134-01/10-1164-01), ou les mélanges de sérums internes dont la concentration en insuline est faible, moyenne ou élevée, doivent systématiquement être soumis à un dosage, comme des mélanges de concentration échantillons, et les résultats doivent être reportés sur un graphique journalier. C'est une bonne pratique pour un laboratoire d'enregistrer les données suivantes pour chaque dosage: numéro de lot du kit, dates de reconstitution des composants, valeurs OD du blanc, des Calibrators et des contrôles.

CALCUL DES RÉSULTATS

Calcul par ordinateur

Pour calculer la concentration en insuline, réduisez les données d'absorbance des Calibrators, à l'exception du Calibrator 0, comparées à la concentration, en appliquant une équation de régression de la spline cubique.

Calcul manuel

- Placez les points correspondant aux valeurs d'absorbance obtenues pour les Calibrators, à l'exception du Calibrator 0, en fonction de la concentration de insuline sur un papier lin-log pour graphiques logarithmiques et tracez la courbe d'étalonnage.
- Lisez la concentration des échantillons à partir de cette courbe.

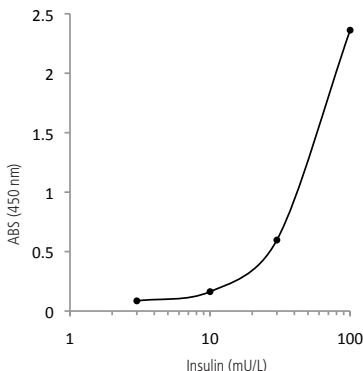
Exemple de résultats

Puits	Identité	A ₄₅₀	Coc. moy. mU/L
1A–B	Calibrator 0	0.066/0.067	
1C–D	Calibrator 1*	0.084/0.087	
1E–F	Calibrator 2*	0.161/0.165	
1G–H	Calibrator 3*	0.595/0.599	
2A–B	Calibrator 4*	2.377/2.347	
2C–D	Échantillon 1	0.270/0.272	16.4
2E–F	Échantillon 2	1.146/1.192	53.6
2G–H	Échantillon 3	2.044/2.150	92.7

*Concentration indiquée sur l'étiquette du flacon.

Exemple de courbe d'étalonnage

La courbe présentée est une courbe d'étalonnage type. Ne l'utilisez pas pour déterminer les résultats des dosages réels.



LIMITES DE LA PROCÉDURE

Comme pour tous les tests de diagnostic, le diagnostic clinique définitif ne doit pas reposer sur les conclusions d'un seul test : il doit être effectué par le médecin après évaluation de tous les résultats cliniques. L'application de ce test à des patients recevant déjà une insulinothérapie se complique par la formation d'anticorps anti-insuline, susceptibles d'interférer avec le dosage.

L'hémolyse, l'ictère ou la lipémie n'affectent pas le dosage.

VALEURS MOYENNES

La déontologie incite chaque laboratoire à établir sa propre gamme de valeurs. Les résultats suivants peuvent servir de guide jusqu'à ce que le laboratoire ait rassemblé suffisamment de données provenant de ses propres sources.

Les études comparatives entre les tests Mercodia Iso-Insulin ELISA et Mercodia Insulin ELISA ont été réalisées avec 90 échantillons. Les résultats indiquent une bonne corrélation entre les deux techniques : $r = 0.98$.

Par conséquent, les valeurs moyennes pour le test Mercodia Insulin ELISA peuvent aussi être utilisées pour Mercodia Iso-Insulin ELISA.

Un test de glycémie à jeun sur 137 individus apparemment en bonne santé donne une moyenne de 10 mU/L, une valeur médiane de 7 mU/L et une étendue de 2 mU/L à 25 mU/L pour 95 % des observations.

CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCES

Limites de détection

La limite de la détection est inférieure à 1 mU/L deux écarts-type au-dessus du Calibrator 0.

Récupération

Le dosage en retour donne une valeur comprise entre 101%.

Hook effect

Le kit permet d'effectuer des mesures sur des échantillons d'une concentration maximale de 2000 mU/L sans donner de faux résultats bas.

Précision

Chaque échantillon a été analysé en 4 exemplaires à 8 occasions différentes.

Échantillon	Valeur moyenne mU/L	Coefficient de variation		
		% pendant du dosage	% entre le dosage	% total les dosages
1	15.9	3.0	3.9	4.9
2	53.2	2.8	3.0	4.1
3	90.9	3.2	3.0	4.4

Spécificité

Insuline	100%
Insuline lispro (Humalog®, Eli Lilly)	89%
Insuline aspart	80%
Insulin detemir	22%
Insulin glargin	44%
Insulin glulisine	100%
Peptide C	< 0.1%
Proinsuline	54%
Des (31-32) proinsulin	58%
Split (32-33) proinsulin	56%
Des (64-65) proinsulin	66%
Split (65-66) proinsulin split (65-66)	78%
IGF-I	< 0.02%
IGF-II	< 0.02%
Insuline du rat	71%
Insuline du souris	49%
Insuline du porcine	306%
Insulin du mouton	131%
Insulin du boeuf	58%

ETALONNAGE

Le kit spécial Mercodia Iso-Insulin ELISA est étalonné à l'aide du réactif de référence International Reference Preparation 66/304 for human insulin.

FACTEUR DE CONVERSION

1 µg/L = 29 mU/L; 1 mU/L = 6.0 pmol/L

GARANTIE

Les données de performances présentées dans ce document ont été obtenues lors de tests respectant la procédure indiquée. Tout changement ou modification dans la procédure, non recommandé par Mercodia AB, est susceptible d'affecter les résultats. Si la procédure n'est pas respectée, Mercodia AB décline toute responsabilité concernant les garanties exprimées, légales ou implicites, y compris la garantie implicite relative à la qualité marchande et à la conformité d'usage de ce kit.

Mercodia AB et ses distributeurs agréés ne sauront être tenus pour passibles de dommages indirects ou immatériels si la procédure décrite n'est pas respectée.

RÉFÉRENCES

Hedman CA, Lindstrom T, Arnqvist HJ (2001) Direct comparison of insulin lispro and aspart shows small differences in plasma insulin profiles after subcutaneous injection in type 1 diabetes. *Diabetes Care* 24:1120-1121

Heise T, Nosek L, Biilmann Ronn B, Endahl L, Heinemann L, Kapitza C, Draeger E (2004) Lower Within-Subject Variability of Insulin Detemir in Comparison to NPH Insulin and Insulin Glargine in People With Type 1 Diabetes. *Diabetes* 53:1614-1620

Lindstrom T, Hedman CA, Arnqvist HJ (2002) Use of a novel double-antibody technique to describe the pharmacokinetics of rapid-acting insulin analogs. *Diabetes Care* 25:1049-1054

UTILIZACIÓN PREVISTA

Mercodía Iso-Insulin ELISA es un método para la determinación cuantitativa de insulina humana en suero o plasma.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN DE LA PRUEBA

La insulina es la principal hormona encargada del control del metabolismo de la glucosa. Es sintetizada por las células β de los islotes de Langerhans como el precursor proinsulina que se procesa para formar péptido C e insulina. Ambos se secretan en cantidades equimolares a la circulación portal. La molécula de insulina madura consta de dos cadenas polipeptídicas, la cadena A y la cadena B (21 y 30 aminoácidos, respectivamente). Las dos cadenas están unidas por dos puentes disulfuro intercatenarios. En la cadena A también hay un puente disulfuro intracatenario.

La secreción de insulina se controla principalmente mediante la concentración plasmática de glucosa, y la hormona tiene diversas e importantes acciones metabólicas. Su función principal es controlar la captación y utilización de glucosa en los tejidos periféricos por medio de la glucosa. Esta y otras acciones hipoglucémicas, como la inhibición de la neoglucogenesis y la gluconeogénesis hepática, están contrarrestadas por las hormonas hiperglucémicas, como glucagon, adrenalina, hormona del crecimiento y cortisol.

Las concentraciones de insulina están reducidas de forma importante en la diabetes mellitus insulino dependiente (DMID) y en otras patologías como el hipopituitarismo. Los niveles de insulina están aumentados en la diabetes mellitus no insulino dependiente (DMNID), obesidad, insulinoma y algunas disfunciones endocrinas como el síndrome de Cushing y la acromegalia.

PRINCIPIO DEL PROCEDIMIENTO

Mercodía Iso-Insulin ELISA es un inmunoensayo de fase sólida de dos puntos. Se basa en la técnica de sandwich directo según la que dos anticuerpos monoclonales se dirigen contra determinantes antigénicos separados de la molécula de insulina. Durante la incubación, la insulina de la muestra reacciona con los anticuerpos anti-insulina conjugados en peroxidasa y anticuerpos anti-insulina ligados con los pocillos de microtitración. El anticuerpo marcado con enzima no unido se elimina con un simple lavado. El Enzyme Conjugate unido se detecta por reacción con 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB). La reacción se para añadiendo ácido para dar un punto final colorimétrico que se lee por espectrofotometría.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

- Para uso diagnóstico *in vitro*.
- El contenido de este kit y sus residuos no deben dejarse entrar en contacto con animales rumiantes o cerdos.
- La Stop Solution de este kit contiene 0,5M H_2SO_4 . Seguir las precauciones rutinarias para el manejo de productos químicos peligrosos.
- Las muestras de los pacientes deben manipularse como si fueran capaces de transmitir infecciones.

MATERIAL REQUERIDO PERO NO SUMINISTRADO

- Pipetas de 25, 50 y 200 μL (para la adición de la disolución conjugado enzimático, Substrate TMB y Stop Solution se prefieren las pipetas de repetición).
- Cubetas y probetas para preparar los reactivos.
- Agua bidestilada.
- Lector de microplacas (filtro de 450 nm).
- Agitador de placas (La velocidad recomendable es de 700-900 vueltas por minuto, movimiento orbital).
- Lavador de microplaca.

REACTIVOS

Cada kit de Mercodia Iso-Insulin ELISA contiene reactivos para 96 pocillos, suficientes para 43 muestra y una curva de calibración por duplicado. Para series de ensayos más amplias, mezclar reactivos de paquetes de número de lote idéntico. La fecha de caducidad del kit completo está en el exterior identificada en una etiqueta. La temperatura de conservación recomendada es 2–8 °C.

Coated Plate Anticuerpo monoclonal de ratón anti-insulina. Para cintas de microtitración sin utilizar, cerrar la bolsa con cinta adhesiva y conservar a 2–8°C durante 8 semanas.	1 placa	96 pocillos	Listor para usar 8 tiras de pocillos
Calibrators 1, 2, 3, 4 Codificado en amarillo. Concentración indicada la etiqueta del vial.	4 viales	1000 μL	Listor para usar
Calibrator 0 Codificado en amarillo.	1 vial	5 mL	Listo para usar
Enzyme Conjugate 11X Monoclonal de ratón Enzyme Conjugate con peroxidasa anti-insulina.	1 vial	600 μL	Preparación, ver abajo
Enzyme Conjugate Buffer Codificado en azul.	1 vial	6 mL	Listo para usar
Wash Buffer 21X Almacenaje después de diluir: 2–8°C durante 8 semanas.	1 botella	50 mL	Diluir con 1000 mL agua bidestilada para preparar la solución de wash buffer 1X
Substrate TMB Solución incolora <i>Atención! Es sensible a la luz!</i>	1 vial	22 mL	Listo para usar
Stop Solution 0.5 M H_2SO_4	1 vial	7 mL	Listo para usar

Preparación de solución de la enzyme conjugate 1X

Preparar el volumen necesario de solución de la enzyme conjugate 1X por dilución del Enzyme Conjugate 11X (1+10) en Enzyme Conjugate Buffer según la siguiente tabla. Si se usa toda la placa, verter completamente el tampón Enzyme Conjugate Buffer al vial Enzyme Conjugate 11X. Mezclar suavemente.

Número de tiras	Enzyme Conjugate 11X	Enzyme Conjugate Buffer
12 tiras	1 vial	1 vial
8 tiras	350 µL	3.5 mL
6 tiras	250 µL	2.5 mL
4 tiras	200 µL	2.0 mL

Conservación después de la dilución: 2-8°C durante 8 semanas.

OBTENCIÓN Y MANIPULACIÓN DE MUESTRAS

Suero

Recoger la sangre por venipunción, dejar coagular y separar el suero por centrifugación. Las muestras pueden conservarse a 2–8°C hasta 24 horas. Para periodos más largos, conservar las muestras a –20°C. Evitar la congelación y descongelación de forma repetida.

Plasma

Recoger la sangre por venipunción en tubos que contienen heparina o EDTA como anticoagulante y separar la fracción de plasma. Las muestras pueden conservarse a 2–8°C hasta 24 horas. Para periodos más largos, conservar las muestras a –20°C. Evitar la congelación y descongelación de forma repetida.

Preparación de las muestras

Normalmente no es necesario diluirlas; sin embargo, las muestras que contienen > 100 mU/L deben diluirse 1/10 v/v con Calibrator 0.

PROCEDIMIENTO DE EVALUACIÓN

Todos los reactivos y muestras deben estar a temperatura ambiente antes de su uso. Preparar una curva calibración para cada ensayo.

1. Preparar solución de la enzyme conjugate 1X y solución de wash buffer 1X.
2. Preparar suficientes pocillos de microplaca para los Calibrators y muestras por duplicado.
3. Pipetear 25 µL de cada Calibrator y muestra en los pocillos correspondientes.
4. Añadir 50 µL solución de la enzyme conjugate 1X a cada pocillo.
5. Incubar en un agitador de placas (700-900 rpm) durante 1 hora a temperatura ambiente (18–25°C).
6. Lavar 6 veces con 700 µL solución de wash buffer 1X por pocillo mediante Lavador de placas automático con función de sobre-flujo de lavado. Después del lavado final, invertir la placa y golpearla firmemente contra papel absorbente. No usar el paso de remojo durante el proceso.
O manualmente:
Verter el líquido invirtiendo la microplaca en una pila. Añadir 350 µL de solución de wash buffer 1X, golpeando firmemente la placa contra papel absorbente para eliminar todo el líquido en exceso. Repetir 5 veces. Evitar remojo prolongado durante el proceso
7. Añadir 200 µL de Substrate TMB.
8. Incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente (18–25°C).
9. Añadir 50 µL de Stop Solution de parada a cada pocillo.
Colocar la placa en un agitador durante aproximadamente 5 segundos para asegurar el mezclado.
10. Leer la densidad óptica a 450 nm y calcular los resultados.
Leer en 30 minutos.

Aviso: Usar pipetas distintas para prevenir contaminación entre conjugado y sustrato.

CONTROL DE CALIDAD INTERNA

Los controles comerciales como Mercodia Diabetes Antigen Control (N.º de código: 10-1134-01/10-1164-01) y/o mezclas de sueros internas con concentraciones de insulina bajas, medias y altas, se analizarán de forma rutinaria como muestras y los resultados se representarán día a día. Es una buena práctica de laboratorio registrar los siguientes datos en cada ensayo: número de lote del kit, fechas de reconstitución de los componentes del kit, valores de DO de blanco, Calibrators y controles.

CÁLCULO DE RESULTADOS

Cálculo computarizado

Para obtener la concentración de insulina realice la reducción de datos computarizados del a absorbancia para los Calibrators, sin Calibrator 0, frente a la concentración utilizando una regresión spline cúbica.

Cálculo manual

1. Representar gráficamente los valores de absorbancia obtenidos para los Calibrators, sin Calibrator 0, frente a la concentración de insulina en papel lin-log y construir una curva de calibración.
2. Leer la concentración de las muestras a partir de la curva de calibración.

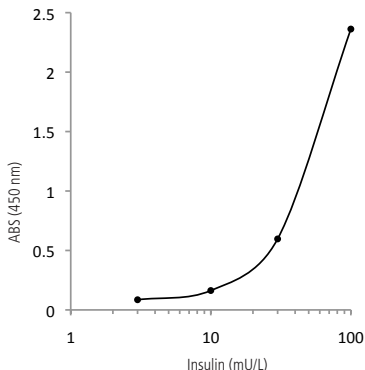
Ejemplo de resultados

Pocillos	Identidad	A ₄₅₀	Conc. media mU/L
1A-B	Calibrator 0	0.066/0.067	
1C-D	Calibrator 1*	0.084/0.087	
1E-F	Calibrator 2*	0.161/0.165	
1G-H	Calibrator 3*	0.595/0.599	
2A-B	Calibrator 4*	2.377/2.347	
2C-D	Muestra 1	0.270/0.272	16.4
2E-F	Muestra 2	1.146/1.192	53.6
2G-H	Muestra 3	2.044/2.150	92.7

*Concentración indicada en la etiqueta del vial.

Ejemplo de curva de calibración

Aquí se presenta una curva de calibración típica. Esta curva no debe utilizarse para verificar resultados de un ensayo.



LÍMITES DEL PROCEDIMIENTO

Igual que todas las pruebas diagnósticas, un diagnóstico clínico definitivo no debe estar basado únicamente en los resultados de una sola prueba, sino que el médico debe hacerlo sólo después de haber evaluado todos los datos clínicos.

Es complicado realizar esta prueba en individuos que están sometidos a insulino terapia, por la formación de anticuerpos anti-insulina que pueden interferir en el ensayo.

Las muestras lipémicas, ictericas o hemolizadas no interfieren en el ensayo.

VALORES ESPERADOS

Una buena práctica de laboratorio dicta que cada laboratorio establezca su propio rango de valores. Los siguientes resultados pueden servir de guía hasta que el laboratorio haya reunido suficientes datos por su cuenta.

Se han realizado estudios de comparación entre Mercodia Iso-insulin ELISA y Mercodia Insulin ELISA con 90 muestras. Los valores encontrados muestran una buena correlación entre estas dos técnicas, $r=0.98$.

Por tanto, los valores esperados para Mercodia Insulin ELISA pueden utilizarse también para Mercodia Iso-Insulin ELISA.

Los niveles medios en ayunas de 137 individuos estudiados, aparentemente sanos, fueron de 10 mU/L, una mediana de 7 mU/L y un rango – correspondiente al 95% central de las observaciones, de 2–25 mU/L.

CARACTERÍSTICAS DEL RENDIMIENTO

Límite de detección

El límite de detección es 1 mU/L calculado como dos desviaciones estándar por encima del Calibrator 0.

Recuperación

Suero: La recuperación a la adición es 101%

Efecto gancho

Las muestras con una concentración superior a 2000 mU/L pueden medirse sin obtener resultados falsamente bajos.

Precisión:

Cada muestra se analizó en 4 replicados en 8 ocasiones diferentes.

Muestra	Valor medio mU/L	Coeficiente de variación		
		intra- ensayo %	inter- ensayo %	total ensayo %
1	15.9	3.0	3.9	4.9
2	53.2	2.8	3.0	4.1
3	90.9	3.2	3.0	4.4

Especificidad

Insulina	100%
Insulina lispro (Humalog®, Eli Lilly)	89%
Insulina aspart	80%
Insulin detemir	22%
Insulin glargin	44%
Insulin glulisine	100%
Péptido C	< 0.1%
Proinsulina	54%
Proinsulina des (31-32)	58%
Proinsulina split (32-33)	56%
Proinsulina des (64-65)	66%
Proinsulina split (65-66)	78%
IGF-I	< 0.02%
IGF-II	< 0.02%
Insulina de rata	71%
Insulina de ratón	49%
Insulina porcino	306%
Insulina de oveja	131%
Insulina bovino	58%

CALIBRACIÓN

El kit Mercodia Iso-Insulin ELISA se calibra contra el reactivo de International Reference Preparation 66/304 for human insulin.

FACTOR DE CONVERSIÓN

1 µg/L = 29 mU/L; 1 mU/L = 6.0 pmol/L

GARANTÍA

Los datos de rendimiento presentados aquí se obtuvieron usando el procedimiento indicado. Cualquier cambio o modificación en el procedimiento, no recomendado por Mercodia AB, puede afectar los resultados, en cuyo caso Mercodia AB declina cualquier responsabilidad y garantía acordada, implícita o explícita, incluso la garantía implícita sobre la comerciabilidad e idoneidad para su uso.

Mercodia AB y sus distribuidores autorizados, en tal caso, no asumirán responsabilidades por daños y perjuicios indirectos o consiguientes.

REFERENCIAS

Hedman CA, Lindstrom T, Arnqvist HJ (2001) Direct comparison of insulin lispro and aspart shows small differences in plasma insulin profiles after subcutaneous injection in type 1 diabetes. *Diabetes Care* 24:1120-1121

Heise T, Nosek L, Biilmann Ronn B, Endahl L, Heinemann L, Kapitza C, Draeger E (2004) Lower Within-Subject Variability of Insulin Detemir in Comparison to NPH Insulin and Insulin Glargine in People With Type 1 Diabetes. *Diabetes* 53:1614-1620

Lindstrom T, Hedman CA, Arnqvist HJ (2002) Use of a novel double-antibody technique to describe the pharmacokinetics of rapid-acting insulin analogs. *Diabetes Care* 25:1049-1054

USO PROPOSTO

Mercodia Iso-Insulin ELISA fornisce un metodo per la determinazione quantitativa dell'insulina umana nel siero o nel plasma.

RELAZIONE

L'insulina è il principale ormone responsabile del controllo di glucosio nel metabolismo. E' sintetizzata nelle cellule delle isolette di Langerhans come il precursore, proinsulina, che è elaborato per formare la peptide C e l'insulina. Entrambi sono secreti in una somma equimolare nel portale della circolazione. La molecola matura dell'insulina comprende due catene di polipeptide, la catena A e la catena B (rispettivamente 21 e 30). Le due catene sono legate insieme da due ponti concatenati disolfidici. C'è anche un ponte disolfidico intercatenato nella catena A.

La secrezione dell'insulina è principalmente controllata dalla concentrazione di glucosio nel plasma, e l'ormone ha un significativo numero di azioni metaboliche. La sua funzione principale è di controllare il condotto e l'utilizzazione del glucosio nei tessuti periferici tramite il vettore del glucosio.

Questa e le altre attività ipoglicemiche, per esempio l'inibizione di glicogenesi e glicogenolisi sono mitigate dagli ormoni iperglicemici inclusi il glucagone, l'epinefrina (adrenalina), la crescita degli ormoni e cortisolo.

Le concentrazioni di insulina sono ridotte drasticamente nei pazienti di diabete melito insulina dipendenti (IDDM) e in altre condizioni come l'ipopituitarismo. I livelli di insulina sono aumentati nei pazienti di diabete melito non insulina dipendenti (NIDDM), di obesità, insulinoma e alcune disfunzioni endocrine come la sindrome di Cushing e l'acromegalia.

PRINCIPIO DI PROCEDURA

Mercodia Iso-Insulin ELISA, è una fase concreta dell'immunoanalisi enzima due-sito. E' basata sulla tecnica diretta sandwich nella quale due anticorpi monoclonali sono diretti contro determinanti antigenici separati sulla molecola insulina. Durante l'incubazione la insulina nella reazione del campione con anticorpi anti insulina de coniugati a perossidasi e anticorpi anti insulina de diretto microtitrazione nei pozzetti. Un leggero lavaggio rimuovi indirettamente l'anticorpo Enzyme marcato. Il Conjugate diretto è scoperto dalla reazione con 3,3',5,5'-tetrametbenzidine (TMB). La reazione è fermata aggiungendo acido per dare una posizione estrema colorimetrica che è letta spettrometricamente.

PRECAUZIONI E AVVISI

- Per l'uso diagnostico *in vitro*.
- I contenuti di questo kit e i suoi residui non devono essere ammessi al contatto con animali ruminanti o suini.
- La Stop Solution in questo kit contiene 0.5 M H_2SO_4 . Seguire le precauzioni quotidiane di routine per maneggiare sostanze chimiche pericolose.
- Tutti i pazienti presi come campione potrebbero essere trattati come capaci di trasmettere infezioni.

MATERIALI RICHIESTI MA NON INCLUSI

- Pipette per 25, 50 e 200 µL (riutilizza le pipette in dotazione per l'aggiunta della soluzione enzima coniugato, Substrate TMB e Stop Solution).
- Beakers e cilindri per la preparazione di reagenti.
- Acqua ridistillata.
- Lettore micro piastra (450 nm filtro).
- Piastra dello shaker (La velocità raccomandata è di 700-900 giri/minuto, movimento orbitale).
- Micro piastra piano di lavaggio.

REAGENTI

Ogni kit Mercodia Iso-Insulin ELISA contiene reagenti per 96 prove, sufficienti per 43 campioni e una calibratura curva in duplicato. Per diverse serie di analisi, usare reagenti provenienti da scatole portanti identici numeri di lotto. La data di scadenza del kit completo è stabilita sull'etichetta all'esterno. Si raccomanda di conservare ad una temperatura di 2–8°C.

Coated Plate topo monoclonale anti insulina. Per le strisce di microtitolazione non utilizzati, sigillare nuovamente la confezione con nastro adesivo e conservare a 2–8°C per 8 settimane.	1 piastra	96 pozzetti 8 strips de pozzetti	Pronti per l'uso
Calibrators 1, 2, 3, 4 Giallo colore codificato. Concentrazione indicata sull'etichetta della fiala.	4 fiale	1000 µL	Pronti per l'uso
Calibrator 0 Giallo colore codificato.	1 fiala	5 mL	Pronti per l'uso
Enzyme Conjugate11X Peroxidasi Conjugate topo monoclonale anti insulina.	1 fiala	600 µL	Per la preparazione vedi sotto
Enzyme Conjugate Buffer Blu colore codificato.	1 fiala	6 mL	Pronti per l'uso
Wash Buffer 21X Conservazione dopo la diluizione: 2-8 °C per 8 settimane.	1 bottiglia	50 mL	Diluir con 1000 mL d'acqua ridistillata per fare diluenti la soluzione de wash buffer 1X.
Substrate TMB Solución incolora <i>Nota! Sensibile alla luce!</i>	1 fiala	22 mL	Pronti per l'uso
Stop Solution 0.5 M H ₂ SO ₄	1 fiala	7 mL	Pronti per l'uso

Preparazione della soluzione enzyme conjugate 1X

Preparare la quantità necessaria della enzyme conjugate 1X con la diluizione dell'Enzyme Conjugate 11X, (1+10) nel Enzyme Conjugate Buffer in base alla tabella sottostante. Quando si prepara la soluzione enzyme conjugate 1X per tutta la piastra, versare tutto il tampone Enzyme Conjugate Buffer nella fiala dell'Enzyme Conjugate 11X. Mescolare lievemente.

Numero de strisce	Enzyme Conjugate 11X	Enzyme Conjugate Buffer
12 strisce	1 fiala	1 fiala
8 strisce	350 µL	3.5 mL
6 strisce	350 µL	2.5 mL
4 strisce	200 µL	2.0 mL

Conservazione dopo la diluizione: 2-8°C per 8 settimane.

LA RACCOLTA E IL TRATTAMENTO DEL MODELLO

Il siero

Il prelievo in vena di sangue, permette di coagulare, e separare il siero con la centrifugazione. I campioni possono essere conservati a 2-8°C fino a 24 ore. Per periodi più lunghi, conservare i campioni a -20°C. Evitare di ripetere il congelamento e lo scongelamento.

Plasma

Prelevare il sangue direttamente in vena in provette contenenti eparina o EDTA come anticoagulante, e separare la frazione del plasma. I campioni possono essere conservati a 2-8°C fino a 24 ore. Per periodi più lunghi conservare i campioni a -20°C. Evitare di ripetere il congelamento e lo scongelamento.

Preparazione dei campioni

La diluizione non è normalmente richiesta, comunque, i campioni contenenti >100 mU/L dovrebbero essere diluiti 1/10 v/v con Calibrator 0.

PROCEDIMIENTO DE EVALUACIÓN

Tutti i reagenti e i campioni devono essere portati a temperatura ambiente prima dell'uso. Preparare una calibratura curva per ciascuna di analisi.

1. Preparar di soluzione enzyme conjugate 1X y di soluzione wash buffer 1X.
2. Preparare sufficienti pozzetti nelle micropiastre a comporre Calibrators e campioni in duplice copia.
3. Pipette 25 μ L per ogni Calibrators e campioni in appropriati pozzetti.
4. Aggiungere 50 μ L di soluzione enzyme conjugate 1X per ogni pozzetto.
5. Mettere in incubatrice in una piastra shaker (700-900 rpm) per un'ora a temperatura ambiente (18–25°C).
6. Lavare 6 volte con 700 μ L di soluzione wash buffer 1X per pozzetto usando un lavatore automatico per piastre con la funzione traboccare-lavare. Dopo il lavaggio finale, capovolgere la piastra e picchiettarla con decisione contro della carta assorbente. Nella procedura di lavaggio non utilizzare la funzione immersione.
O manualmente,
Eliminare il volume di reazione capovolgendo la micropiastre su un lavabo. Aggiungere 350 μ L di soluzione wash buffer 1X ad ogni pozzetto. Eliminare la soluzione wash buffer 1X, sbattere con forza diverse volte contro carta assorbente per rimuovere il liquido in eccesso. Ripetere 5 volte. Evitare prolungate pause di immersione durante la procedura di lavaggio.
7. Aggiungere 200 μ L Substrate TMB.
8. Mettere in incubatrice per 15 minuti a temperatura ambiente (18–25°C).
9. Aggiungere 50 μ L di Stop Solution ad ogni pozzetto.
Mettere la piastra in uno shaker per approssimativamente per 5 secondi per garantire la miscelazione.
10. Leggere l'assorbività a 450 mn e calcolare i risultati.
Leggere entro 30 minuti.

Nota! Per evitare qualsiasi contaminazione tra coniugato e substrato devono essere usate pipette distinte.

CONTROLLO DI QUALITA' INTERNO

I controlli commerciali tale come il Mercodia Diabetes Antigen Control (codifica No. 10-1134-01/10-1164-01) e/o il siero interno proveniente da diversi donatori con basse, intermedie e alte concentrazioni di insulina dovrebbero essere analizzate periodicamente come se fossero esterne, e i risultati tracciati di giorno in giorno. E' buona norma di un laboratorio registrare i seguenti dati per ciascuna analisi: un certo numero di kit, una ricostituzione dei dati e dei componenti del kit, i valori di OD per il modulo, Calibrature e controlli.

IL CALCOLO DEI RISULTATI

Calcolo computerizzato

La riduzione dei dati computerizzati dell'assorbenza per le Calibrators, eccetto il Calibrator 0, contro la concentrazione usando un regressione cubica flessibile potrebbe essere effettuata per ottenere la concentrazione di insulina.

Il Calcolo manuale

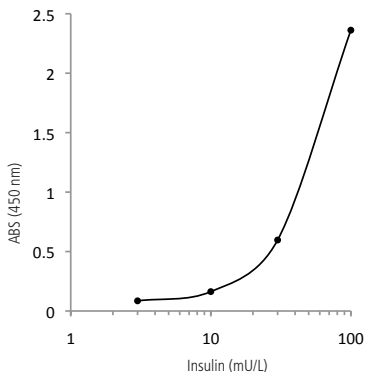
1. Tracciare i valori di assorbenza ottenuti per le Calibrators, eccetto il Calibrator 0, contro la concentrazione di insulina su una carta millimetrata lin-log e costruire una curva di calibrazione.
2. Leggere la concentrazione dei campioni sconosciuti dalla calibratura curva.

Pozzetti	Identità	A ₄₅₀	Conc. princ. mU/L
1A-B	Calibrator 0	0.066/0.067	
1C-D	Calibrator 1*	0.084/0.087	
1E-F	Calibrator 2*	0.161/0.165	
1G-H	Calibrator 3*	0.595/0.599	
2A-B	Calibrator 4*	2.377/2.347	
2C-D	Campioni 1	0.270/0.272	16.4
2E-F	Campioni 2	1.146/1.192	53.6
2G-H	Campioni 3	2.044/2.150	92.7

*Concentrazione indicata sull'etichetta della fiala.

Esempio di una calibratura curva

Una calibratura rappresentativa è mostrata qui. Non usare questa curva per determinare i risultati attuali delle analisi.



LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

Come tutti i test diagnostici, una diagnosi clinica definitiva non dovrebbe essere basata sui risultati di un singolo test, ma dovrebbe essere fatto medico dopo averne valutate le conclusioni cliniche. L'applicazione di questo test su individui già sottoposti a terapie di insulina è ostacolato dalla formazione di anticorpi anti-insulina, in grado di interferire nell'analisi.

Grossolanamente campioni lipemici, itterici o hemolysed non interferiscono nell'analisi.

VALORI PREVISTI

E' buona norma e pratica di ogni laboratorio stabilire una serie del tutto sua di presunti valori. I seguenti risultati potrebbero servire come guida fino a che il laboratorio abbia raccolto dati sufficienti del tutto suoi.

Studi a confronto tra Mercodia Iso -Insulin ELISA e Mercodia Insulin ELISA, sono stati eseguiti con 90 campioni. I valori ottenuti mostrano una buona correlazione tra le due tecniche, $r=0.98$.

Pertanto, i valori attesi per Mercodia Insulin ELISA possono essere usati anche per Mercodia Iso-Insulin ELISA.

I livelli di digiuno in media di 137 esaminati, individui apparentemente sani, erano 10 mU/L, una mediana di 7 mU/L e una serie corrispondente al centrale 95% delle osservazioni, di 2–25 mU/L.

CARATTERISTICHE E ESECUZIONE

Il limite della scoperta

Il limite della scoperta è 1 mU/L calcolato come due deviazioni standard sopra della Calibrator 0.

Riacquisto

Il siero: Il riacquisto sull'aggiunta è 101%

Hook effect

I campioni con una concentrazione sopra i 2000 mU/L può essere analizzata senza dare falsamente bassi risultati.

Precisione

Ogni campione è stato analizzato su 4 riprodotti in 8 diversi momenti.

Campioni	Valor principale mU/L	Coefficiente di variazione		
		Nell' analisi %	Fra analisi %	Totale analisi %
1	15.9	3.0	3.9	4.9
2	53.2	2.8	3.0	4.1
3	90.9	3.2	3.0	4.4

Specificità

Insulina	100%
Insulina lispro (Humalog®, Eli Lilly)	89%
Insulina aspart	80%
Insulin detemir	22%
Insulin glargin	44%
Insulin glulisine	100%
C-peptide	< 0.1%
Proinsulina	54%
Proinsulina des (31-32)	58%
Proinsulina split (32-33)	56%
Proinsulina des (64-65)	66%
Proinsulina split (65-66)	78%
IGF-I	< 0.02%
IGF-II	< 0.02%
Insulina di ratta	71%
Insulina di topo	49%
Insulina porcino	306%
Insulina di pecora	131%
Insulina bovino	58%

CALIBRATURA

Il kit Mercodia Iso-Insulin ELISA è calibrato contro i Riferimenti 1st International Reference Preparation 66/304 for human insulin.

IL FATTORE DI CONVERSIONE

1 µg/L = 29 mU/L; 1 mU/L = 6.0 pmol/L

GARANZIA

I dati dei rendimenti presentati qui sono stati ottenuti usando le procedure indicate. Qualsiasi cambiamento o modifica nella procedura non raccomandata da Mercodia AB possono avere effetti su i risultati, nel caso in cui Mercodia rinunci al diritto tutte le garanzie espresse, implicite o fissate, inclusa la garanzia implicita per l'uso commerciale e appropriato.

Mercodia AB e i suoi distributori autorizzati, in tal caso, non sarà soggetto a danni indiretti o consequenziali.

RIFERIMENTI

Hedman CA, Lindstrom T, Arnqvist HJ (2001) Direct comparison of insulin lispro and aspart shows small differences in plasma insulin profiles after subcutaneous injection in type 1 diabetes. *Diabetes Care* 24:1120-1121

Heise T, Nosek L, Biilmann Ronn B, Endahl L, Heinemann L, Kapitza C, Draeger E (2004) Lower Within-Subject Variability of Insulin Detemir in Comparison to NPH Insulin and Insulin Glargine in People With Type 1 Diabetes. *Diabetes* 53:1614-1620

Lindstrom T, Hedman CA, Arnqvist HJ (2002) Use of a novel double-antibody technique to describe the pharmacokinetics of rapid-acting insulin analogs. *Diabetes Care* 25:1049-1054

TILSIGTET ANVENDELSE

Mercodia Iso-Insulin ELISA er en metode til kvantitativ bestemmelse af humant insulin i serum eller plasma.

OVERSICHT OG FORKLARING AF ANALYSEN

Insulin er det vigtigste hormon i forbindelse med styring af glukosemetabolismen. Det syntetiseres i β -cellerne i de langerhanske øer ligesom forløberen, proinsulin, der behandles for at danne C-peptid og insulin. De udskilles begge i ækvimolære mængder i portal cirkulation. Det modne insulinmolekyle består af to polypeptid-kæder, A-kæden og B-kæden (med henholdsvis 21 og 30 aminosyrer). De to kæder kædes sammen af to disulfid-broer mellem kæderne. Der er også en kædeintern disulfid-bro i A-kæden.

Insulinudskillelsen styres primært af glukosekoncentrationen i plasma, og hormonet har en række vigtige stofskiftefunktioner. Den primære funktion er at styre optagelsen og udnyttelsen af glukose i perifert væv via glukosetransporteren. Denne og andre hypoglykæmiske aktiviteter som f.eks. hæmningen af hepatisk glukoneogenese og glycogenolyse modvirkes af de hypeglykæmiske hormoner, herunder glukagon, epinephrin (adrenalin), væksthormon og cortisol.

Insulinkoncentrationer er kraftigt reduceret ved insulinafhængig diabetes mellitus (IDDM) og visse andre tilstande som f.eks. hypopituitarisme. Insulinkoncentrationen er forhøjet ved insulinafhængig diabetes mellitus (NIDDM), fedme, insulinoma og visse endokrine dysfunktioner som f.eks. Cushings syndrom og akromegali.

PRINCIP FOR PROCEDUREN

Mercodia Iso-Insulin ELISA er en tosidede solid phase-enzymimmunanalyse. Den er baseret på den direkte sandwich-teknik, hvor to monoklonale antistoffer rettes mod separate antigene determinanter på insulin-molekylet. Under inkubation reagerer insulin i prøven med peroxydase-konjugeret anti-insulin-antistofferne og anti-insulin-antistofferne, der er bundet til mikrotitreringsbrønden. En enkel skylning fjerner ubundet enzym-mærket antistof. Det bundne konjugat registreres ved reaktion med 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin (TMB). Reaktionen stoppes ved at tilsætte syre for at give et kolorimetrisk endepunkt, der aflæses spektrofotometrisk.

ADVARSLER OG FORHOLDSREGLER

- Til *in vitro*-diagnosticering.
- Indholdet af dette kit samt rester deraf må ikke komme i kontakt med drøvtyggende dyr eller svin.
- Stop Solution i dette kit indeholder 0.5 M H_2SO_4 . Overhold almindelige forholdsregler for håndtering af farlige kemikalier.
- Alle patientprøver skal håndteres som potentielt smittefarlige.

NØDVENDIGE, MEN IKKE MEDFØLGENDE MATERIALER

- Pipetter til 25, 50 og 200 µL (repetitionspipetter foretrækkes til tilsætning af enzyme-konjugateopløsning, Substrate TMB og Stop Solution).
- Bægerglas og målebægre til klargøring af reagenser.
- Redestilleret vand.
- Mikropladeaf læser (450 nm-filer).
- Rystebord (Anbefalet hastighed er 700-900 omdrejninger per minute, orbital bevægelse).
- Skylleanordning til mikroplader.

REAGENSER

Hvert Mercodia Iso-Insulin ELISA kit indeholder reagenser til 96 brønde, nok til 43 prøver og en kalibratorkurve i dublet. Til større analyseserier skal der bruges puljereagenser fra pakker med samme partinummer. Udløbsdatoen for hele sættet er angivet på den yderste etiket. Den anbefalede opbevaringstemperatur er 2–8°C.

Coated Plate Monoklonalt anti-insulin fra mus. Ved ubrugte mikrotiterpladebrønde skal posen genforsegles med klæbebånd. Opbevares ved 2–8°C og bruges inden for 8 uger.	1 plade	96 brønde Strimler med 8 brønde	Klar til brug
Calibrators 1, 2, 3, 4 Farvekodet gul. Koncentration angivet på hætteglasets etiket.	4 hætteglas	1000 µL	Klar til brug
Calibrator 0 Farvekodet gul.	1 hætteglas	5 mL	Klar til brug
Enzyme Conjugate 11X Peroxidas-konjugeret fra mus monoklonalt anti-insulin.	1 hætteglas	600 µL	Klargøring, se nedenfor
Enzyme Conjugate Buffer Farvekodet blå.	1 hætteglas	6 mL	Klar til brug
Wash Buffer 21X Opbevaring efter fortyndning: 2–8°C for 8 uger.	1 flaske	50 mL	Fortynd med 1000 mL redestilleret vand for at lave wash buffer 1X opløsning.
Substrate TMB Farveløs opløsning. <i>Bemærk! Lysfølsom!</i>	1 hætteglas	22 mL	Klar til brug
Stop Solution 0.5 M H ₂ SO ₄	1 hætteglas	7 mL	Klar til brug

Forberedelse af enzyme conjugate 1X opløsning

Klargør den påkrævede mængde enzyme conjugate 1X opløsning ved at fortynde Enzyme Conjugate 11X (1+10) i Enzyme Conjugate Buffer i henhold till tabellen nedenfor. Hvis der forberedes enzyme conjugate 1X opløsning til en hel plade, hæld hele indholdet af Enzyme Conjugate Buffer over i Enzyme Conjugate 11x røret. Bland forsigtigt.

Antal strimler	Enzyme Conjugate 11X	Enzyme Conjugate Buffer
12 strimler	1 hætteglas	1 hætteglas
8 strimler	350 µL	3.5 mL
6 strimler	250 µL	2.5 mL
4 strimler	200 µL	2.0 mL

Opbevaring efter fortynding: 2-8°C i 8 uger.

UDTAGNING OG HÅNTERING AF PRØVER

Serum

Tag blod ved venepunktur, lad det koagulere, og adskil serummet ved centrifugering. Prøver kan opbevares ved 2–8°C i op til 24 timer. Længere opbevaring skal ske ved –20°C. Undgå at nedfryse og optø af flere omgange.

Plasma

Tag blod ved venepunktur i rør med heparin eller EDTA som antikoagulant, og adskil plasmafraktionen. Prøver kan opbevares ved 2–8°C i op til 24 timer. Længere opbevaring skal ske ved –20°C. Undgå at nedfryse og optø af flere omgange.

Klargøring af prøver

Fortynding er normalt ikke nødvendigt, men prøver, der indeholder >100 mU/L, skal fortyndes 1/10 v/v med Calibrator 0.

TESTPROCEDURE

Alle reagenser og prøver bringes til stuetemperatur før brug. Lav en kalibratorkurve for hver analysekørsel.

1. Lav enzyme conjugate 1X opløsning og wash buffer 1X opløsning.
2. Klargør tilstrækkeligt med mikropladebrønde til Calibrators og prøver i dublet.
3. Pipetter 25 µL af både Calibrators og prøver i de relevante brønde.
4. Tilsæt 50 µL enzyme conjugate 1X opløsning i hver brønd.
5. Inkuber på et rystebord (700-900 rpm) i 1 time ved stuetemperatur (18–25°C).
6. Vask 6 gange med 700 µL wash buffer 1X opløsning per brønd, anvend en automatisk pladevasker med overflow funktion. Efter sidste skylning vendes og bankes pladen mod absorberende papir. Benyt ikke soak funktion i vaske proceduren.
Eller manuelt:
Bortkast væsken i pladen ved at vende den på hovedet over en vask. Tilsæt 350 µL wash buffer 1X opløsning til hver brønd. Bortkast wash buffer 1X opløsning, bank pladen flere gange mod absorberende papir for at fjerne overskydende væske. Gentag 5 gange.
Undgå at forlænge perioden hvor brøndene står med væske i løbet af vaskeperioden.
7. Tilsæt 200 µL Substrate TMB.
8. Inkuber i 15 minutter ved stuetemperatur (18–25°C).
9. Tilsæt 50 µL Stop Solution hver brønd.
Placer pladen på et rystebord i cirka 5 sekunder for at sikre blandingen.
10. Aflæs optisk densitet ved 450 nm, og beregn resultaterne.
Aflæs inden for 30 minutter.

Obs! For at forhindre kontermination mellem konjugatet og substratet, anbefales det at anvende særskilte pipetter.

INTERN KVALITETSKONTROL

Kommercielle Kontroller som f.eks. Mercodia Diabetes Antigen Control (Kodenr. 10-1134-01/10-1164-01) og/eller interne serumpuljer med lave, mellem og høje insulin-koncentrationer skal regelmæssigt analyseres som prøver, og resultaterne afbildes fra dag til dag. Det er god laboratoriepraksis at registrere følgende data for hver analyse: sættets partinummer; rekonstitueringsdatoer for sættets komponenter; OD-værdier for blindprøver, Calibrators og kontrolprøver.

BEREGNING AF RESULTATER

Computerberegning

Computerstyret datareduktion af absorbansen for Calibrators, bortset fra Calibrator 0, i forhold til koncentration ved hjælp af cubic spline-regression skal udføres for at opnå koncentrationen af insulin.

Manuel beregning

1. Plot de absorbansværdier, der er opnået for Calibrators, bortset fra Calibrator 0, mod insulin-koncentrationen på lin-log papir, og tegn en kalibratorkurve.
2. Aflæs koncentrationen for de ukendte prøver fra kalibratorkurven.

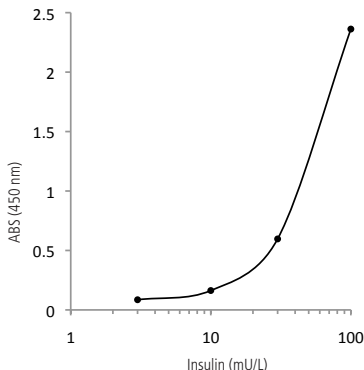
Eksempel på resultater

Brønde	Identitet	A ₄₅₀	Gennemsnit konc. mU/L
1A–B	Calibrator 0	0.066/0.067	
1C–D	Calibrator 1*	0.084/0.087	
1E–F	Calibrator 2*	0.161/0.165	
1G–H	Calibrator 3*	0.595/0.599	
2A–B	Calibrator 4*	2.377/2.347	
2C–D	Prøve 1	0.270/0.272	16.4
2E–F	Prøve 2	1.146/1.192	53.6
2G–H	Prøve 3	2.044/2.150	92.7

*Koncentration angivet på hætteglassets etiket.

Eksempel på kalibratorkurve

Der vises en typisk kalibratorkurve. Brug ikke denne kurve til at bestemme faktiske analyseresultater.



PROCEDURENS BEGRÆNSNINGER

Som ved alle diagnosticeringsanalyser må en definitiv klinisk diagnose ikke baseres på resultatet af en enkelt analyse, men skal foretages af lægen, efter at alle kliniske resultater er blevet bedømt. Anvendelsen af denne test på individer, der allerede er i insulinbehandling, kompliceres af dannelse af anti-insulin-antistoffer, der kan forstyrre analysen.

Stærkt lipæmiske, ikteriske eller hæmolyserede prøver forstyrre ikke analysen.

FORVENTEDE VÆRDIER

God praksis foreskriver, at hvert laboratorium fastlægger sine egne intervaller for forventede værdier. Følgende resultater kan fungere som en vejledning, indtil laboratoriet selv har indsamlet tilstrækkelige data.

Sammenlignende undersøgelser mellem Mercodia Iso-Insulin ELISA og Mercodia Insulin ELISA er blevet udført med 90 prøver. De opnåede værdier viser en god korrelation mellem de to teknikker, $r=0.98$.

Dermed kan de forventede værdier for Mercodia Insulin ELISA også bruges til Mercodia Iso-Insulin ELISA.

Gennemsnitlige fasteniveauer for 137 testede, tilsyneladende sunde individer var på 10 mU/L, en medianværdi på 7 mU/L og et interval, der svarer til de midterste 95% af observationerne, på 2–25 mU/L.

YDEEVNE

Registreringsgrænse

Registreringsgrænsen er 1 mU/L, beregnet som to standardafvigelse over Calibrator 0.

Genfinding

Serum: Genfinding efter tilsætning er 101%.

Hook-effekt

Prøver med en koncentration på op til 2000 mU/L kan måles uden at få falsk lave resultater.

Nøjagtighed

Hver prøve analyseres 4 gange ved 8 forskellige lejligheder.

Prøve	Gennemsnit mU/L	Variationskoefficient		
		inden for analyse %	mellem analyse %	samlet analyse %
1	15.9	3.0	3.9	4.9
2	53.2	2.8	3.0	4.1
3	90.9	3.2	3.0	4.4

Specificitet

Insulin	100%
Insulin lispro (Humalog®, Eli Lilly)	89%
Insulin aspart	80%
Insulin detemir	22%
Insulin glargin	44%
Insulin glulisine	100%
C-peptid	< 0.1%
Proinsulin	54%
Proinsulin des (31-32)	58%
Proinsulin split (32-33)	56%
Proinsulin des (64-65)	66%
Proinsulin split (65-66)	78%
IGF-I	< 0.02%
IGF-II	< 0.02%
Rotteinsulin	71%
Musinsulin	49%
Svininsulin	306%
Fårinsulin	131%
Bovine insulin	58%

KALIBRERING

Mercodia Iso-Insulin ELISA kittet er kalibreret mod den 1st International Reference Preparation 66/304 for human insulin.

KONVERTERINGSFAKTOR

1 µg/L = 29 mU/L; 1 mU/L = 6.0 pmol/L

GARANTI

De angivne ydeevnedata blev opnået ved af den angivne fremgangsmåde. Alle ændringer af fremgangsmåden, der ikke anbefales af Mercodia AB, kan påvirke resultaterne, og i dette tilfælde ophæver Mercodia AB alle garantier, det være sig udtrykkelige, stiltiende eller lovbestemte, herunder den stiltiende garanti for salgbarhed og egnethed til et bestemt formål.

I et sådant tilfælde kan Mercodia AB og dennes autoriserede distributører ikke drages til ansvar for indirekte skader eller følgeskader.

REFERENSER

Hedman CA, Lindstrom T, Arnqvist HJ (2001) Direct comparison of insulin lispro and aspart shows small differences in plasma insulin profiles after subcutaneous injection in type 1 diabetes. *Diabetes Care* 24:1120-1121

Heise T, Nosek L, Biilmann Ronn B, Endahl L, Heinemann L, Kapitza C, Draeger E (2004) Lower Within-Subject Variability of Insulin Detemir in Comparison to NPH Insulin and Insulin Glargine in People With Type 1 Diabetes. *Diabetes* 53:1614-1620

Lindstrom T, Hedman CA, Arnqvist HJ (2002) Use of a novel double-antibody technique to describe the pharmacokinetics of rapid-acting insulin analogs. *Diabetes Care* 25:1049-1054

ANVÄNDNING

Mercodia Iso-Insulin ELISA är ett *in vitro*-test för kvantitativ bestämning av humant insulin i serum och plasma.

SAMMANFATTNING

Insulin är det hormon som reglerar glukosmetabolismen i kroppen. Det syntetiseras av β -cellerna i bukspottkörteln via ett förstadium, proinsulin, som omvandlas till insulin genom avspjälkning av C-peptiden. Båda utsöndras i ekvimolära mängder i portablodet. Den mogna insulinmolekylen innefattar två polypeptidkedjor, A-kedjan och B-kedjan (21 respektive 30 aminosyror). De två kedjorna är sammankopplade genom två disulfidbryggor mellan kedjorna. Det finns även en disulfidbrygga inom A-kedjan.

Utöndring av insulin kontrolleras huvudsakligen av koncentrationen av plasmaglukos, och hormonet har ett antal viktiga metaboliska aktiviteter. Den viktigaste är att kontrollera upptagningen och användningen av glukos i perifera vävnader via glukotransportören. Denna och andra hypoglykemiska aktiviteter, såsom inhibering av hepatisk glukoneogenes och glykogenolys motverkas av de hyperglykemiska hormonerna som innefattar glukagon, epinefrin (adrenalin), tillväxthormon och cortisol.

Vid typ I-diabetes (insulinberoende diabetes, IDDM) saknas i princip insulin. Insulinnivån i serum är mycket låg och ökar inte vid stimulering med glukos. Vid hypopituitarism är insulinnivåerna likaledes mycket låga. Däremot finner man vid typ II-diabetes (äldersdiabetes, NIDDM) ofta normala eller t.o.m. ökade insulinnivåer. Förhöjda insulinnivåer föreligger ofta vid fetma, insulinom och vissa endokrina dysfunktioner såsom Cushings syndrom och akromegali.

TESTPRINCIP

Mercodia Iso-Insulin ELISA är en fast fas enzym immunoassay som baserar sig på "sandwich"-tekniken med två monoklonala antikroppar som är riktade mot separata antigena determinanter på insulinmolekylen. Under inkubation reagerar insulinet i provet med peroxidaskonjugerade anti-insulinantikroppar och anti-insulinantikroppar bundna till en mikrotiterbrunn. En enkel tvätt avlägsnar obunden enzyminmärkt antikropp. Det bundna konjugatet detekteras genom reaktion med 3,3',5,5'-tetrametylbensidin (TMB). Enzymreaktionen avläses spektrofotometriskt efter att ha stoppats genom tillsats av syra.

SÄKERHETSÅTGÄRDER

- För *in vitro* diagnostiskt bruk.
- Innehållet i detta kit eller rester av det får inte komma i kontakt med idisslande djur eller svin.
- Stop Solution i detta kit innehåller 0.5 M H_2SO_4 . Följ standardsäkerhetsåtgärder för hantering av farliga kemikalier.
- Alla patientprover skall hanteras som om de vore smittbärande.

MATERIAL SOM KRÄVS MEN EJ TILLHANDAHÅLLS

- Pipetter för 25, 50 och 200 µL (repeterbara pipetter är att föredra för tillsats av enzym-konjugatlösning, Substrate TMB och Stop Solution).
- Bägare och mätglas för iordningställande av reagens.
- Destillerat vatten.
- Mikrotiterplattläsare (450 nm filter).
- Plattskak (Rekommenderad hastighet är 700-900 varv per minut, orbital rörelse).
- Tvättutrustning för mikrotiterplattor.

REAGENSER

Varje Mercodia Iso-Insulin ELISA kit innehåller reagenser till 96 brunnar, tillräckligt många för 43 prov och en kalibratorkurva i duplikat. För större analysserier, använd sammanslagna reagenser från förpackningar med identiska lotnummer. Bäst före datumet för hela kitet står på ytteretiketten. Rekommenderad förvaringstemperatur är 2–8°C.

Coated Plate Monoklonalt mus-anti-insulin. För oanvända mikrotiterstrips, återförslut påsen med tejp. Förvara vid 2–8°C och använd inom 8 veckor.	1 platta	96 brunnar Strips med 8 brunnar	Färdig att användas
Calibrators 1, 2, 3, 4 Gul färgmärkning. Koncentrationen anges på etiketten.	4 flaskor	1000 µL	Färdig att användas
Calibrator 0 Gul färgmärkning.	1 flaska	5 mL	Färdig att användas
Enzyme Conjugate 11X Peroxidaskonjugerat monoklonalt mus-anti-insulin.	1 flaska	600 µL	Spädning enligt nedan
Enzyme Conjugate Buffer Blå färgmärkning.	1 flaska	6 mL	Färdig att användas
Wash Buffer 21X Förvaring efter spädning: 8 veckor vid 2–8°C.	1 flaska	50 mL	Späd med 1000 mL destillerat vatten för att bereda wash buffer 1X-lösning.
Substrate TMB Färglös vätska <i>Obs! Ljuskänslig!</i>	1 flaska	22 mL	Färdig att användas
Stop Solution 0.5 M H ₂ SO ₄	1 flaska	7 mL	Färdig att användas

Beredning av enzyme conjugate 1X-lösning

Gör i ordning önskad mängd enzyme conjugate 1X-lösning genom att späda ut Enzyme Conjugate 11X (1+10) i Enzyme Conjugate Buffer enligt tabellen nedan. Vid beredning av enzyme conjugate 1X-lösning till en hel platta, hälls hela innehållet av Enzyme Conjugate Buffer i flaskan med Enzyme Conjugate 11X. Blanda varsamt.

Antal strips	Enzyme Conjugate 11X	Enzyme Conjugate Buffer
12 strips	1 flaska	1 flaska
8 strips	350 µL	3.5 mL
6 strips	250 µL	2.5 mL
4 strips	200 µL	2.0 mL

Förvaring efter utspädning: 2-8°C i 8 veckor.

PROVTAGNING OCH HANTERING

Serum

Ta blod genom venpunktion, låt det koagulera, och separera serumet genom centrifugering. Prover kan förvaras vid 2-8°C i upp till 24 timmar. För längre tidsperioder, förvara proverna vid -20°C. Undvik upprepad frysning och upptining.

Plasma

Ta blod genom venpunktion i rör som innehåller heparin eller EDTA som motverkar koagulation och separera plasmadelen. Prover kan förvaras vid 2-8°C i upp till 24 timmar. För längre tidsperioder, förvara proverna vid -20°C. Undvik upprepad frysning och upptining.

Spädning av prover

Normalt sett behövs det ingen spädning, men prover som innehåller >100 mU/L bör spädas 1/10 v/v med Calibrator 0.

TESTETS UTFÖRANDE

Alla reagenser och prover måste rumstempereras före användning. En kalibratorkurva ska ingå i varje analys.

1. Bered enzyme conjugate 1X-lösning och wash buffer 1X-lösning.
2. Gör i ordning tillräckligt många mikrotiterplattbrunnar för att rymma duplikat av Calibrators och prover.
3. Pipettera 25 µL vardera av Calibrators och prover i lämpliga brunnar.
4. Tillsätt 50 µL enzyme conjugate 1X-lösning i varje brunn.
5. Inkubera på en plattskak (700-900 rpm) i 1 timme vid rumstemperatur (18–25°C).
6. Tvätta 6 gånger med 700 µL per brunn, använd en automatisk mikrotiterplatt-tvätt med overflow-funktion. Efter den sista tvätten vänds plattan upp och ned och knackas med stadig hand mot ett absorberande papper. Använd inte soak-funktion vid tvättproceduren.
Eller manuellt,
avlägsna reaktionslösningen genom att vända mikrotiterplattan upp och ner över en slask. Tillsätt 350 µL wash buffer 1X-lösning till varje brunn. Avlägsna wash buffer 1X-lösning, knacka plattan bestämt flera gånger på absorberande papper för att ta bort överfödig vätska. Upprepa 5 gånger. Undvik långvarig soak under tvättproceduren.
7. Tillsätt 200 µL Substrate TMB.
8. Inkubera i 15 minuter vid rumstemperatur (18–25°C).
9. Tillsätt 50 µL Stop Solution i varje brunn.
Placera plattan på en plattskak i ca 5 sekunder för att se till att lösningen blandas.
10. Avläs optisk densitet vid 450 nm och beräkna resultaten.
Avläs inom 30 minuter.

Obs! För att undvika kontamination rekommenderas att separata pipetter används för konjugat och substrat.

INTERN KVALITETSKONTROLL

Kommersiella kontroller såsom Mercodia Diabetes Antigen Control (Art nr. 10-1134-01/10-1164-01) och/eller interna kontrollprover med låga, mellan och höga insulinkoncentrationer bör regelmässigt analyseras som prover och resultaten bör kartläggas dag för dag. Det tillhör goda laboratorierutiner att anteckna följande uppgifter för varje test: kitets lotnummer, kitkomponenternas rekonstitutionsdatum, OD-värden för blankvärde, Calibrators och kontroller.

BERÄKNING AV RESULTATEN

Datorberäkning

Kalibreringskurva kan konstrueras genom att använda "cubic spline regression" med absorbansvärdena för Calibrators, förutom Calibrator 0, mot insulinkoncentrationen.

Manuell beräkning

1. Märk ut absorbansvärdena som erhålls för Calibrators, utan Calibrator 0, mot insulinkoncentrationen på ett lin-logpapper och konstruera en kalibratorkurva.
2. Avläs de provernas koncentration från kalibratorkurvan.

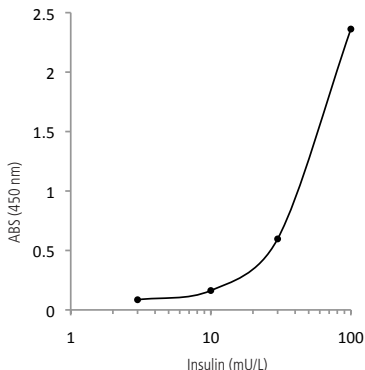
Exempel på resultat

Brunnar	Identitet	A ₄₅₀	Medelkonc. mU/L
1A–B	Calibrator 0	0.066/0.067	
1C–D	Calibrator 1*	0.084/0.087	
1E–F	Calibrator 2*	0.161/0.165	
1G–H	Calibrator 3*	0.595/0.599	
2A–B	Calibrator 4*	2.377/2.347	
2C–D	Prov 1	0.270/0.272	16.4
2E–F	Prov 2	1.146/1.192	53.6
2G–H	Prov 3	2.044/2.150	92.7

*Koncentrationen anges på flaskans etikett

Exempel på kalibratorkurva

En typisk kalibratorkurva visas här. Använd inte den här kurvan för att fastställa verkliga testresultat.



METODENS BEGRÄNSNINGAR

Liksom för alla andra diagnostiska tester, bör man inte basera en definitiv klinisk diagnos på resultaten från ett enskilt test. Diagnosen bör ställas av en läkare efter att alla kliniska fynd har utvärderats.

Det är svårare att tillämpa testet på individer som redan genomgår insulinbehandling på grund av bildning av anti-insulinantikroppar som kan påverka provresultatet.

Starkt lipemiska, ikteriska eller hemolyserade prover påverkar inte testresultatet.

FÖRVÄNTADE VÄRDEN

Det tillhör goda rutiner (good practice) att varje laboratorium skall etablera sin egen skala med förväntade värden. Följande resultat kan tjäna som en guide tills laboratoriet har samlat tillräckligt med egna uppgifter.

Jämförande studier mellan Mercodia Iso-Insulin ELISA och Mercodia Insulin ELISA har utförts med 90 prover. Värdena visade en bra korrelation mellan de två teknikerna, $r=0.98$.

Alltså kan de förväntade värdena från Mercodia Insulin ELISA användas även på Mercodia Iso-Insulin ELISA

Nivåer för 137 fastande, till synes friska testindivider, gav ett medelvärde på 10 mU/L, ett medianvärde på 7 mU/L och en spännvidd, som motsvarar de mittersta 95% av observationerna, på 2–25 mU/L.

ANALYTISKA PRESTANDA EGENSKAPER

Gräns för påvisbarhet

Detektionsgränsen är 1 mU/L beräknad som två standardavvikelser ovanför Calibrator 0.

Recovery

Recovery vid tillsats är 101%.

Hook-effekt

Prover med en koncentration på upp till 2000 mU/L kan mätas utan att visa felaktiga låga resultat.

Precision

Varje prov analyserades i 4 replikat vid 8 olika tillfällen.

Prov	Medelvärde mU/L	Variationskoefficient		
		inom testet %	mellan testet %	totalt testet %
1	15.9	3.0	3.9	4.9
2	53.2	2.8	3.0	4.1
3	90.9	3.2	3.0	4.4

Specificitet

Insulin	100%
Insulin lispro (Humalog®, Eli Lilly)	89%
Insulin aspart	80%
Insulin detemir	22%
Insulin glargin	44%
Insulin glulisine	100%
C-peptid	< 0.1%
Proinsulin	54%
Proinsulin des (31-32)	58%
Proinsulin split (32-33)	56%
Proinsulin des (64-65)	66%
Proinsulin split (65-66)	78%
IGF-I	< 0.02%
IGF-II	< 0.02%
Rättinsulin	71%
Musinsulin	49%
Grisinsulin	306%
Fårinsulin	131%
Bovint insulin	58%

KALIBRERING

Mercodia Iso-Insulin ELISA kit kalibreras mot 1st International Reference Reagent Preparation 66/304 for human insulin.

OMRÄKNINGSFAKTOR

1 µg/L = 29 mU/L; 1 mU/L = 6.0 pmol/L

GARANTI

De presenterade uppgifterna från utförandet erhöles med användning av påvisat förfarande. Förändringar eller modifieringar av förfarandet som inte rekommenderas av Mercodia AB kan påverka resultaten. I dessa fall fransäger sig Mercodia AB allt ansvar, underförstått såväl som lagstadgat, inklusive underförstådd säljbarhets- och användbarhetsgaranti.

Mercodia AB och deras auktoriserade distributörer skall i dessa fall inte hållas ansvariga för skador som orsakats indirekt eller som en konsekvens.

REFERENSER

Hedman CA, Lindstrom T, Arnqvist HJ (2001) Direct comparison of insulin lispro and aspart shows small differences in plasma insulin profiles after subcutaneous injection in type 1 diabetes. *Diabetes Care* 24:1120-1121

Heise T, Nosek L, Biilmann Ronn B, Endahl L, Heinemann L, Kapitza C, Draeger E (2004) Lower Within-Subject Variability of Insulin Detemir in Comparison to NPH Insulin and Insulin Glargine in People With Type 1 Diabetes. *Diabetes* 53:1614-1620

Lindstrom T, Hedman CA, Arnqvist HJ (2002) Use of a novel double-antibody technique to describe the pharmacokinetics of rapid-acting insulin analogs. *Diabetes Care* 25:1049-1054

**SUMMARY PROTOCOL SHEET/ZUSAMMENFASSUNG DES PROTOKOLLBLATTES/
FEUILLE DE PROTOCOLE RESUMEE/HOJA DE RESUMEN DEL PROTOCOLO/PROTO-
COLLO DI SINTESI/OVERSIGTSPROTOKOLARK/SAMMANFATTNINGSPROTOKOLL
Mercodia Iso-Insulin ELISA**

X-O Graf Tryckeri AB

Add Calibrators and samples Calibrators und Proben begeben Ajout de Calibrators et d'échantillons Añadir Calibrators y muestras Aggiungere Calibrators e campioni Tilsæt Calibrators og prøver Tillsätt Calibrators och prover	25 µL	Incubate 15 minutes at 18-25°C Inkubieren 15 Minuten bei 18-25°C Incubation 15 minutes à 18-25°C Incubar 15 min a 18-25°C Incubazione 15 minuti a 18-25°C Inkuber 15 min ved 18-25°C Inkubera 15 minuter vid 18-25°C
Add enzyme conjugate 1X solution Enzyme conjugate 1X Lösung beifügen Ajout solution d'enzyme conjugate 1X Añadir solución de la enzyme conjugate 1X Aggiungere di soluzione enzyme conjugate 1X Tilsæt enzyme conjugate 1X opløsning Tillsätt enzyme conjugate 1X-lösning	50 µL	Add Stop Solution 50 µL Shake for 5 sec to ensure mixing Stop Solution beifügen 50 µL Sicherstellen von Durchmischung 5 Sek. schütteln Ajout de Stop Solution 50 µL Secouer pendant 5 secondes pour bien mélanger Añadir Stop Solution 50 µL Agitar durante 5 segundos para ase-gurar el mezclado Aggiungere Stop Solution 50 µL Scuotere per 5 secondi per ass curarsi che sia tutto mescolato Tilsæt Stop Solution 50 µL Ryst i 5 sekunder for sikre blanding Tillsätt Stop Solution 50 µL Skaka i 5 sekunder för att se till att lösningen blandas
Incubate 1 hour at 18-25°C on a shaker Inkubieren 1 Stunde auf einem Schüttler bei 18-25°C Incubation 1 heure à 18-25°C sur un agitateur seoueur de plaques Incubar 1 hora a 18-25°C en un agitador de placas Incubazione 1 ora a 18-25°C in una piastra shaker Inkuber 1 time ved 18-25°C på et ryste-bord Inkubera 1 timme vid 18-25°C på en plattskak		
Wash 6 times Waschen 6 mal Rinçage 6 rinçages Lavar 6 veces Lavare 6 volte Vask 6 gange Tvätta 6 gånger		
Add Substrate TMB Substrate TMB begeben Ajout de Substrat TMB Añadir Substrate TMB Aggiungere Substrate TMB Tilsæt Substrate-TMB Tillsätt Substrate TMB	200 µL	Measure A450 Messung A450 Mesure de A450 Medir A450 Misura A450 Afäes A450 Mät vid A450