

INSULINA

Uso Previsto:

Inmunoensayo para la determinación cuantitativa in vitro de insulina en suero humano (ligado a enzimas).

Resumen:

La insulina humana es un péptido producido en las células beta del páncreas y es responsable del metabolismo y almacenamiento de carbohidratos. Como resultado de la biorretroalimentación, los niveles de insulina aumentan con la ingesta de azúcares y disminuyen cuando el contenido de azúcar es bajo para la absorción. En la población diabética el mecanismo de producción de insulina está alterado por predisposiciones genéticas o por estilo de vida y/o factores hereditarios. En tales casos, la producción de insulina debe potenciarse con medicamentos o debe complementarse con métodos orales o intravenosos. La determinación cuantitativa de la insulina puede ayudar en la selección de la dosis a la que debe someterse el paciente. Por otro lado, la insulina circulatoria se puede encontrar en niveles mucho más altos en pacientes con tumores pancreáticos. Estos los tumores secretan niveles anormalmente altos de insulina y, por lo tanto, causan hipoglucemia. En consecuencia, la hipoglucemia en ayunas asociado con concentraciones inapropiadamente altas de insulina sugiere fuertemente un tumor de células de los islotes. Distinguir insulinomas por hipoglucemia ficticia debida a la administración de insulina, se recomiendan valores séricos de péptido C. Estos insulinomas pueden localizarse mediante una dosis intravenosa provocativa de tobutamida y calcio.

Principio de la Prueba:

- El inmunoensayo utiliza el "principio de sándwich", ligado a enzimas. Ensayo inmunológico de adsorción. Para medir los niveles de Insulina en suero humano.
- Después de la muestra del paciente y otra se añade mono-anticuerpo marcado con HRP, INS, se fija al anticuerpo en fase sólida y la creación de un anticuerpo HRP—INS—“sándwich” de anticuerpos.
- Después de la incubación, el conjugado no unido se lava. La cantidad de conjugado de peroxidasa unida es proporcional a la concentración de la muestra del paciente.

Materiales Proporcionados:

- Microplaca recubierta, 8 x 12 tiras, 96 pocillos, recubierta previamente con anticuerpos anti-Insulina.
- Conjugado enzimático, 1 vial, 6 ml de HRP (peroxidasa de rábano picante) etiquetado anticuerpos anti-insulina Contiene de conservante ProClin300.
- Calibradores, 6 viales de 1 ml cada uno, listos para usar; con concentraciones indicadas en cada envase.
- Controles, 2 viales de 1 ml cada uno, listos para usar; con concentraciones indicadas en cada envase.
- Cromógeno A: 1 vial de 7 ml cada uno, listos para usar.
- Cromógeno B: 1 vial de 7 ml cada uno, listos para usar. Contiene TMB.
- Solución de parada, 1 vial, 7 ml.
- Concentrado de solución de lavado, 1 vial, 15 ml (concentrado 20X), Contiene fosfato, NaCl y Tween-20.
- Inserto: 1 copia.
- Tapa Placa: 1 pieza.

Materiales Requeridos (Pero no provistos):

- Lector de microplacas con capacidad de absorción de longitudes de onda de 450 nm y 620 nm.
- Lavador de microplacas.
- Incubadora.
- Sacudidor de platos.
- Micropipetas que suministran 50 µl con una precisión menor a 1,5%.
- Papel absorbente.
- Agua destilada.

Precauciones y Advertencias:

- Mezclar bien la muestra en los pocillos mediante agitación y eliminar las burbujas.
- Realice las pruebas lejos de malas condiciones ambientales. P.ej. aire ambiente que contiene gas corrosivo de alta concentración, como ácido hipoclorito de sodio, alcalino, acetaldehído, etc., o que contenga polvo.
- Lave los pocillos 3 veces por completo. Cada pocillo debe llenarse completamente con solución de lavado. Sin embargo, evite que la fuerza en el llenado sea demasiado intensa para evitar desbordamiento. En cada ciclo de lavado, seque los líquidos de cada pocillo. Golpee la microplaca sobre papel absorbente para eliminar las gotas de residuos de agua. Se recomienda a lave la microplaca con un lavador automático de tiras de microplacas.
- No eliminar adecuadamente la solución adherida en la aspiración o decantación durante el lavado pueden dar resultados deficientes o falsos.
- No utilice reactivos más allá de la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.
- No mezcle ni utilice componentes de kits con diferentes códigos de lote.
- Si se utiliza más de una placa, se recomienda repetir la curva de calibración.
- Es importante que el tiempo de reacción en cada pocillo se mantenga constante para lograr resultados reproducibles.
- Asegúrese de que la parte inferior del plato esté limpia y seca.
- Asegúrese de que no haya burbujas en la superficie del líquido antes de leer el plato.
- El sustrato y la solución de parada deben agregarse en la misma secuencia para eliminar cualquier desviación de tiempo durante la reacción.
- La humedad atmosférica en placas frías reduce significativamente su vida útil.
- Después de obtener el número requerido de tiras, la placa debe colocarse en la bolsa de plástico con cierre con desecantes para minimizar la exposición al aire húmedo.
- Usar el pozo en blanco para corregir el cero punto de lectura si se utiliza un lector de longitud de onda única. Si los lectores de doble longitud de onda con 450nm y 630nm son usados, no hay necesidad de corregir el punto cero.

Almacenamiento:

- Almacenar a 2-8°C
- Coloque los pocillos no utilizados en la bolsa de aluminio con cierre hermético y regréselo a 2-8°C, bajo cuyas condiciones los pozos permanecerán estables por 2 meses, o hasta que la fecha de caducidad.
- Selle y devuelva los calibradores no utilizados a 2-8°C, en cuyas condiciones la estabilidad se mantendrá durante 1 mes, para un uso prolongado, almacene los calibradores y congele a -20°C. Evite múltiples ciclos de congelación y descongelación.
- Selle y devuelva todos los demás reactivos no utilizados a 2-8°C, en cuyas condiciones la estabilidad se mantendrá durante 2 meses, o hasta la fecha de caducidad etiquetada.

Recogida y Preparación de Muestras:

- Recoger muestras de suero de acuerdo con las prácticas de laboratorio correctas.

- Las muestras de suero pueden analizarse mediante este procedimiento, separe suero del coágulo tan pronto como sea posible para evitar la hemólisis.
- Las muestras cubiertas se pueden almacenar hasta 48 horas a 2-8°C.
- Las muestras conservadas durante más tiempo se pueden congelar a -20 °C y evitar la congelación de fusión repetida.
- Centrifugar muestras que contengan precipitados antes de realizar el ensayo. No utilice muestras inactivadas por calor. No utilice muestras y controles estabilizados con azida.
- Asegúrese de que las muestras, los calibradores y los controles de los pacientes estén a temperatura ambiente. Temperatura (18-25°C) antes de la medición.
- Los sedimentos y los sólidos en suspensión en las muestras pueden interferir con el resultado de la prueba que debe ser eliminado por centrifugación. Asegúrese de que la formación completa del coágulo en las muestras de suero ha tenido lugar antes de la centrifugación.

Control de Calidad:

Cada laboratorio debe tener muestras de controles en los niveles bajo, normal y rango elevado para monitorear el rendimiento de la prueba. Debe haber controles tratados como desconocidos y valores determinados en cada procedimiento de prueba realizado. El requisito de controles recomendados para este ensayo es utilizar un control por separado y probarlos junto las muestras dentro de la misma corrida. El resultado es válido si los valores de control están dentro de la concentración rangos impresos en las etiquetas.

Solución de Lavado (Dilución 20X):

Diluya 50 ml de Solución de Lavado Concentrada en 950 ml de agua desionizada, para un volumen final de 1000 ml. Estable por 1 semana temperatura ambiente.

Procedimiento de Prueba:

- Utilice sólo el número de pocillos necesarios e identifique los pocillos de las microplacas para cada calibrador y muestra a realizar. Todos los calibradores y los controles deben establecer duplicado.
- Agregue 50 µL de calibradores o muestras a cada pocillo.
- Agregue 50 µL de enzima conjugada a cada pocillo.
- Agite suavemente la microplaca durante 30 segundos para mezclar.
- Cubra la placa con la tapa placa e incube a 37°C durante 60 minutos.
- Desechar el contenido de la microplaca por decantación o aspiración. Si decanta, golpee y seque la placa con papel absorbente.
- Agregue 350 µl de solución de lavado, 10 segundos por cada lavado, decante (golpee y seque) o aspire. Repetir 2 veces adicionales para un total de 3 lavados. Un lavador automático de tiras de microplacas puede ser usado. Al final del lavado, invierta la placa y elimine cualquier residuo solución de lavado sobre papel absorbente.
- Dispense 50 µl de cromógeno A en cada pocillo.
- Dispense 50 µl de cromógeno B en cada pocillo.
- Agite suavemente la microplaca durante 30 segundos para mezclar.
- Cubra la placa con la tapa placa e incube a 37°C durante 15 minutos
- Agregue 50 µl de solución de parada a cada pocillo.
- Agite de 15 a 20 segundos para mezclar el líquido dentro de los pocillos. Importante: Asegúrese de que el color cambie a amarillo por completo.
- Lea la absorbancia de cada pozo dentro de los primeros 10 minutos a 450nm (usando 620 a 630nm como longitud de onda secundaria para minimizar las imperfecciones del pocillo) en un lector de microplacas.

Cálculo:

- Registre la absorbancia obtenida de la impresión del lector de microplacas.
- Calcule la absorbancia media de cualquier medición duplicada y utilice la media para el siguiente cálculo.
- Trace el logaritmo común de la absorbancia frente a la concentración en mIU/mL para cada calibrador.
- Dibuje la curva que mejor se ajuste a través de los puntos trazados en papel cuadrículado lineal.

Límites y Rangos:

Valores Esperados:

Cada laboratorio debe establecer su propio rango de normalidad. Los valores dados a continuación son solo indicativos. Para información, el rango de niveles de insulina basal en sujetos normales fue de 3,1-25,3 mIU/L. Una hora después de la comida: 35-210 mIU/L.

Sensibilidad:

El límite de detección de la prueba es de aproximadamente 2 mIU/L.

Precisión:

Interensayo ≤15%

Referencias:

1. Eastham RD, Valores bioquímicos en medicina clínica, 7.ª edición, Bristol Inglaterra, John Wright & Sons Ltd (1985).
2. Gerbitz VKD, "Pancreatische B-zellen Peptide: Kinetic and Konzentration von Proinsulin insulin and C-peptide in Plasma and Urin Probleme der Mezmethode Klinische und Literaturubersicht", J Clin Chem Biochem, 18, 313-326 (1980).
3. Boehm TM, Lebovitz HE, "Análisis estadístico de las respuestas de glucosa e insulina a la tobutamida intravenosa: evaluación de estados hipoglucémicos e hiperinsulinémicos", Diabetes Care, 479-490, (1979).
4. Comité Nacional de Estándares de Laboratorio Clínico, "Procedures for the collection of diagnostic blood especímenes por punción venosa: normas aprobadas", 4.ª edición, documento H3-A4 del NCCLS, Wayne PA (1998).
5. Turkington RW, Estkowski A, Link M, "Secreción de insulina o péptido conector; un predictor de insulina dependencia de diabéticos obesos", Archives of Internal Med, 142, 1102-1105 (1982).
6. Sacos BD: Carbohidratos En Burtis, C.A. y Ashwood, AR (Eds) Tietz, Textbook of Clinical Chemistry, 2nd Ed, Filadelfia, WB Saunders Co (1994).
7. Kahn CR, Rosenthal AS, "Reacciones inmunológicas a la insulina, alergia a la insulina, resistencia a la insulina y autoinmunidad síndrome de insulina". Diabetes Care 2, 283-295 (1979).

