



INS-EASIA

KAP1251

LOT : 090508/1



Read entire protocol before use.

INS-EASIA

I. INTENDED USE

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

II. GENERAL INFORMATION

- A. **Proprietary name :** DIAsource INS-EASIA Kit
- B. **Catalogue number :** KAP1251 : 96 tests
- C. **Manufactured by :** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue de l'Industrie, 8, B-1400 Nivelles, Belgium.

For technical assistance or ordering information contact :
Tel : +32 (0)67 88.99.99 Fax : +32 (0)67 88.99.96

III. CLINICAL BACKGROUND

A *Biological activities of insulin*

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

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

B. *Clinical application of insulin determination*


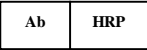
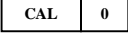
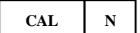



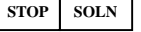
- . Determination of the beta-cell reserve during glucose tolerance test or after a carbohydrate rich meal, as a guide for the instauration of insulin therapy;
- . Contribution to the diagnosis of insulin and non-insulin-dependent diabetes;
- . Characterisation and follow-up of states of glucose intolerance;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

IV. PRINCIPLES OF THE METHOD

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

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

V. REAGENTS PROVIDED

Reagents	96 tests Kit	Color Code	Reconstitution
 Microtiterplate with 96 anti INS (monoclonal antibodies) coated breakable wells.	96 wells	blue	Ready for use
 Conjugate: HRP labelled anti-INS (monoclonal antibodies) in TRIS-HCl buffer with bovine serum albumin and thymol	1 vial 6 ml	red	Ready for use
 Zero calibrator in human serum and thymol	1 vial lyophilized	yellow	Add 2.0 ml distilled water
 Calibrator N = 1 to 5 (see exact values on vial labels) in human serum and thymol	5 vials lyophilized	yellow	Add 0.5 ml distilled water
 Wash Solution (Tris-HCl)	1 vial 10 ml	brown	Dilute 200 x with distilled water (use a magnetic stirrer).
 Controls - N = 1 or 2 in human serum with thymol	2 vials lyophilized	silver	Add 0.5 ml distilled water
 Chromogenic TMB Solution (Tetramethylbenzidine)	1 vial 12 ml	black	Ready for use
 Stop solution: HCl 1.0 N	1 vial 12 ml	white	Ready for use

Note: 1. Use the zero calibrator for sample dilutions.

2. 1 μ IU of the calibrator preparation is equivalent to 1 μ IU of 2nd IRP 66/304.

VI. SUPPLIES NOT PROVIDED

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

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

VII. REAGENT PREPARATION

- A. **Calibrators** : Reconstitute the zero calibrator with 2.0 ml distilled water and other calibrators with 0.5 ml distilled water.
- B. **Controls** : Reconstitute the controls with 0.5 ml distilled water.
- C. **Working Wash solution** : Prepare an adequate volume of Working Wash solution by adding 199 volumes of distilled water to 1 volume of Wash Solution (200x). Use a magnetic stirrer to homogenize. Discard unused Working Wash solution at the end of the day.

VIII. STORAGE AND EXPIRATION DATING OF REAGENTS

- § Before opening or reconstitution, all kits components are stable until the expiry date, indicated on the vial label, if kept at 2 to 8°C.
- § Unused wells must be stored, at 2-8°C, in a sealed bag containing a desiccant until expiration date.
- § After reconstitution, calibrators and controls are stable for 1 week at 2 to 8°C. For longer storage periods, aliquots should be made and kept at -20°C. Avoid successive freeze thaw cycles.
- § The concentrated Wash Solution is stable at room temperature until expiration date.
- § Freshly prepared Working Wash solution should be used on the same day.
- § After its first use, the conjugate is stable until expiry date, if kept in the original well-closed vial at 2 to 8°C.
- § Alterations in physical appearance of kit reagents may indicate instability or deterioration.

IX. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

- § Serum must be kept at 2 - 8°C.
- § If the test is not run within 24 hours, storage in aliquots at -20°C is recommended. Avoid subsequent freeze thaw cycles.
- § Prior to use, all samples should be at room temperature. It is recommended to vortex the samples before use.
- § Do not use haemolysed samples.

X. PROCEDURE

A. Handling notes

- Do not use the kit or components beyond expiry date.
- Do not mix materials from different kit lots.
- Bring all the reagents to room temperature prior to use.
- Thoroughly mix all reagents and samples by gentle agitation or swirling.
- Perform calibrators, controls and samples in duplicate. Vertical alignment is recommended.
- Use a clean plastic container to prepare the Wash Solution.
- In order to avoid cross-contamination, use a clean disposable pipette tip for the addition of each reagent and sample.
- For the dispensing of the Chromogenic Solution and the Stop Solution avoid pipettes with metal parts.

- High precision pipettes or automated pipetting equipment will improve the precision.
- Respect the incubation times.
- To avoid drift, the time between pipetting of the first calibrator and the last sample must be no longer than 30 minutes.
- Prepare a calibration curve for each run, do not use data from previous runs.
- Dispense the Chromogenic Solution within 15 minutes following the washing of the microtiterplate.
- During incubation with Chromogenic Solution, avoid direct sunlight on the microtiterplate.

B. Procedure

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

XI. CALCULATION OF RESULTS

- Read the plate at 450 nm against a reference filter set at 650 nm (or 630 nm).
- Calculate the mean of duplicate determinations.
- On semi-logarithmic or linear graph paper plot the OD values (ordinate) for each calibrator against the corresponding concentration of INS (abscissa) and draw a calibration curve through the calibrator points by connecting the plotted points with straight lines.
- Read the concentration for each control and sample by interpolation on the calibration curve.
- Computer assisted data reduction will simplify these calculations. If automatic result processing is used, a 4 parameter logistic function curve fitting is recommended.

XII. TYPICAL DATA

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

INS-EASIA		OD units Polychromatic model
Calibrator	0 µIU/ml	0.025
	5.1 µIU/ml	0.070
	13.8 µIU/ml	0.13
	44.4 µIU/ml	0.507
	128 µIU/ml	1.313
	250 µIU/ml	2.34

XIII. PERFORMANCE AND LIMITATIONS

A. Detection Limit

Twenty zero calibrators were assayed along with a set of other calibrators. The detection limit, defined as the apparent concentration two standard deviations above the average OD at zero binding, was 0.17 µIU/ml.

B. Specificity

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

Added analyte to a high value serum	Theoretical INS values (ng/ml)	Observed INS values (ng/ml)	Cross-reaction (%)
Porcine insulin	8 ng/ml	17.4	> 100
Bovine insulin	8 ng/ml	17.8	> 100
Dog insulin	16 ng/ml	17.2	81
Rabbit insulin	16 ng/ml	14.1	62
Rat insulin	16 ng/ml	3.7	0
Human proinsulin	32 ng/ml	4.4	0.3
Porcine proinsulin	16 ng/ml	4.7	2.5
Bovine proinsulin	16 ng/ml	4.4	0.6

C. Precision

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

SD : Standard Deviation; CV: Coefficient of variation

D. Accuracy

RECOVERY TEST

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

DILUTION TEST

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

Samples were diluted with zero calibrator.

E. Time delay between last calibrator and sample dispensing

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

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

F. Hook effect

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

XIV. INTERNAL QUALITY CONTROL

- § If the results obtained for Control 1 and/or Control 2 are not within the range specified on the vial label, the results cannot be used unless a satisfactory explanation for the discrepancy has been given.
- § If desirable, each laboratory can make its own pools of control samples, which should be kept frozen in aliquots.
- § Acceptance criteria for the difference between the duplo results of the samples should rely on Good Laboratory Practises
- § It is recommended that Controls be routinely assayed as unknown samples to measure assay variability. The performance of the assay should be monitored with quality control charts of the controls.
- § It is good practise to check visually the curve fit selected by the computer.

XV. REFERENCE INTERVALS

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

XVI. PRECAUTIONS AND WARNINGS

Safety

For *in vitro* diagnostic use only.

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

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

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

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

XVII. BIBLIOGRAPHY

1. FLIER, J.S., KAHN, C.R. and ROTH, J. (1979).
Receptors, antireceptor antibodies and mechanisms of insulin resistance.
N. Engl. J. Med., 300; 8:413-419.
2. FRIER, B.M., ASHBY, J.P., NAIRN, I.M. and BAIRS, J.D. (1981).
Plasma insulin, C-peptide and glucagon concentrations in patients with insulin-dependent diabetes treated with chlorpropamide.
Diab. Metab., 7;1:45-49.
3. JUDZEWITSCH, R.G., PFEIFER, M.A., BEST, J.D., BEARD, J.C., HALTER, J.B. and PORTE D.Jr. (1982).
Chronic chlorpropamide therapy of non-insulin-dependent diabetes augments basal and stimulated insulin secretion by increasing islet sensitivity to glucose.
J.Clin. End. and Metab., 55;2:321-328.
4. KOSAKA, K., HAGURA, R. and KUZUYA, T. (1977).
Insulin responses in equivocal and definite diabetes, with special reference to subjects who had mild glucose intolerance but later developed definite diabetes.
Diabetes, 26;10:944-952.
5. STARR, J.I., MAKO, M.E., JUHN, D. and RUBENSTEIN, A.H. (1978).
Measurement of serum proinsulin-like material : cross-reactivity of porcine and human proinsulin in the insulin radioimmunoassay.
J. Lab. Clin. Med., 91;4:691-692.
6. TEMPLE, R.C., CARRINGTON, C.A., LUZIO, S.D., OWENS, D.R., SCHNEIDER, A.E., SOBEY, W.J., HALES, C.N. (1989).
Insulin deficiency in non-insulin-dependent diabetes.
The Lancet, Feb.11:293-295.
7. TEMPLE, R.C., CLARK, P.M., NAGI, D.K., SCHNEIDER, A.E., YUDKIN, J.S., HALES, C.N. (1990).
Clin. Endocrin., 32:689-693.
8. TEMPLE, R.C., CLARK, P.M., HALES, C.N. (1992).
Measurement of insulin secretion in type 2 diabetes : problems and pitfalls.
Diabetic medicine, 9:503-512.

XVIII. SUMMARY OF THE PROTOCOL

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

DIAsource Catalogue Nr : KAP1251	P.I. Number : 1700433/en	Revision nr : 090508/1
-------------------------------------	-----------------------------	---------------------------

Revision date : 2009-05-08

Lire entièrement le protocole avant utilisation.

INS-EASIA

I. BUT DU DOSAGE

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

II. INFORMATIONS GENERALES

- A. **Nom du produit :** DIAsource INS-EASIA kit
- B. **Numéro de catalogue :** KAP1251 : 96 tests
- C. **Fabriqué par :** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue de l'Industrie, 8 B-1400 Nivelles Belgium.

Pour une assistance technique ou une information sur une commande :

Tel : +32 (0)67 88.99.99

Fax : +32 (0)67 88.99.96

III. CONTEXTE CLINIQUE

A. Activités biologiques de l'insuline

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

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

B. Application clinique du dosage de l'insuline




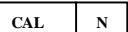
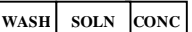
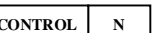
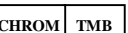
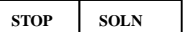
- Détermination des réserves des cellules β pendant le test de tolérance au glucose ou après un repas riche en hydrates de carbone, comme référence pour l'établissement de la thérapie à l'insuline;
- Contribution au diagnostic des diabètes d'insuline et non-insulino-dépendant;
- Caractérisation et suivi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

IV. PRINCIPES DU DOSAGE

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

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

V. REACTIFS FOURNIS

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

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

VI. MATERIELS NON FOURNIS

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

- Eau distillée d'une haute qualité
- Pipettes pour distribuer: 50 µl, 500 µl et 2 ml (l'utilisation de pipettes précises et de pointes en plastique est recommandée)
- Agitateur vortex
- Agitateur magnétique
- Laveur de micro-plaques
- Lecteur de micro-plaques capable de lire à 450 nm et 650 nm (lecture bichromatique)

VII. PREPARATION DES REACTIFS

- Calibrateurs** : Reconstituer le calibrateur zéro avec 2,0 ml d'eau distillée et les autres calibrateurs avec 0,5 ml d'eau distillée..
- Contrôles** : Reconstituer les contrôles avec 0,5 ml d'eau distillée.
- Solution de Lavage** : Préparer un volume adéquat de Solution de Lavage en ajoutant 199 volumes d'eau distillée à 1 volume de Solution de Lavage (200x). Utiliser un agitateur magnétique pour homogénéiser. Eliminer la Solution de Lavage non utilisée à la fin de la journée.

VIII. STOCKAGE ET DATE D'EXPIRATION DES REACTIFS

- § Avant l'ouverture ou la reconstitution, tous les composants de la trousse sont stables jusqu'à la date d'expiration, indiquée sur l'étiquette, si la trousse est conservée entre 2 et 8°C.
- § Des puits inutilisées doivent être gardées, à 2-8°C, dans un sachet cacheté contenant un desiccant jusqu'à la date d'expiration.
- § Après reconstitution, les calibrateurs et les contrôles sont stables pendant 7 jours entre 2 et 8°C. Pour de plus longues périodes de stockage, des aliquots devront être réalisés et ceux-ci seront gardés à -20°C pendant 3 mois. Eviter des cycles de congélation et décongélation successifs.
- § La Solution de Lavage concentrée est stable à température ambiante jusqu'à la date d'expiration.
- § La Solution de Lavage préparée doit être utilisée le jour même.
- § Après la première utilisation, le conjugué est stable jusqu'à la date d'expiration, si celui-ci est conservé entre 2 et 8°C dans le flacon d'origine correctement fermé.
- § Des altérations dans l'apparence physique des réactifs de la trousse peuvent indiquer une instabilité ou une détérioration.

IX. PREPARATION ET STABILITE DE L'ECHANTILLON

- § Les échantillons de sérum doivent être gardés entre 2 et 8°C.
- § Si le test n'est pas réalisé dans les 24 heures, un stockage en aliquots à -20°C est recommandé.
- § Eviter des cycles de congélation et décongélation successifs.
- § Avant l'utilisation des échantillons, ceux-ci doivent être à température ambiante. On recommande de vortexer les échantillons avant de les utiliser.
- § Ne pas utiliser d'échantillons hémolysés

X. MODE OPERATOIRE

A. Notes de manipulation

Ne pas utiliser la trousse ou ses composants après avoir dépassé la date d'expiration.
Ne pas mélanger du matériel provenant de trousse de lots différents.
Mettre tous les réactifs à température ambiante avant utilisation.
Mélangez tous les réactifs et les échantillons sous agitation douce.
Réaliser les calibrateurs, les contrôles et les échantillons en double. Un alignement vertical est recommandé.
Utiliser un récipient en plastic propre pour préparer la Solution de Lavage.
Pour éviter toute contamination croisée, utiliser une nouvelle pointe de pipette pour l'addition de chaque réactif et échantillon.
Pour la distribution de solution du chromogène et de la Solution d'arrêt, éviter des pipettes avec des parties en métal.

Des pipettes de haute précision ou un équipement de pipetage automatique permettent d'augmenter la précision.
Respecter les temps d'incubation.
Afin d'éviter des anomalies, le délai entre le pipetage du premier calibrateur et celui du dernier échantillon ne peut pas dépasser 30 minutes.
Préparer une courbe d'étalonnage pour chaque nouvelle série d'expériences, ne pas utiliser les données d'expériences précédentes.
Distribuer la solution du chromogène dans les 15 minutes après le lavage de la micro-plaque de titration.
Eviter exposition à la lumière du soleil lors de l'incubation avec la solution du chromogène.

B. Mode opératoire

- Sélectionner le nombre de puits nécessaires pour le test. Les puits inutilisées doivent être cachetées de nouveau dans le sachet avec un desiccant et gardées à 2-8°C.
- Placer les puits dans le support.
- Pipeter 50 µl de chaque Calibrateur, Contrôle et Echantillon dans les puits appropriés.
- Pipeter 50 µl du conjugué anti-INS-HRP dans tous les puits.
- Incuber pendant 30 minutes à température ambiante.
- Aspirer le liquide de chaque puits.
- Laver la plaque 3 fois en:
 - § distribuant 0.4 ml de la Solution de Lavage dans chaque puits
 - § aspirant le contenu de chaque puits
- Pipeter 100 µl de la solution chromogénique dans chaque puits dans les 15 minutes après la phase de lavage.

9. Incuber la micro-plaque pendant 15 minutes à température ambiante.
10. Pipeter 100 µl du Réactif d'arrêt dans chaque puits.
11. Lire les absorbances à 450 nm (filtre de référence 630 nm ou 650 nm) endéans l'heure et calculer les résultats comme décrits dans la section XI.

XI. CALCUL DES RESULTATS

1. Lire la plaque à 450 nm contre un filtre de référence mis à 650 nm (ou 630 nm).
2. Calculer la moyenne de chaque détermination réalisée en double.
3. Dessiner sur un graphique linéaire ou semi-logarithmique les cpm (ordonnées) pour chaque calibrateur contre la concentration correspondante en INS (abscisses) et dessiner une courbe de calibration à l'aide des points de calibration, en connectant les points avec des lignes droites.
4. Lire la concentration pour chaque contrôle et échantillon par interpolation sur la courbe de calibration.
5. L'analyse informatique des données simplifiera les calculs. Si un système d'analyse de traitement informatique des données est utilisé, il est recommandé d'utiliser la fonction « 4 paramètres » du lissage de courbes.

XII. DONNEES TYPES

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

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

XIII. PERFORMANCE ET LIMITES

A. Sensibilité

Vingt calibrateurs zéro ont été testés en parallèle avec un assortiment d'autres calibrateurs. La limite de détection, définie comme la concentration apparente située 2 déviations standards au-dessus de la moyenne DO déterminée à la fixation zéro, était de 0,17 µIU/ml.

B. Spécificité

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

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

C. Précision

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

SD : Déviation Standard; CV: Coefficient de variation

D. Exactitude

TEST DE RECUPERATION

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

TEST DE DILUTION

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

Les échantillons ont été dilués avec le calibrateur zéro.

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

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

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

F. Effet crochet

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

XIV. CÔNTROLE DE QUALITE INTERNE

- § Si les résultats obtenus pour le(s) contrôle(s) 1 et/ou 2 ne sont pas dans l'intervalle spécifié sur l'étiquette du flacon, les résultats ne peuvent pas être utilisés à moins que l'on ait donné une explication satisfaisante de la non-conformité.
- § Chaque laboratoire est libre de faire ses propres stocks d'échantillons contrôles, lesquels doivent être congelés aliquotés.
- § Les critères d'acceptation pour les écarts des valeurs in duplo des échantillons doivent être basés sur les pratiques de laboratoire courantes.
- § On recommande que les contrôles soient testés de façon routinière comme des échantillons inconnus pour mesurer la variabilité du test. La réalisation du test doit être suivie avec des fichiers de contrôle de qualité des contrôles.
- § On recommande de vérifier visuellement la courbe sélectionnée par l'ordinateur.

XV. VALEURS ATTENDUES

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

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

XVI. PRECAUTIONS ET AVERTISSEMENTS

Sécurité

Pour utilisation en diagnostic *in vitro* uniquement.

Les composants de sang humain inclus dans ce kit ont été évalués par des méthodes approuvées par l'Europe et/ou la FDA et trouvés négatifs pour HBsAg, l'anti-HCV, l'anti-HIV-1 et 2. Aucune méthode connue ne peut offrir l'assurance complète que des dérivés de sang humain ne transmettront pas d'hépatite, le sida ou toute autre infection. Donc, le traitement des réactifs, du sérum ou des échantillons de plasma devront être conformes aux procédures locales de sécurité. Tous les produits animaux et leurs dérivés ont été collectés d'animaux sains. Les composants bovins proviennent de pays où l'ESB n'a pas été détectée. Néanmoins, les composants contenant des substances animales devront être traités comme potentiellement infectieux.

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

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

XVII. BIBLIOGRAPHIE

- FLIER, J.S., KAHN, C.R. and ROTH, J. (1979).
Receptors, antireceptor antibodies and mechanisms of insulin resistance.
N. Engl. J. Med., 300; 8:413-419.
- FRIER, B.M., ASHBY, J.P., NAIRN, I.M. and BAIRS, J.D. (1981).
Plasma insulin, C-peptide and glucagon concentrations in patients with insulin-dependent diabetes treated with chlorpropamide.
Diab. Metab., 7;1:45-49.
- JUDZEWITSCH, R.G., PFEIFER, M.A., BEST, J.D., BEARD, J.C., HALTER, J.B. and PORTE D.Jr. (1982).
Chronic chlorpropamide therapy of non-insulin-dependent diabetes augments basal and stimulated insulin secretion by increasing islet sensitivity to glucose.
J.Clin. End. and Metab., 55;2:321-328.
- KOSAKA, K., HAGURA, R. and KUZUYA, T. (1977).
Insulin responses in equivocal and definite diabetes, with special reference to subjects who had mild glucose intolerance but later developed definite diabetes.
Diabetes, 26;10:944-952.
- STARR, J.I., MAKO, M.E., JUHN, D. and RUBENSTEIN, A.H. (1978).
Measurement of serum proinsulin-like material : cross-reactivity of porcine and human proinsulin in the insulin radioimmunoassay.
J. Lab. Clin. Med., 91;4:691-692.
- TEMPLE, R.C., CARRINGTON, C.A., LUZIO, S.D., OWENS, D.R., SCHNEIDER, A.E., SOBEY, W.J., HALES, C.N. (1989).
Insulin deficiency in non-insulin-dependent diabetes.
The Lancet, Feb.11:293-295.
- TEMPLE, R.C., CLARK, P.M., NAGI, D.K., SCHNEIDER, A.E., YUDKIN, J.S., HALES, C.N. (1990).
Clin. Endocrin., 32:689-693.
- TEMPLE, R.C., CLARK, P.M., HALES, C.N. (1992).
Measurement of insulin secretion in type 2 diabetes : problems and pitfalls.
Diabetic medicine, 9:503-512.

XVIII. RESUME DU PROTOCOLE

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

DIASource Catalogue Nr : KAP1251	P.I. Number : 1700433/fr	Revision nr : 090508/1
-------------------------------------	-----------------------------	---------------------------

Date de révision : 2009-05-08



Vor Gebrauch des Kits lesen Sie bitte diese Packungsbeilage.

INS-EASIA

I. VERWENDUNGSZWECK

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

II. ALLGEMEINE INFORMATION

- A. **Handelsbezeichnung :** DIAsource INS-EASIA Kit
- B. **Katalognummer :** KAP1251 : 96 Tests
- C. **Hergestellt von:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue de l'Industrie, 8, B-1400 Nivelles, Belgien.

Für technische Unterstützung oder Bestellungen wenden Sie sich bitte an:

Tel : +32 (0)67 88.99.99 Fax : +32 (0)67 88.99.96

Für Deutschland : Kostenfreie Rufnummer : 0800 1 00 85 74 - Kostenfreie Faxnummer : 0800 1 00 85 75

E-mail Ordering : ordering@diasource.be

III. KLINISCHER HINTERGRUND

A *Biologische Aktivitäten von Insulin*

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

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



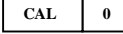
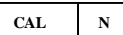

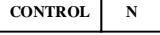
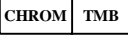
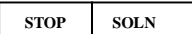
B. *Klinische Anwendung der Insulinbestimmung*

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

IV. GRUNDSÄTZLICHES ZUR DURCHFÜHRUNG

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

V. MITGELIEFERTE REAGENZIEN

Reagenzien	96 Test Kit	Farb Code	Rekonstitution
 Mikrotiterplatte mit 96 anti INS- beschichtete abbrechbaren Wells (monoklonale Antikörper)	96 Wells	blau	gebrauchsfertig
 Konjugat: MRP beschriebene Anti-INS (monoklonale Antikörper) in TRIS-HCl -puffer mit Rinderserum- albumin und Thymol	1 Gefäß 6 ml	Rot	gebrauchsfertig
 Null Kalibrator in Humanserum und Thymol	1 Gefäß lyophilisiert	Gelb	2.0 ml dest. Wasser zugeben
 Kalibrator - N = 1 to 5 (genaue Werte auf Gefäß-Etiketten) in Humanserum und Thymol	5 Gefäße lyophilisiert	Gelb	0.5 ml dest. Wasser zugeben
 Waschlösung (Tris-HCl)	1 Gefäß 10 ml	Braun	200 x mit dest. Wasser verdünnen (Magnetrührer benutzen).
 Kontrollen - N = 1 or 2 Humanserum und Thymol	2 Gefäße lyophilisiert	silber	0.5 ml dest. Wasser zugeben
 Chromogenes TMB (Tetramethylbenzidin)	1 Gefäß 12 ml	schwarz	gebrauchsfertig
 Stoppreagenz: HCl 1,0 N	1 Gefäß 12 ml	weiß	gebrauchsfertig

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

VI. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL

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

- Hochwertiges destilliertes Wasser
- Pipetten: 50 µl, 500 µl und 2 ml (Verwendung von Präzisionspipetten mit Wegwerf-Plastikspitzen wird empfohlen)
- Vortex Mixer
- Magnetrührer
- Waschgerät für Mikrotiterplatten
- Mikrotiterplatten-Lesegerät zur Auswertung bei 450 nm und 650 nm (Bichromatische Auswertung)

VII. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- Kalibratoren:** Rekonstituieren Sie den Null-Kalibrator mit 2.0 ml dest. Wasser, die anderen Kalibratoren mit 0.5 ml dest. Wasser.
- Kontrollen:** Rekonstituieren Sie die Kontrollen mit 0.5 ml dest. Wasser.
- Waschlösung:** Bereiten Sie ein angemessenes Volumen Waschlösung aus einem Anteil Waschlösung (200x) mit 199 Anteilen dest. Wasser zu. Verwenden Sie einen Magnetrührer zum gleichmäßigen Durchmischen. Verwerfen Sie die nicht benutzte Waschlösung am Ende des Tages.

VIII. AUFBEWAHRUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- § Vor dem Öffnen oder Rekonstitution sind die Reagenzien des Kits bis zum Ablaufdatum (Angaben auf Etikett) bei Lagerung bei 2°C bis 8°C stabil.
- § Nicht verwendete Wells sollten dicht in der Folie verschlossen mit Trockenmittel bei 2° bis 8°C gelagert werden bis zum Verfallsdatum.
- § Nach der Rekonstitution sind die Kalibratoren und Kontrollen bei 2°C bis 8°C 7 Tage stabil. Aliquots müssen bei längerer Aufbewahrung bei -20°C eingefroren werden, dan sind Sie 3 Monate haltbar. Vermeiden Sie wiederholtes Einfrieren und Auftauen.
- § Die konzentrierte Waschlösung ist bei Raumtemperatur bis zum Verfallsdatum haltbar.
- § Frisch zubereitete Waschlösung sollte am selben Tag benutzt werden.
- § Nach der ersten Benutzung ist das Konjugat bei Aufbewahrung im Originalgefäß und bei 2° bis 8° C bis zum Ablaufdatum stabil.
- § Veränderungen im Aussehen der Kitkomponenten können ein Anzeichen für Instabilität oder Zerfall sein.

IX. PROBENSAMMLUNG UND -VORBEREITUNG

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

X. DURCHFÜHRUNG

- Bemerkungen zur Durchführung**
Verwenden Sie den Kit oder dessen Komponenten nicht nach Ablaufdatum.
Vermischen Sie Materialien von unterschiedlichen Kit-Chargen nicht. Bringen Sie alle Reagenzien vor der Verwendung auf Raumtemperatur. Mischen Sie alle Reagenzien und Proben gründlich durch sanftes Schütteln oder Rühren.
Führen Sie Kalibratoren, Kontrollen und Proben doppelt aus. Vertikale Ausrichtung wird empfohlen.
Verwenden Sie zur Zubereitung der Waschlösung reinen Kunststoffbehälter.
Verwenden Sie saubere Wegwerf-Pipettenspitzen, um Kreuzkontamination zu vermeiden.
Verwenden Sie zur Pipettierung der chromogene Lösung und der Stopplösung keine Pipetten mit Metallteilen.
Präzisionspipetten oder ein automatisches Pipettiersystem erhöhen die Präzision.
Achten Sie auf die Einhaltung der Inkubationszeiten.
Zur Vermeidung eines Drifts dürfen zwischen der Pipettierung des ersten Kalibrators und der letzten Probe nicht mehr als 30 Minuten verstreichen.
Erstellen Sie für jeden Durchlauf eine Standardkurve, verwenden Sie nicht die Daten von früheren Durchläufen.
Pipettieren Sie die chromogene Lösung innerhalb von 15 Minuten nach dem Waschen der Mikrotiterplatte.
Während der Inkubation mit der chromogene Lösung ist die Mikrotiterplatte vor direktem Sonnenlicht zu schützen.

B. Durchführung

- Wählen Sie die erforderliche Anzahl der Wells für den Lauf aus. Nicht verwendete Wells sollten wieder dicht in der Folie verschlossen mit Trockenmittel bei 2° bis 8°C gelagert werden.
- Befestigen Sie die Wells im Halterahmen.
- Pipettieren Sie jeweils 50 µl Kalibrator, Kontrolle und Probe in die entsprechenden Wells.
- Pipettieren Sie 50 µl Anti-INS-MRP Konjugat in alle Wells.
- Inkubieren Sie 30 Minuten bei Raumtemperatur
- Saugen Sie die Flüssigkeit aus jedem Well ab.
- Waschen Sie die Platte dreimal:
 - § pipettieren Sie 0,4 ml Waschlösung in jeden Well
 - § saugen Sie der Inhalt jedes Wells ab
- Pipettieren Sie 100 µl der chromogene Lösung innerhalb von 15 Minuten nach dem Waschvorgang in jeden Well.

9. Inkubieren Sie die Mikrotiterplatte 15 Minuten bei Raumtemperatur.
10. Pipettieren Sie 100 µl des Stoppreagenzes in jeden Well.
11. Werten Sie die Absorptionen bei 450 nm (Referenzfilter 630 nm oder 650 nm) innerhalb 1 Stunde aus und berechnen Sie die Resultate wie in Abschnitt XI beschrieben.

XI. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

1. Werten Sie die Platte bei 450 nm gegen einen Referenzfilter auf 650 nm (oder 630 nm) aus.
2. Berechnen Sie den Durchschnitt aus den Doppelbestimmungen.
3. Tragen Sie auf semilogarithmischem oder linearem Millimeterpapier den c.p.m. (Ordinate) für jeden Standard gegen die entsprechende Konzentration INS (Abszisse) und zeichnen Sie eine Kalibrationskurve durch die Kalibrationspunkte, indem Sie die eingetragenen Punkte durch gerade Linien verbinden.
4. Berechnen Sie die Konzentration für jede Kontrolle und Probe durch Interpolation aus der Kalibrationskurve.
5. Computergestützte Methoden können ebenfalls zur Erstellung der Kalibrationskurve verwendet werden. Falls die Ergebnisberechnung mit dem Computer durchgeführt wird, empfehlen wir die Berechnung mit einer "4 Parameter"-Kurvenfunktion.

XII. TYPISCHE WERTE

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

INS-EASIA		OD Einheiten Polychromatisches Modell
Kalibrator	0 µIU/ml	0.025
	5.1 µIU/ml	0.070
	13.8 µIU/ml	0.13
	44.4 µIU/ml	0.507
	128 µIU/ml	1.313
	250 µIU/ml	2.34

XIII. LEISTUNGSMERKMALE UND GRENZEN DER METHODIK

A. Nachweisgrenze

Zwanzig Null-Kalibratoren wurden zusammen mit einem Satz anderer Kalibratoren gemessen. Die Nachweisgrenze, definiert als die scheinbare Konzentration bei zwei Standardabweichungen über dem gemessenen Durchschnittswert bei Nullbindung, entsprach 0,17 µIU/ml.

B. Spezifität

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

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

C. Präzision

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

SD : Standardabweichung; CV: Variationskoeffizient

D. Genauigkeit

WIEDERFINDUNGSTEST

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

VERDÜNNUNGSTEST

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

Die Proben wurden mit Null-Kalibrator verdünnt.

E. Zeitverzögerung zwischen letzter Kalibrator- und Probenzugabe

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

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

F. Hook-Effekt

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

XIV. INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE

- § Entsprechen die Ist-Werte nicht den auf den Fläschchen angegebenen Soll-Werten, können die Werte, ohne treffende Erklärung der Abweichungen, nicht weiterverarbeitet werden.
- § Falls zusätzliche Kontrollen erwünscht sind, kann jedes Labor seinen eigenen Pool herstellen, der in Aliquots eingefroren werden sollte.
- § Akzeptanzkriterien für die Differenz zwischen den Resultaten der Wiederholungstests anhand der Proben müssen auf Guter Laborpraxis beruhen.
- § Es wird empfohlen, Kontrollen im Assay routinemäßig wie unbekannte Proben zu behandeln, um die Assayvarianz zu messen. Die Leistung des Assay muss mit den Qualitätskontrollkarten der Kontrollen überprüft werden.
- § Es hat sich bewährt, die durch den Computer ausgewählte Kurvenanpassung visuell zu überprüfen.

XV. REFERENZINTERVALLE

Der Bereich des Insulinspiegels bei 29 Personen mit normalen Werten beim oralen Glukose-Toleranztest betrug 5 bis 19 µIU/ml, Bereich auf Basis der 2,5% und 97,5% percentile. Diese Werte sind nur Richtwerte; jedes Labor muss seinen eigenen Normalwertbereich ermitteln.

XV. VORSICHTMASSNAHMEN UND WARNUNGEN

Sicherheit

Nur für diagnostische Zwecke.

Die menschlichen Blutkomponenten in diesem Kit wurden mit europäischen und in USA erprobten FDA-Methoden getestet, sie waren negativ für HBsAG, anti-HCV und anti-HIV 1 und 2. Keine bekannte Methode kann jedoch vollkommene

Sicherheit liefern, dass menschliche Blutbestandteile nicht Hepatitis, AIDS oder andere Infektionen übertragen. Deshalb sollte der Umgang mit Reagenzien, Serum oder Plasmaproben in Übereinstimmung mit den Sicherheitsbestimmungen erfolgen.

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

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

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

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

XVII. LITERATUR

- FLIER, J.S., KAHN, C.R. and ROTH, J. (1979).
Receptors, antireceptor antibodies and mechanisms of insulin resistance.
N. Engl. J. Med., 300; 8:413-419.
- FRIER, B.M., ASHBY, J.P., NAIRN, I.M. and BAIRS, J.D. (1981).
Plasma insulin, C-peptide and glucagon concentrations in patients with insulin-dependent diabetes treated with chlorpropamide.
Diab. Metab., 7;1:45-49.
- JUDZEWITSCH, R.G., PFEIFER, M.A., BEST, J.D., BEARD, J.C., HALTER, J.B. and PORTE D.Jr. (1982).
Chronic chlorpropamide therapy of non-insulin-dependent diabetes augments basal and stimulated insulin secretion by increasing islet sensitivity to glucose.
J.Clin. End. and Metab., 55;2:321-328.
- KOSAKA, K., HAGURA, R. and KUZUYA, T. (1977).
Insulin responses in equivocal and definite diabetes, with special reference to subjects who had mild glucose intolerance but later developed definite diabetes.
Diabetes, 26;10:944-952.
- STARR, J.I., MAKO, M.E., JUHN, D. and RUBENSTEIN, A.H. (1978).
Measurement of serum proinsulin-like material : cross-reactivity of porcine and human proinsulin in the insulin radioimmunoassay.
J. Lab. Clin. Med., 91;4:691-692.
- TEMPLE, R.C., CARRINGTON, C.A., LUZIO, S.D., OWENS, D.R., SCHNEIDER, A.E., SOBEY, W.J., HALES, C.N. (1989).
Insulin deficiency in non-insulin-dependent diabetes.
The Lancet, Feb.11:293-295.
- TEMPLE, R.C., CLARK, P.M., NAGI, D.K., SCHNEIDER, A.E., YUDKIN, J.S., HALES, C.N. (1990).
Clin. Endocrin., 32:689-693.
- TEMPLE, R.C., CLARK, P.M., HALES, C.N. (1992).
Measurement of insulin secretion in type 2 diabetes : problems and pitfalls.
Diabetic medicine, 9:503-512.

XVIII. ZUSAMMENFASSUNG DES PROTOKOLLS

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

DIAsource Katalognummer : KAP1251	Beipackzettelnummer: 1700433/de	Nummer der Originalausgabe: 090508/1
--------------------------------------	------------------------------------	--

Revisionsdatum : 2009-05-08



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

INS-EASIA

I. USO DEL KIT

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

II. INFORMAZIONI DI CARATTERE GENERALE

- A. Nome commerciale:** DIAsource INS-EASIA Kit
- B. Numero di catalogo:** KAP1251: 96 test
- C. Prodotto da:** **DIAsource ImmunoAssays S.A.**
Rue de l'Industrie, 8, B-1400 Nivelles, Belgio.

Per informazioni tecniche o su come ordinare il prodotto contattare:

Tel: +32 (0) 67 88.99.99

Fax: +32 (0) 67 88.99.96

III. INFORMAZIONI CLINICHE

A. Attività biologiche dell'insulina

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

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

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

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

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

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

B. Applicazioni cliniche del dosaggio dell'insulina

§ Determinazione della funzione residua delle beta cellule con il test di tolleranza al glucosio o dopo un pasto ricco di carboidrati, come guida per una eventuale terapia sostitutiva con insulina.

§ Contributo alla diagnosi differenziale di diabete mellito insulino o non insulino dipendente.

§ Caratterizzazione e follow-up dell'intolleranza al glucosio.


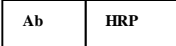
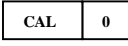
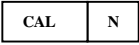
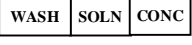
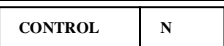
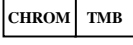
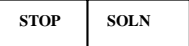
§ Diagnosi e studio dei casi di insulino resistenza.

§ Diagnosi di insulinoma e di altre cause di ipoglicemia.

IV. PRINCIPIO DEL METODO

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

V. REATTIVI FORNITI

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

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

VI. REATTIVI NON FORNITI

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

1. Acqua distillata di qualità elevata
2. Pipette per dispensare 50 µl, 500 µl e 2 ml (Si raccomanda di utilizzare pipette accurate con puntale in plastica monouso).
3. Agitatore tipo vortex.
4. Agitatore magnetico.
5. Lavatrice per piastra di microtitolazione
6. Lettore piastra di microtitolazione con una potenza di lettura di 450 nm e 650 nm (lettura bicomica)

VII. PREPARAZIONE DEI REATTIVI

- A. Calibratore:** Ricostituire lo calibratore zero con 2 ml di acqua distillata e gli altri calibratore con 0,5 ml di acqua distillata.
- B. Controlli:** Ricostituire i controlli con 0,5 ml di acqua distillata.
- C. Soluzione di lavoro del tampone di lavaggio:** Preparare la quantità necessaria di soluzione di lavoro del tampone di lavaggio aggiungendo 199 parti di acqua distillata ad una parte di tampone di lavaggio concentrato (200 x). Usare un agitatore magnetico per rendere la soluzione omogenea. La soluzione di lavoro va scartata al termine della giornata.

VIII. CONSERVAZIONE E SCADENZA DEI REATTIVI

- § I reattivi non utilizzati sono stabili a 2-8°C fino alla data riportata su ciascuna etichetta.
- § Le pozzetti inutilizzate devono essere conservate a 2-8°C, in un contenitore sigillato che contenga un essiccante fino alla data di scadenza.
- § Dopo ricostituzione, calibratore e controlli sono stabili 7 giorni a 2-8°C e, suddivisi in aliquote a -20°C per periodi più lunghi per 3 mesi. Evitare ripetuti cicli di congelamento-scongelo dei campioni.
- § La soluzione di lavaggio concentrata è stabile a temperatura ambiente fino alla data di scadenza.
- § La soluzione di lavoro del tampone di lavaggio deve essere preparata fresca ogni volta e usata nello stesso giorno della preparazione.
- § Dopo apertura del flacone, il coniugato è stabile fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta, se conservato a 2-8°C nel flacone originale ben tappato.
- § Alterazioni dell'aspetto fisico dei reattivi possono indicare una loro instabilità o deterioramento.

IX. RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

- § Conservare i campioni di siero a 2-8°C.
- § Se non si desidera eseguire il dosaggio entro 24 ore dal prelievo, si raccomanda di conservare i campioni a -20°C.
- § Evitare ripetuti cicli di congelamento-scongelo dei campioni.
- § Prima dell'impiego, tutti i campioni devono essere a temperatura ambiente. Si raccomanda di vortexare i campioni prima di utilizzarli.
- § Non usare campioni emolizzati.

X. METODO DEL DOSAGGIO

A. Avvertenze generali

- Non usare il kit o suoi componenti oltre la data di scadenza.
- Non mescolare reattivi di lotti diversi.
- Prima dell'uso portare tutti i reattivi a temperatura ambiente.
- Mescolare delicatamente i campioni per inversione o rotazione.
- Eseguire calibratori, controlli e campioni in doppio. Si raccomanda l'allineamento verticale.
- Utilizzare un contenitore di plastica pulito per preparare la soluzione di lavaggio.
- Per evitare cross-contaminazioni, cambiare il puntale della pipetta ogni volta che si usi un nuovo reattivo o campione.
- Per la distribuzione della soluzione cromogena e la Stop Solution evitare pipette con parti metalliche.
- L'uso di pipette ben tarate e ripetibili o di sistemi di pipettamento automatici migliora la precisione del dosaggio.
- Rispettare i tempi di incubazione.
- Per evitare derive, l'intervallo tra il pipettaggio del primo calibratore e l'ultimo campione non deve essere superiore a 30 minuti.
- Allestire una curva di taratura per ogni seduta analitica, in quanto non è possibile utilizzare per un dosaggio curve di taratura di sedute analitiche precedenti.
- Distribuzione della soluzione cromogena entro 15 minuti dopo il lavaggio della piastra di microtitolazione.
- Durante l'incubazione con la soluzione cromogena evitare la luce diretta del sole sulla piastra di microtitolazione.

B. Metodo del dosaggio

1. Selezionare il numero di pozzetti necessario per il test. Le pozzetti inutilizzate devono essere risigillate nel contenitore con un essiccante e conservate a 2-8°C.
2. Assicurare le pozzette nel telaio di supporto.
3. Pipettare 50 µl di ogni calibratore, controllo e campione nei pozzetti adeguati.
4. Pipettare 50 µl di coniugato anti-INS-HRP in tutti i pozzetti.
5. Incubare per 30 minuti a temperatura ambiente.
6. Aspirare il liquido da ogni pozzetto.
7. Lavare la piastra 3 volte :
 - § versando 0,4 ml di soluzione di lavaggio in ogni pozzetto
 - § aspirando il contenuto di ogni pozzetto
8. Pipettare 100 µl di soluzione cromogena entro 15 minuti dalla fase di lavaggio.
9. Incubare la piastra di microtitolazione per 15 minuti a temperatura ambiente.

10. Pipettare 100 µl di reagente d'arresto in ogni pozzetto.
11. Leggere le assorbanze a 450 nm (filtro di riferimento a 630 nm o 650 nm) entro 1 ora e calcolare i risultati come descritto nella sezione XI.

XI. CALCOLO DEI RISULTATI

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

XII. CARATTERISTICHE TIPICHE

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

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

XIII. CARATTERISTICHE E LIMITI DEL METODO

A. Sensibilità

Venti replicati dello standard zero sono stati dosati insieme agli altri standard. La sensibilità, calcolata come concentrazione apparente di un campione con OD pari alla media più 2 deviazioni standard di 20 replicati dello standard zero, è risultata essere 0,17 µIU/ml.

B. Specificità

Alcuni ormoni, potenzialmente in grado, di cross-reagire nel dosaggio sono stati aggiunti allo standard 100 µIU/ml (4 ng/ml). E' stata misurata la risposta apparente nel kit INS. Come mostrato nella successiva tabella, le insuline animali, ma non l'insulina di ratto, cross-reagiscono nel dosaggio, mentre le proinsuline umana, bovina e porcina, non presentano cross-reazioni.

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

C. Precisione

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

SD : Deviazione Standard; CV: Coefficiente di Variazione

D. Accuratezza

TEST DI DILUIZIONE

Campione	Diluizione	Concentrazione teorica (µIU/ml)	Concentrazione misurata (µIU/ml)
Siero 1	1/1	-----	82.3
	1/2	41.2	42.21
	1/4	20.6	22.86
	1/8	10.3	11.04
	1/16	5.15	5.9
	1/32	2.58	3.3
Siero 2	1/1	-----	57.5
	1/2	28.7	27.7
	1/4	14.4	14.5
	1/8	7.2	8.0
	1/16	3.6	4.4
	1/32	1.8	2.3

I campioni sono stati diluiti con calibratore zero.

TEST DI RECUPERO

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

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

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

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

F. Effetto hook

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

XIV. CONTROLLO DI QUALITA' INTERNO

- § Se i risultati ottenuti dosando il Controllo 1 e il Controllo 2 non sono all'interno dei limiti riportati sull'etichetta dei flaconi, non è opportuno utilizzare i risultati ottenuti per i campioni, a meno che non si trovi una giustificazione soddisfacente.
- § Ogni laboratorio può preparare un proprio pool di sieri da utilizzare come controllo, da conservare congelato in aliquote.
- § I criteri di accettazione delle differenze tra i risultati in duplicato dei campioni devono basarsi sulla buona prassi di laboratorio.
- § Si raccomanda di saggiare i controlli con regolarità come campioni sconosciuti per misurare la variabilità del saggio. La resa del saggio deve essere monitorata con tabelle di controllo qualità dei controlli.
- § È buona pratica verificare visivamente il modello di curva selezionato dal computer.

XV. INTERVALLI DI RIFERIMENTO

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

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

XVI. PRECAUZIONI PER L'USO

Sicurezza

Il kit è solo per uso diagnostico in vitro.

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

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

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

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

XVII. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- FLIER, J.S., KAHN, C.R. and ROTH, J. (1979).
Receptors, antireceptor antibodies and mechanisms of insulin resistance.
N. Engl. J. Med., 300; 8:413-419.
- FRIER, B.M., ASHBY, J.P., NAIRN, I.M. and BAIRS, J.D. (1981).
Plasma insulin, C-peptide and glucagon concentrations in patients with insulin-dependent diabetes treated with chlorpropamide.
Diab. Metab., 7:1:45-49.
- JUDZEWITSCH, R.G., PFEIFER, M.A., BEST, J.D., BEARD, J.C., HALTER, J.B. and PORTE D.Jr. (1982).
Chronic chlorpropamide therapy of non-insulin-dependent diabetes augments basal and stimulated insulin secretion by increasing islet sensitivity to glucose.
J.Clin. End. and Metab., 55:2:321-328.
- KOSAKA, K., HAGURA, R. and KUZUYA, T. (1977).
Insulin responses in equivocal and definite diabetes, with special reference to subjects who had mild glucose intolerance but later developed definite diabetes.
Diabetes, 26;10:944-952.
- STARR, J.I., MAKO, M.E., JUHN, D. and RUBENSTEIN, A.H. (1978).
Measurement of serum proinsulin-like material : cross-reactivity of porcine and human proinsulin in the insulin radioimmunoassay.
J. Lab. Clin. Med., 91;4:691-692.
- TEMPLE, R.C., CARRINGTON, C.A., LUZIO, S.D., OWENS, D.R., SCHNEIDER, A.E., SOBEY, W.J., HALES, C.N. (1989).
Insulin deficiency in non-insulin-dependent diabetes.
The Lancet, Feb.11:293-295.
- TEMPLE, R.C., CLARK, P.M., NAGI, D.K., SCHNEIDER, A.E., YUDKIN, J.S., HALES, C.N. (1990).
Clin. Endocrin., 32:689-693.
- TEMPLE, R.C., CLARK, P.M., HALES, C.N. (1992).
Measurement of insulin secretion in type 2 diabetes : problems and pitfalls.
Diabetic medicine, 9:503-512.

XVIII. SCHEMA DEL DOSAGGIO

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

Numero di catalogo di DIAsource : KAP1251	P.I. numero : 1700433/it	Revisione numero : 090508/1
--	-----------------------------	--------------------------------

Data di revisione : 2009-05-08

Διαβάστε ολόκληρο το πρωτόκολλο πριν από τη χρ

INS-EASIA

I. ΧΡΗΣΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΟΠΟΙΑ ΠΡΟΟΡΙΖΕΤΑΙ

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

II. ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

- A. **Εμπορική ονομασία:** Kit INS-EASIA της DIAsource
- B. **Αριθμός καταλόγου:** KAP1251: 96 προσδιορισμοί
- Γ. **Κατασκευάζεται από την:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue de l'Industrie, 8, B-1400 Nivelles, Belgium.

Για τεχνική βοήθεια ή πληροφορίες σχετικά με παραγγελίες επικοινωνήστε στα:

Τηλ.: +32 (0)67 88.99.99

Φαξ: +32 (0)67 88.99.96

III. ΚΛΙΝΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ

A Βιολογική δράση της ινσουλίνης

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

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


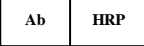

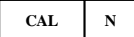
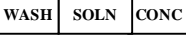
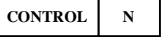
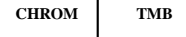
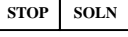
B. Κλινική εφαρμογή του προσδιορισμού ινσουλίνης

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

IV. ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

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

V. ΠΑΡΕΧΟΜΕΝΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

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

Σημείωση: 1. Χρησιμοποιείτε το μηδενικό βαθμονομητή για αραιώσεις δειγμάτων.
2.1 μIU του παρασκευάσματος του βαθμονομητή είναι ισοδύναμο με 1 μIU του 2⁹⁹ IRP 66/304.

VI. ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ ΠΟΥ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ

Τα ακόλουθα υλικά απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται στο κιτ:

1. Απεσταγμένο νερό υψηλής ποιότητας
2. Πιπέτες για διανομή: 50 μl, 500 μl και 2 ml (συνιστάται η χρήση πιπετών ακριβείας με ανάλωμα πλαστικά ρύγχη)
3. Αναμεικτής στροβιλισμού
4. Μαγνητικός αναδευτήρας
5. Συσκευή πλύσης για πλάκες μικροτιτλοδότησης

6. Συσκευή ανάγνωσης πλακών μικροτιτλοδότησης με δυνατότητα ανάγνωσης στα 450 nm, και 650 nm (Διχρωματική ανάγνωση)

VII. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟΥ

- A. **αθμονομητές:** Ανασυστήστε το μηδενικό βαθμονομητή με 2,0 ml απεσταγμένου νερού και άλλους βαθμονομητές με 0,5 ml απεσταγμένου νερού.
- B. **Οροί ελέγχου:** Ανασυστήστε τους ορούς ελέγχου με 0,5 ml απεσταγμένου νερού.
- C. **Γ. Διάλυμα πλύσης εργασίας:** Προετοιμάστε επαρκή όγκο διαλύματος πλύσης εργασίας με προσθήκη 199 όγκων απεσταγμένου νερού σε 1 όγκο διαλύματος πλύσης (200x). Χρησιμοποιήστε μαγνητικό αναδευτήρα για την ομογενοποίηση. Απορρίψτε το μη χρησιμοποιημένο διάλυμα πλύσης εργασίας στο τέλος της ημέρας.

VIII. ΦΥΛΑΞΗ ΚΑΙ ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΛΗΞΗΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

- § Πριν από το άνοιγμα ή την ανασύσταση, όλα τα συστατικά του κιτ παραμένουν σταθερά έως την ημερομηνία λήξης, η οποία αναγράφεται στην ετικέτα του φιαλιδίου, εφόσον διατηρούνται σε θερμοκρασία 2 έως 8° C.
- § Οι μη χρησιμοποιημένες υποδοχές πρέπει να φυλάσσονται στους 2-8° C, σε σφραγισμένη σακούλα που περιέχει αποξηραντικό παράγοντα, μέχρι την ημερομηνία λήξης.
- § Μετά την ανασύσταση, οι βαθμονομητές και οι οροί ελέγχου παραμένουν σταθεροί για μία εβδομάδα σε θερμοκρασία 2 έως 8° C. Για μεγαλύτερες περιόδους φύλαξης, πρέπει να σχηματίζονται κλάσματα/δόσεις μιας χρήσης και να διατηρούνται στους -20° C. Αποφύγετε τους επανειλημμένους κύκλους απόψυξης-κατάψυξης.
- § Το συμπυκνωμένο διάλυμα πλύσης είναι σταθερό σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι την ημερομηνία λήξης.
- § Φρέσκο, παρασκευασμένο διάλυμα πλύσης εργασίας θα πρέπει να χρησιμοποιείται την ίδια ημέρα.
- § Μετά την πρώτη χρήση του, το σύζευγμα παραμένει σταθερό έως την ημερομηνία λήξης, εφόσον διατηρείται στο αρχικό, ερμητικά κλειστό φιαλίδιο σε θερμοκρασία 2 έως 8° C..
- § Τυχόν μεταβολές της φυσικής εμφάνισης των αντιδραστηρίων του κιτ ενδέχεται να υποδηλώνουν αστάθεια ή αλλοίωση

IX. ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

- § Ο ορός πρέπει να φυλάσσεται στους 2 - 8° C.
- § Εάν η εξέταση δεν πραγματοποιηθεί εντός 24 ωρών, συνιστάται η φύλαξη σε κλάσματα/δόσεις μιας χρήσης στους -20° C. Αποφεύγετε τους επακόλουθους κύκλους κατάψυξης-απόψυξης.
- § Φέρετε όλα τα δείγματα σε θερμοκρασία δωματίου πριν από τη χρήση. Συνιστάται η ανάμειξη των δειγμάτων σε συσκευή στροβιλισμού πριν από τη χρήση.
- § Μην χρησιμοποιείτε δείγματα που έχουν υποστεί αιμόλυση.

X. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

- A. **Σημειώσεις σχετικά με το χειρισμό**
Μη χρησιμοποιείτε το κιτ ή τα συστατικά μετά την ημερομηνία λήξης. Μην αναμειγνύετε υλικά από διαφορετικές παρτίδες κιτ. Φέρετε όλα τα αντιδραστήρια σε θερμοκρασία δωματίου πριν από τη χρήση.
Αναμείξτε καλά όλα τα αντιδραστήρια και τα δείγματα με απαλή ανακίνηση ή ανάδευση.
Εκτελέστε εις διπλούν ανάληψη των βαθμονομητών, των ορών ελέγχου και των δειγμάτων. Συνιστάται κάθετη ευθυγράμμιση.
Χρησιμοποιήστε ένα καθαρό, πλαστικό δοχείο για να διάλυμα πλύσης.
Χρησιμοποιείτε ένα καθαρό ανάλωμα ρύγχος πιπέτας για την προσθήκη κάθε διαφορετικού αντιδραστηρίου και δείγματος προκειμένου να αποφύγετε την επιμόλυνση.
Για τη διανομή του χρομογόνου διαλύματος και του ανασχετικού διαλύματος αποφύγετε πιπέτες με μεταλλικά μέρη.

Για τη διανομή του αποκαλυπτικού διαλύματος και του ανασχετικού διαλύματος αποφύγετε πιπέτες με μεταλλικά μέρη.
Η ακρίβεια βελτιώνεται με χρήση πιπετών υψηλής ακρίβειας ή αυτοματοποιημένου εξοπλισμού διανομής με πιπέτες.
Τηρείτε τους χρόνους επώασης.
Για να αποφύγετε τη μετατόπιση, ο χρόνος μεταξύ της διανομής με πιπέτα του πρώτου βαθμονομητή και του τελευταίου δείγματος δεν πρέπει να είναι μεγαλύτερο από 30 λεπτά.
Προετοιμάστε μια καμπύλη βαθμονόμησης για κάθε ανάλυση και μη χρησιμοποιείτε δεδομένα από προηγούμενες αναλύσεις.
Διανείμετε το χρομογόνο διάλυμα εντός 15 λεπτών μετά την πλύση της πλάκας μικροτιτλοδότησης.
Κατά τη διάρκεια της επώασης με το χρομογόνο διάλυμα αποφύγετε απευθείας έκθεση στον ήλιο της πλάκας μικροτιτλοδότησης.

B. Διαδικασία

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

XI. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

1. Κάντε ανάγνωση της πλάκας στα 450 nm έναντι ενός φίλτρου αναφοράς που ρυθμίζεται στα 650 nm (ή τα 630 nm).
2. Υπολογίστε τη μέση τιμή των διπλών προσδιορισμών.
3. Σε ημιλογαριθμικό ή γραμμικό χαρτί γραφημάτων, παραστήστε γραφικά τις τιμές OD (τεταγμένη) για κάθε βαθμονομητή έναντι της αντίστοιχης συγκέντρωσης της INS (τετμημένη) και σχεδιάστε μια καμπύλη βαθμονόμησης μέσω των σημείων του βαθμονομητή, συνδέοντας με ευθείες γραμμές τα αποτυπωμένα σημεία.
4. Διαβάστε τη συγκέντρωση για κάθε ορό ελέγχου και δείγμα με αναγωγή στην καμπύλη βαθμονόμησης.
5. Αναγωγή δεδομένων με τη βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή θα απλοποιήσει αυτούς τους υπολογισμούς. Εάν χρησιμοποιείται αυτόματη επεξεργασία αποτελεσμάτων, συνιστάται προσαρμογή καμπύλης λογιστικής συνάρτησης 4 παραμέτρων.

XII. ΤΥΠΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

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

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

XIII. ΑΠΟΛΟΣΗ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

A. Όριο ανίχνευσης

Μετρήθηκαν είκοσι μηδενικοί βαθμονομητές μαζί με ένα σύνολο άλλων βαθμονομητών. Το όριο ανίχνευσης, οριζόμενο ως η φαινομενική συγκέντρωση δύο τυπικών αποκλίσεων πάνω από τις μέσες μετρήσεις OD σε μηδενική δέσμευση, ήταν 0,17 μIU/ml.

B. Ειδικότητα

Ορμόνες διασταυρούμενης αντίδρασης προστέθηκαν σε ένα βαθμονομητή υψηλής τιμής (100 μIU/ml ή 4 ng/ml). Μετρήθηκε η φαινομενική απόκριση της INS.

Όπως φαίνεται πιο κάτω, ινσουλίνες ζώων (εκτός της ινσουλίνης του αρουραίου) εμφανίζουν διασταυρούμενη αντίδραση ενώ ανθρώπινες, χοίρειες και βόειες προΐνσουλίνες δεν παρουσιάζουν διασταυρούμενη αντίδραση.

Προσθεθείσα αναλύομενη ουσία σε ορό υψηλής τιμής	Θεωρητικές τιμές INS (ng/ml)	Παρατηρηθείσες τιμές INS (ng/ml)	Διασταυρούμενη αντίδραση (%)
Χοίρειος ινσουλίνη 8 ng/ml	4.2	17.4	> 100
Βόειος ινσουλίνη 8 ng/ml	3.8	17.8	> 100
Ινσουλίνη σκύλου 16 ng/ml	4.2	17.2	81
Ινσουλίνη κουνελιού 16 ng/ml	4.2	14.1	62
Ινσουλίνη αρουραίου 16 ng/ml	3.8	3.7	0
Ανθρώπινη προΐνσουλίνη 32ng/ml	4.3	4.4	0.3
Χοίρειος προΐνσουλίνη 16 ng/ml	4.3	4.7	2.5
Βόειος προΐνσουλίνη 16 ng/ml	4.3	4.4	0.6

Γ. Ακρίβεια

ΓΙΑ ΤΟΝ ΙΔΙΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ				ΜΕΤΑΞΥ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΩΝ			
Ορός	N	<X> ± T.A. (μIU/ml)	Σ.Δ (%)	Ορός	N	<X> ± T.A. (μIU/ml)	Σ.Δ (%)
A	23	13.09 ± 0.6	4.8	A	8	13.29 ± 1.08	8.1
B	23	32.9 ± 1.9	6.0	B	7	34.12 ± 3.1	9.0

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

Δ. Ορθότητα

ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΝΑΚΤΗΣΗΣ

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

ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΡΑΙΩΣΗΣ

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

Τα δείγματα αραιώθηκαν με μηδενικό βαθμονομητή.

E. Μεσοδιάστημα μεταξύ της διανομής τελευταίου βαθμονομητή και δείγματος

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

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

ΣΤ. Φαινόμενο αγκίστρου (hook)

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

XIV. ΕΣΩΤΕΡΙΚΟΣ ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

§ Εάν τα αποτελέσματα που λαμβάνονται για τον ορό ελέγχου 1 ή/και τον ορό ελέγχου 2 δε βρίσκονται εντός του πεδίου τιμών που καθορίζεται στην ετικέτα του φιαλιδίου, τα αποτελέσματα δεν είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν, εκτός εάν έχει δοθεί ικανοποιητική εξήγηση για την ασυμφωνία.

§ Εάν είναι επιθυμητό, κάθε εργαστήριο μπορεί να δημιουργήσει τα δικά του μείγματα δειγμάτων ελέγχου (pools), τα οποία πρέπει να διατηρούνται κατεψυγμένα σε κλάσματα/δόσεις μιας χρήσης.

§ Τα κριτήρια αποδοχής για τη διαφορά μεταξύ των διπλών αποτελεσμάτων των δειγμάτων θα πρέπει να βασίζονται σε ορθές εργαστηριακές πρακτικές.

§ Συνιστάται οι οροί ελέγχου να υποβάλλονται σε προσδιορισμό τακτικά ως άγνωστα δείγματα για να μετράται η μεταβλητότητα του προσδιορισμού. Η απόδοση του προσδιορισμού πρέπει να παρακολουθείται με διαγράμματα ποιοτικού ελέγχου των ορών ελέγχου.

§ Είναι καλό το να ελέγχετε οπτικά την προσαρμογή της καμπύλης που επιλέχθηκε από τον υπολογιστή.

XV. ΤΙΜΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

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

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

XVI. ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ

Ασφάλειας

Μόνο για διαγνωστική χρήση *in vitro*.

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

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

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

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

XVII. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- FLIER, J.S., KAHN, C.R. and ROTH, J. (1979).
Receptors, antireceptor antibodies and mechanisms of insulin resistance.
N. Engl. J. Med., 300; 8:413-419.
- FRIER, B.M., ASHBY, J.P., NAIRN, I.M. and BAIRS, J.D. (1981).
Plasma insulin, C-peptide and glucagon concentrations in patients with insulin-dependent diabetes treated with chlorpropamide.
Diab. Metab., 7;1:45-49.
- JUDZEWITSCH, R.G., PFEIFER, M.A., BEST, J.D., BEARD, J.C., HALTER, J.B. and PORTE D.Jr. (1982).
Chronic chlorpropamide therapy of non-insulin-dependent diabetes augments basal and stimulated insulin secretion by increasing islet sensitivity to glucose.
J.Clin. End. and Metab., 55;2:321-328.
- KOSAKA, K., HAGURA, R. and KUZUYA, T. (1977).
Insulin responses in equivocal and definite diabetes, with special reference to subjects who had mild glucose intolerance but later developed definite diabetes.
Diabetes, 26;10:944-952.
- STARR, J.I., MAKO, M.E., JUHN, D. and RUBENSTEIN, A.H. (1978).
Measurement of serum proinsulin-like material : cross-reactivity of porcine and human proinsulin in the insulin radioimmunoassay.
J. Lab. Clin. Med., 91;4:691-692.
- TEMPLE, R.C., CARRINGTON, C.A., LUZIO, S.D., OWENS, D.R., SCHNEIDER, A.E., SOBEY, W.J., HALES, C.N. (1989).
Insulin deficiency in non-insulin-dependent diabetes.
The Lancet, Feb.11:293-295.
- TEMPLE, R.C., CLARK, P.M., NAGI, D.K., SCHNEIDER, A.E., YUDKIN, J.S., HALES, C.N. (1990).
Clin. Endocrin., 32:689-693.
- TEMPLE, R.C., CLARK, P.M., HALES, C.N. (1992).
Measurement of insulin secretion in type 2 diabetes : problems and pitfalls.
Diabetic medicine, 9:503-512.

XVIII. ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΤΟΥ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟΥ

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

Αρ. καταλόγου DIASource: KAP1251	Αριθμός P.I.: 1700433/el	Αρ. αναθεώρησης: 090508/1
--	-----------------------------	------------------------------

Ημερομηνία αναθεώρησης: 2009-05-08



Használat előtt olvassa el a teljes használati utasítást.

INS-EASIA

I. VIZSGÁLAT CÉLJA

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

II. ÁLTALÁNOS INFORMÁCIÓK

- A. Bejegyzett név:** DIAsource INS-EASIA Reagenskészlet
- B. Katalógusszám:** KAP1251 : 96 vizsgálat
- C. Gyártó :** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue de l'Industrie 8, B-1400 Nivelles, Belgium.

Gyakorlati jellegű vagy rendeléssel kapcsolatos kérdésekkel hívja a következő számot:

Tel : +32 (0)67 88.99.99

Fax : +32 (0)67 88.99.96

III. KLINIKAI HÁTTÉR

A. Az inzulin biológiai szerepe

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

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






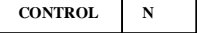
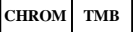
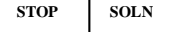
B. Az inzulinnmeghatározás klinikai felhasználása

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

IV. A MÓDSZER ELVE

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

V. A REAGENS KÉSZLET TARTALMA

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

Megjegyzés:

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

VI. A FELHASZNÁLÓ ÁLTAL BIZTOSÍTOTT ESZKÖZÖK

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

- Kiváló minőségű desztillált víz
- Pipetták: 50 µl, 500 µl és 2 ml beméréséhez (ajánlott pontos pipetták és eldobható műanyag pipettahegyek használata)
- Vortex
- Mágneses keverő
- Mikrotiter lemez mosó
- Mikrotiter lemez leolvató, mely egyaránt képes 450 nm-en és 650 nm-en

(Bikromatikus leolvás)

VII. REAGENSEK ELŐKÉSZÍTÉSE

- Kalibrátorok:** Oldja fel a nulla kalibrátort 2 ml, a többi kalibrátort pedig 0,5 ml desztillált vízben.
- Kontrollok:** Oldja fel a kontrollokat 0,5 ml desztillált vízben.
- Hígított mosóoldat:** Készítsen megfelelő mennyiségű hígított mosóoldatot úgy, hogy 199 rész desztillált vízhez 1 rész mosóoldatot (200x) kever. Homogenizálja mágneses keverő segítségével. A napi vizsgálatok végeztével öntse ki a megmaradt hígított mosóoldatot.

VIII. A REAGENSEK TÁROLÁSA ÉS ELTARTHATÓSÁGA

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

IX. MINTAVÉTEL ÉS ELŐKÉSZÍTÉS

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

X. A VIZSGÁLAT MENETE

A. Tudnivalók

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

B. A vizsgálat menete

- Válassza ki a megfelelő számú vályulatot a vizsgálatához. A fel nem használt vályulatok 2-8°C között zárt tartalmú, lezárt zacskóban tárolhatók.
- A vályulatokat rögzítse a mikrotiter lemez keretébe.
- Mérjen 50 µl-t minden kalibrátorból, kontrollból és mintából a megfelelő teszthelyekre.
- Pipettázzon 50 µl anti-INS-HRP konjugátumot minden teszthelyre.
- Inkubálja 30 percig szobahőmérsékleten.
- Szívja le a folyadékot a teszthelyekről.
- Mossa a lemezt 3-szor így:
§ mérjen be 0,4 ml Mosóoldatot minden teszthelyre
§ szívja le a teszthelyek tartalmát
- A mosási lépést követő 15 percen belül pipettázzon minden egyes vályulatba 100 µl Kromogén oldatot. Inkubálja 15 percig szobahőn.

9. Inkubálja 15 percig szobahőmérsékleten.
10. Mérjen 100 µl Stop oldatot minden teszthelyre.
11. Olvassa le az abszorbanciákat 450 nm-en (referencia szűrő 630 nm vagy 650 nm) 1 órán belül, és a XI. fejezet alapján számolja ki az eredményeket.

XI. EREDMÉNYEK KISZÁMÍTÁSA

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

XII. JELLEMZŐ MÉRÉSI EREDMÉNYEK

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

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

XIII. A VIZSGÁLAT JELLEMZŐI ÉS KORLÁTAI

A. A kimutathatóság alsó határa

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

B. Specificitás

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

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

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

C. Reprodukálhatóság

VIZSGÁLATON BELÜLI VIZSGÁLATOK KÖZÖTTI

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

SD: standard deviáció; CV: variációs koefficiens

D. Pontosság

VISSZANYERÉS

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

HÍGÍTÁSI VIZSGÁLAT

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

A minták hígítása a nulla kalibrátorral történt.

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

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

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

F. Kioltsási effektus

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

XIV. BELSŐ MINŐSÉGELLENŐRZÉS

- Ha a kontroll 1-re és 2-re kapott eredmények kívül esnek az ampullák címkéin feltüntetett tartományon, a vizsgálat eredményei nem használhatók fel, kivéve, ha ismert az eltérés pontos oka.
- Igény esetén bármely laboratórium készíthet egy saját, kontrollként szolgáló savó-poolt, amit azután szétozva, lefagyaszta kell tárolni.
- A párhuzamos vizsgálatok eredményei közötti eltérés elfogadható mértékét a GLP (Good Laboratory Practices) alapján kell meghatározni.
- Ajánlott a Kontrollokat ismeretlen mintákként rutinszerűen vizsgálni, hogy ellenőrizhető legyen a vizsgálat variabilitása. A reagenskészlet működése a kontrollok minőségellenőrző táblázataival összehasonlítva ellenőrizhető.
- Érdemes szemmel is ellenőrizni a számítógép által illesztett görbét.

XV. REFERENCIATARTOMÁNY

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

XVI. MUNKAÉVELEM

Biztonsági előírások

Csak in vitro diagnosztikai felhasználásra.

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

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

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

XVII. IRODALOM

- FLIER, J.S., KAHN, C.R. and ROTH, J. (1979).
Receptors, antireceptor antibodies and mechanisms of insulin resistance.
N. Engl. J. Med., 300; 8:413-419.
- FRIER, B.M., ASHBY, J.P., NAIRN, I.M. and BAIRS, J.D. (1981).
Plasma insulin, C-peptide and glucagon concentrations in patients with insulin-dependent diabetes treated with chlorpropamide.
Diab. Metab., 7;1:45-49.
- JUDZEWITSCH, R.G., PFEIFER, M.A., BEST, J.D., BEARD, J.C., HALTER, J.B. and PORTE D.Jr. (1982).
Chronic chlorpropamide therapy of non-insulin-dependent diabetes augments basal and stimulated insulin secretion by increasing islet sensitivity to glucose.
J.Clin. End. and Metab., 55;2:321-328.
- KOSAKA, K., HAGURA, R. and KUZUYA, T. (1977).
Insulin responses in equivocal and definite diabetes, with special reference to subjects who had mild glucose intolerance but later developed definite diabetes.
Diabetes, 26;10:944-952.
- STARR, J.I., MAKO, M.E., JUHN, D. and RUBENSTEIN, A.H. (1978).
Measurement of serum proinsulin-like material : cross-reactivity of porcine and human proinsulin in the insulin radioimmunoassay.
J. Lab. Clin. Med., 91;4:691-692.
- TEMPLE, R.C., CARRINGTON, C.A., LUZIO, S.D., OWENS, D.R., SCHNEIDER, A.E., SOBEY, W.J., HALES, C.N. (1989).
Insulin deficiency in non-insulin-dependent diabetes.
The Lancet, Feb.11:293-295.
- TEMPLE, R.C., CLARK, P.M., NAGI, D.K., SCHNEIDER, A.E., YUDKIN, J.S., HALES, C.N. (1990).
Clin. Endocrin., 32:689-693.
- TEMPLE, R.C., CLARK, P.M., HALES, C.N. (1992).
Measurement of insulin secretion in type 2 diabetes : problems and pitfalls.
Diabetic medicine, 9:503-512.

XVIII. AZ ELJÁRÁS ÖSSZEFOGLALÁSA

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

DIASource Katalógusszám : KAP1251	P.I. Szám : 1700433/hu	Verziószám : 090508/1
--------------------------------------	---------------------------	--------------------------

Frissítés időpontja : 2009-05-08

	<u>Used symbols</u>	<u>Symboles utilisés</u>
	Consult instructions for use	Consulter les instructions d'utilisation
	Storage temperature	Température de conservation
	Use by	Utiliser jusque
	Batch code	Numéro de lot
	Catalogue number	Référence de catalogue
	Control	Contrôle
	In vitro diagnostic medical device	Dispositif médical de diagnostic in vitro
	Manufacturer	Fabricant
	Contains sufficient for <n> tests	Contenu suffisant pour <n> tests
	Wash solution concentrated	Solution de lavage concentrée
	Zero calibrator	Calibreur zéro
	Calibrator #	Calibreur #
	Control #	Contrôle #
	Tracer	Traceur
	Tracer	Traceur
	Tracer concentrated	Traceur concentré
	Tracer concentrated	Traceur concentré
	Tubes	Tubes
	Incubation buffer	Tampon d'incubation
	Acetonitrile	Acétonitrile
	Serum	Sérum
	Specimen diluent	Diluant du spécimen
	Dilution buffer	Tampon de dilution
	Antiserum	Antisérum
	Immunoabsorbent	Immunoabsorbant
	Calibrator diluent	Diluant de calibrateur
	Reconstitution solution	Solution de reconstitution
	Polyethylene glycol	Glycol Polyéthylène
	Extraction solution	Solution d'extraction
	Elution solution	Solution d'élution
	Bond Elut Silica cartridges	Cartouches Bond Elut Silica
	Pre-treatment solution	Solution de pré-traitement
	Neutralization solution	Solution de neutralisation
	Tracer buffer	Tampon traceur
	Microtiterplate	Microplaque de titration
	HRP Conjugate	HRP Conjugué
	HRP Conjugate	HRP Conjugué
	HRP Conjugate concentrate	HRP Conjugué concentré
	HRP Conjugate concentrate	HRP Conjugué concentré
	Conjugate buffer	Tampon conjugué
	Chromogenic TMB concentrate	Chromogène TMB concentré
	Chromogenic TMB solution	Solution chromogène TMB
	Substrate buffer	Tampon substrat
	Stop solution	Solution d'arrêt
	Incubation serum	Sérum d'incubation
	Buffer	Tampon
	AP Conjugate	AP Conjugué
	Substrate PNPP	Tampon PNPP
	Biotin conjugate concentrate	Biotine conjugué concentré
	Avidine HRP concentrate	Avidine HRP concentré
	Assay buffer	Tampon de test
	Biotin conjugate	Biotine conjugué
	Specific Antibody	Anticorps spécifique
	Streptavidin HRP concentrate	Concentré streptavidine HRP
	Non-specific binding	Liant non spécifique
	2nd Antibody	Second anticorps
	Acidification Buffer	Tampon d'acidification

	<u>Gebruikte symbolen</u>	<u>Gebrauchte Symbolen</u>
	Raadpleeg de gebruiksaanwijzing	Gebrauchsanweisung beachten
	Bewaartemperatuur	Lagern bei
	Houdbaar tot	Verwendbar bis
	Lotnummer	Chargenbezeichnung
	Catalogusnummer	Bestellnummer
	Controle	Kontrolle
	Medisch hulpmiddel voor in-vitro diagnostiek	In Vitro Diagnostikum
	Fabrikant	Hersteller
	Inhoud voldoende voor <n> testen	Ausreichend für <n> Ansätze
	Wasoplossing, geconcentreerd	Waschlösung-Konzentrat
	Nulkalibrator	Null kalibrator
	Kalibrator #	Kalibrator #
	Controle #	Kontrolle #
	Tracer	Tracer
	Tracer	Tracer
	Tracer geconcentreerd	Tracer Konzentrat
	Tracer geconcentreerd	Tracer Konzentrat
	Buisjes	Röhrchen
	Incubatiebuffer	Inkubationspuffer
	Acetonitrile	Azetonitril
	Serum	Humanserum
	Specimen diluent	Probenverdünner
	Verdunningsbuffer	Verdünnungspuffer
	Antiserum	Antiserum
	Immunoabsorbent	Immunoabsorbens
	Kalibratorverdunner	Kalibratorverdünnung
	Reconstitutieoplossing	Rekonstitutionslösung
	Polyethyleen glycol	Polyethylenglykol
	Extractieoplossing	Extraktionslösung
	Elutieoplossing	Eluierungslösung
	Bond Elut Silica kolom	Bond Elut Silikakartuschen
	Pre-behandelingsoplossing	Vorbehandlungslösung
	Neutralisatieoplossing	Neutralisierungslösung
	Tracerbuffer	Tracer-Puffer
	Microtiterplaat	Mikrotiterplatte
	HRP Conjuugaat	HRP Konjugat
	HRP Conjuugaat	HRP Konjugat
	HRP Conjuugaat geconcentreerd	HRP Konjugat Konzentrat
	HRP Conjuugaat geconcentreerd	HRP Konjugat Konzentrat
	Conjuugaat buffer	Konjugatpuffer
	Chromogene TMB geconcentreerd	Chromogenes TMB Konzentrat
	Chromogene Oplossing TMB	Farblösung TMB
	Substraatbuffer	Substratpuffer
	Stopoplossing	Stopplösung
	Incubatieserum	Inkubationsserum
	Buffer	Puffer
	AP Conjuugaat	AP Konjugat
	Substraat PNPP	Substrat PNPP
	Geconcentreerd Biotine conjuugaat	Biotin-Konjugat-Konzentrat
	Geconcentreerd Avidine-HRP conjuugaat	Avidin-HRP-Konzentrat
	Assay buffer	Assaypuffer
	Biotine conjuugaat	Biotin-Konjugat
	Specifiek antilichaam	Spezifischer Antikörper
	Streptavidine-HRP concentraat	HRP Streptavidinkonzentrat
	Aspecifieke binding	Unspezifische Bindung
	2de antilichaam	Sekundärer Antikörper
	Verzuringbuffer	Ansäuerungspuffer

	<u>Simboli utilizzati</u>	<u>Símbolos utilizados</u>
	Consultare le istruzioni per l'uso	Consultar las instrucciones de uso
	Limitazioni di temperatura	Limitación de temperatura
	Utilizzare entro	Fecha de caducidad
	Numero di lotto	Código de lote
	Numero di catalogo	Número de catálogo
	Controllo	Control
	Dispositivo medico-diagnostico in vitro	Producto sanitario para diagnóstico in vitro
	Fabbricante	Fabricante
	Contenuto sufficiente per <n> saggi	Contenido suficiente para <n> ensayos
	Tampone di lavaggio concentrato	Solución de lavado concentrada
	Calibratore zero	Calibrador cero
	Standard #	Calibrador #
	Controllo #	Control #
	Marcato	Trazador
	Marcato	Trazador
	Marcato concentrato	Trazador concentrada
	Marcato concentrato	Trazador concentrada
	Provette	Tubos
	Tampone incubazione	Tampón de incubación
	Acetonitrile	Acetonitrilo
	Siero	Suero
	Diluente campione	Diluyente de Muestra
	Tampone diluizione	Tampón de dilución
	Antisiero	Antisuero
	Immunoassorbente	Immunoabsorbente
	Diluente calibratore	Diluyente de calibrador
	Soluzione di ricostituzione	Solución de Reconstitución
	Polietilenglicole	Glicol Polietileno
	Soluzione di estrazione	Solución de extracción
	Soluzione di eluizione	Solución de elución
	Cartucce di silice bond elut	Cartuchos Bond Elut Silica
	Soluzione di pretrattamento	Solución de Pre-tratamiento
	Soluzione di neutralizzazione	Solución de Neutralización
	Tracer Buffer	Tampón de trazador
	Piastra di microtitolazione	Placa de microvaloración
	HRP Coniugato	HRP Conjugado
	HRP Coniugato	HRP Conjugado
	HRP Coniugato concentrato	HRP Conjugado concentrada
	HRP Coniugato concentrato	HRP Conjugado concentrada
	Buffer coniugato	Tampón de Conjugado
	Cromogena TMB concentrato	Cromógena TMB concentrada
	Soluzione cromogena TMB	Solución Cromógena TMB
	Tampone substrato	Tampón de sustrato
	Soluzione di arresto	Solución de Parada
	Incubazione con siero	Suero de Incubación
	Buffer	Tampón
	AP Coniugato	AP Conjugado
	Substrato PNPP	Sustrato PNPP
	Concentrato coniugato con biotina	Concentrado de conjugado de biotina
	Concentrato avidina HRP	Concentrado avidina-HRP
	Soluzione tampone per test	Tampón de ensayo
	Coniugato con biotina	Conjugado de biotina
	Anticorpo Specifico	Anticuerpo específico
	Streptavidina-HRP concentrata	Estreptavidina-HRP Concentrado
	Legame non-specifico	Unión no específica
	2° Anticorpo	Segundo anticuerpo
	Tampone Acidificante	Tampón de Acidificación

	<u>Símbolos utilizados</u>	<u>Använda symboler</u>
	Consulte instruções de utilização	Läs instruktionerna före användning
	Temperatura de conservação	Förvaringstemperatur
	Utilizar antes de	Används av
	Código de lote	Lotnummer
	Número de catálogo	Katalognummer
	Controlo	Kontroll
	Dispositivo médico de diagnóstico in vitro	In vitro diagnostiskt kit
	Fabricante	Tillverkare
	Conteúdo suficiente para <n> testes	Innehållet räcker till <n> prover
	Solução de lavagem concentrada	Tvättlösning, koncentrerad
	Calibrador zero	Nollkalibrerare
	Calibrador #	Kalibrator #
	Controlo #	Kontroll #
	Marcador	Radioisotop, antigen
	Marcador	Radioisotop, antikropp
	Marcador concentrada	Radioisotop, antigen koncentrerad
	Marcador concentrada	Radioisotop, antikropp koncentrerad
	Tubos	Rör
	Tampão de incubação	Inkuberingsbuffert
	Acetonitrilo	Acetonitril
	Soro	Serum
	Diluidor de espécimes	Spädningsbuffert för prover
	Tampão de diluição	Spädningsbuffert
	Anti-soro	Antiserum
	Imunoadsorvente	Immunoadsorberare
	Diluyente do calibrador	Kalibratordiluent
	Solução de Reconstituição	Rekonstitutionslösning
	Poliétileno-glicol	Polyetylen glykol
	Solução de Extração	Extraktionslösning
	Solução de Eluição	Elueringslösning
	Cartuchos de sílica Bond Elut	Silikonpatroner för elueringsbindning
	Solução de pré-tratamento	Förbehandlingslösning
	Solução de neutralização	Neutraliseringslösning
	Tampão Marcador	Tracerbuffert
	Placa de micro titulação	Microtiterplatta
	HRP Conjugação	HRP-konjugat
	HRP Conjugação	HRP-konjugat
	HRP Conjugação concentrada	HRP-konjugat-koncentrat
	HRP Conjugação concentrada	HRP-konjugat-koncentrat
	Conjuge o tampão	Konjugatbuffert
	Cromogénica TMB concentrada	Kromogeniskt TMB-koncentrat
	Solução Cromogénica TMB	Kromogenisk TMB-lösning
	Tampão de substrato	Substratbuffert
	Solução de Paragem	Stopplösning
	Soro de incubação	Inkubationsserum
	Tampão	Buffert
	AP Conjugação	AP-konjugat
	Substrato PNPP	Substrat-PNPP
	Concentrado conjugado de biotina	Biotinkonjugat koncentrat
	Concentrado HRP de avidina	Avidin HRP-koncentrat
	Tampão de ensaio	Provbuffert
	Conjugado de biotina	Biotinkonjugat
	Anticorpo específico	-
	Estreptavidina HRP concentrado	-
	Ligações não específicas	-
	Anticorpo secundário	-
	Tampão de acidificação	-

	<u>Επεξήγηση συμβόλων</u>	<u>Anvendte symboler</u>
	Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης	Læs brugsvejledningen
	Θερμοκρασία αποθήκευσης	Opbevaringstemperatur
	Ημερομηνία λήξης	Anvend inden
	Αριθμός παρτίδας	Batchkode
	Αριθμός καταλόγου	Katalognummer
	Πρότυπο ελέγχου	Kontrol
	In Vitro Διαγνωστικό Ιατροτεχνολογικό προϊόν	Medicinsk udstyr til in vitro-diagnosticering
	Κατασκευαστής	Fabrikant
	Περιεχόμενο επαρκές για «n» εξετάσεις	Indeholder nok til <n> test
	Συμπυκνωμένο διάλυμα έκπλυσης	Koncentreret vaskeopløsning
	Μηδενικός βαθμονομητής	Nul-kalibrator
	Βαθμονομητής #	Kalibrator nr.
	Ορός ελέγχου #	Kontrol nr.
	Ιζηθέτης	Markør
	Ιζηθέτης	Markør
	Χρωμογόνος Ιζηθέτης	Koncentreret markør
	Χρωμογόνος Ιζηθέτης	Koncentreret markør
	Σοληνάρια	Tuber
	Ρυθμιστικό διάλυμα επώασης	Inkubationsbuffer
	Ακετονιτρίλιο	Acetonitril
	Ορός	Serum
	Διάλυμα αραιώσης δειγμάτων	Prøvediluent
	Ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης	Fortyndingsbuffer
	Αντιορός	Antiserum
	Ανοσοπροσροφητικό	Immonoadsorbent
	Αραιωτικό βαθμονομητών	Kalibratordiluent
	Διάλυμα ανασύστασης	Rekonstitueringsopløsning
	Πολυαιθυλενογλυκόλη	Polyetylglykol
	Διάλυμα εκχύλισης	Ekstraktionsopløsning
	Διάλυμα έκλυσης	Elueringsopløsning
	Φύσιγγες πυριτίου Bond Elut	Patroner med bindingselueringssilica
	Διάλυμα προεπεξεργασίας	Forbehandlingsopløsning
	Διάλυμα εξουδετέρωσης	Neutraliseringsopløsning
	Ρυθμιστικό διάλυμα	Markørbuffer
	Πλάκα μικροτιτλοδότησης	Mikrotiterplade
	HRP Σύζευγμα	HRP-konjugat
	HRP Σύζευγμα	HRP-konjugat
	Χρωμογόνος HRP Σύζευγμα	HRP-konjugat-koncentreret
	Χρωμογόνος HRP Σύζευγμα	HRP-konjugat-koncentreret
	Ρυθμιστικό διάλυμα συζεύγματος	Konjugatbuffer
	Χρωμογόνος TMB	Kromogen TMB-koncentreret
	Διάλυμα χρωμογόνου TMB	Kromogen TMB-opløsning
	Ρυθμιστικό διάλυμα υποστρώματος	Substratbuffer
	Ανασχετικό αντιδραστήριο	Stopopløsning
	Ορός επώασης	Inkubationsserum
	Ρυθμιστικό διάλυμα	Buffer
	AP Σύζευγμα	AP-konjugat
	PNPP υποστρώματος	Substrat PNPP
	Συμπυκνωμένο αντιδραστήριο συζευγμένο με βιοτίνη	Biotin konjugat koncentrat
	Συμπυκνωμένο διάλυμα αβιδίνης-HRP	Avidin HRP koncentrat
	Ρυθμιστικό διάλυμα προσδιορισμού	Prøvebuffer
	αντιδραστήριο συζευγμένο με βιοτίνη	Biotin konjugat
	Ειδικό Αντίσωμα	-
	Συμπυκνωμένη στρεπταβιδίνη συνεξευγμένη με HRP	-
	μη-ειδική δέσμευση	-
	2ο Αντίσωμα	-
	Ρυθμιστικό Διάλυμα όξινο	-

	Stosowane symbole	Használt szimbólumok
	Przed zastosowaniem zapoznać się z instrukcją	Olvassa el a használati útmutatót
	Temperatura przechowywania	Tárolási hőmérséklet
	Zużyć przed	Lejáratí idő
	Kod serii	Gyártási kód
	Numer katalogowy	Katalógus szám
	Kontrola	Kontrol
	Urządzenie medyczne do diagnostyki in vitro	In vitro diagnosztikai eszköz
	Producent	Gyártó
	Zawartość wystarczająca do <n> testów	Tartalma <n> teszt elvégzésére elegendő
	Roztwór płuczący stężony	Mosó folyadék koncentrátum
	Kalibrator zerowy	Zero kalibrátor
	Kalibrator nr	Kalibrátor #
	Kontrola nr	Kontrol #
	Znacznik izotopowy	Nyomjelző izotóp
	Znacznik izotopowy	Nyomjelző izotóp
	Znacznik izotopowy stężony	Nyomjelző izotóp koncentrátum
	Znacznik izotopowy stężony	Nyomjelző izotóp koncentrátum
	Probówki	Csővek
	Wymagana inkubacja buforu	Inkubáló puffer
	Acetonitryl	Acetonitril
	Surowica	Szérum
	Rozcieńczalnik próbki	Mintahígító
	Bufor do rozcieńczania	Hígító puffer
	Antysurowica	Antiszérum
	Immunoabsorbent	Immunadsorbens
	Rozcieńczalnik kalibratora	Kalibrátor hígító
	Roztwór do rozcieńczania	Mintaelőkészítő oldat
	Glikol poli(oksy)etylenowy	Polietylén glikol
	Roztwór ekstrakcyjny	Extraktív oldat
	Roztwór elucyjny	Eluáló oldat
	Kolumny krzemionkowe Bond Elut	Bond Elut Silica szilikagél patronok
	Roztwór do przygotowania wstępnego	Előkezelő oldat
	Roztwór neutralizujący	Semlegesítő oldat
	Bufor znacznika	Nyomjelző izotóp hígító puffer
	mikroplytka	Mikrotiter lemez
	Koniugat peroksydazy chrzanowej	HRP konjugátum
	Koniugat peroksydazy chrzanowej	HRP konjugátum
	Koncentrat koniugatu peroksydazy chrzanowej	HRP konjugátum koncentrátum
	Koncentrat koniugatu peroksydazy chrzanowej	HRP konjugátum koncentrátum
	Bufor do koniugacji	Konjugátum puffer
	Koncentrat chromogenu TMB (czterometrylobenzodyny)	Kromogén TMB koncentrátum
	Roztwór chromogenu TMB (czterometrylobenzodyny)	Kromogén TMB oldat
	Bufor substratu	Szubsztrát puffer
	Roztwór zatrzymujący reakcję	Stop oldat
	Wymagana inkubacja surowicy	Inkubációs szérum
	Bufor	Puffer
	Koniugat AP (fosfatazy alkalicznej)	AP konjugátum
	p-nitrofenylofosforan substratowy	Szubsztrát PNPP
	Koncentrat koniugatu biotyny	Biotin konjugátum koncentrátum
	Koncentrat peroksydazy chrzanowej z awidyną	Avidin HRP koncentrátum
	Bufor do oznaczania	Vizsgálati puffer
	Koniugatu biotyny	Biotin konjugátum
	Przeciwciało swoiste	Specifikus ellenanyag
	Koncentrat streptawidyny HRP	Sztreptawidin HRP koncentrátum
	Wiązanie nieswoiste	Nem-specifikus kötődés
	Drugie przeciwciało	Másodlagos ellenanyag
	Bufor zakwaszający	Savas puffer

	<u>Използвани символи</u>
	Вижте инструкцията за работа
	Температура на съхранение
	Използвайте с
LOT	Партиден код
REF	Каталожен номер
CONTROL	Контрол
IVD	Ин витро диагностично медицинско изделие
	Производител
	Съдържание достатъчно за <n> теста
WASH SOLN CONC	Концентриран измиващ разтвор
CAL 0	Нулев калибратор
CAL N	Калибратор #
CONTROL N	Контрол #
Ag 125I	Трейсър
Ab 125I	Трейсър
Ag 125I CONC	Концентриран маркер
Ab 125I CONC	Концентриран маркер
	Епруветки
INC BUF	Инкубационен буфер
ACETONITRILE	Ацетонитрил
SERUM	Серум
DIL SPE	Разредител за пробите
DIL BUF	Буфер за разреждане
ANTISERUM	Антисерум
IMMUNOABSORBENT	Имуноабсорбент
DIL CAL	Разредител за калибратора
REC SOLN	Пресъздаващ разтвор
PEG	Полиетилен гликол
EXTR SOLN	Екстрактов разтвор
ELU SOLN	Разтвор за елюиране
GEL	Силикагелни пълнители
PRE SOLN	Пред-лечебен разтвор
NEUTR SOLN	Неутрализиращ разтвор
TRACEUR BUF	Маркерен буфер
ULI	Микротигърна пластина
Ab HRP	HRP конюгат / Конюгат на хрянова пероксидаза
Ag HRP	HRP конюгат / Конюгат на хрянова пероксидаза
Ab HRP CONC	HRP конюгиран концентрат
Ag HRP CONC	HRP конюгиран концентрат
CONJ BUF	Буфер за конюгата
CHROM TMB CONC	Хромогенен ТМВ концентрат
CHROM TMB	Хромогенен ТМВ разтвор
SUB BUF	Субстратен буфер
STOP SOLN	Стоп разтвор
INC SER	Инкубационен серум
BUF	Буфер
Ab AP	AP конюгат / конюгат на алкална фосфатаза
SUB PNPP	Субстрат PNPP / пара нитрофенил фосфат
BIOT CONJ CONC	Биотин конюгиран концентрат
AVID HRP CONC	Авидин HRP концентрат
ASS BUF	Буфер за пробите
Ab BIOT	Биотин конюгат
Ab	специфично антитяло
SAV HRP CONC	стрептавидин HRP концентрат
NSB	не специфично свързване
2nd Ab	второ антитяло
ACID BUF	киселинизиращ буфер