

## **INTENCIÓN DE USO**

El equipo de Insulina CLIA se destina para la determinación cuantitativa de concentración de Insulina (INS) en suero humano.

## **RESUMEN Y APLICACIÓN**

La insulina es un miembro estructuralmente relacionado con proteínas reguladoras; otras proteínas de este grupo incluyen factores de crecimiento similares a la insulina y relaxina. La insulina es producida por las células  $\beta$ -de los islotes pancreáticos y es sintetizada inicialmente como una pre-prohormona de 12kDa, la cual se transforma mediante un proceso intracelular a una prohormona de 9kDa, 86-aminoácidos y posteriormente envasado en gránulos de almacenamiento. Dentro de estos gránulos, se forman bonos de disulfuro entre las cadenas A y B de la molécula de insulina y la región péptido C es exfoliado, resultando en 51-aminoácidos, 6 kDa molécula de insulina madura. Tras la estimulación, las células islote liberan de forma equimolar cantidades de insulina y péptido-C, y pequeñas cantidades de pro insulina y otras intermedias (<5% del total normal la secreción de insulina).

La concentración de insulina circulatoria estimulada por basales y glucosa son relativamente estables durante la infancia y la niñez, y aumentan durante la pubertad debido a la disminución de cierta sensibilidad a la insulina. Las concentraciones de insulina tienden a ser mayores en personas obesas, en particular los que tienen una mayor proporción de grasa visceral (abdominal).

Las hormonas contraregulatorias de la glucosa como glucagones, glucocorticoides, la hormona del crecimiento y epinefrina, al disminuyen la sensibilidad a la insulina y su actuar; los niveles de insulina pueden aumentar durante la administración exógena de estas sustancias. La medición de las concentraciones circulantes de insulina puede ser útil en la evaluación diagnóstica de varias condiciones. Los elevados niveles séricos de insulina en presencia de bajas concentraciones de glucosa pueden ser indicativo de hiperinsulinismo patológico, por ejemplo, nesidioblastosis y células tumorales de los islotes.

Las concentraciones séricas elevadas de insulina en ayunas con niveles normales o concentraciones elevadas de glucosa e insulina y la respuesta exagerada de la glucosa e insulina a administración exógenas de glucosa son característicos de los insulino-resistentes; formas de intolerancia a la glucosa y la diabetes melitus y otras condiciones resistentes a la insulina. Las altas concentraciones de circulantes de insulina pueden estar involucradas en la patogénesis de la hipertensión y las enfermedades cardiovasculares.

Anticuerpos endógenos Antic-insulina pueden ser observados en las fases sintomáticas y pre-diabéticas de diabetes mellitus dependiente de insulina, presumiblemente debido a un desorden auto inmune. Los anticuerpos anti-insulina son comúnmente observados en pacientes tratados con insulina, estos anticuerpos pueden interferir con inmunoensayos para insulina, las técnicas de este describen la remoción de los anticuerpos previos al ensayo para lograr un ambiente libre de insulina. La presencia de proinsulina excedente y variables genéticas de insulina pueden también interferir en la estimación de insulina.

## **PRINCIPIO DEL ENSAYO**

La prueba de Insulina (INS) CLIA es una fase sólida de dos sitios de inmunoensayo. Además, un anticuerpo monoclonal se aplica sobre la superficie de los micropocillos, otro anticuerpo monoclonal marcado con peroxidasa de rábano picante se usa como trazador. Las moléculas de Insulina en la solución estándar o suero forman un "sandwich" entre los dos anticuerpos. Después de la formación de la cubierta del anticuerpo-antígeno-anticuerpo-enzima compleja, la enzima-anticuerpo sin consolidar se elimina por medio del lavado.

La actividad de peroxidasa de rábano unido en los micropozos es analizada con las reacciones de Quimioluminiscencia.

La unidad de luz relacionada (URL) a la reacción es proporcional a la concentración de INS en la muestra.

## **MATERIALES SUMINISTRADOS**

1. Placa de microtitulación recubierta con anticuerpo monoclonal de insulina (anti INS MAb) Pozos cubiertos (1 plato, 96 pozos)
2. Reactivo conjugado enzimático: peroxidasa de rábano picante (HRP) anticuerpo anti-INS (ACM) en la estabilización de Buffer (1 vial, 6.0 ml)
3. Estándares de Referencia: 5, 20, 50, 100, 200  $\mu$ IU/ml (5 viales, liofilizado)
4. Sustrato A: (1 vial, 6.0 ml)
5. Sustrato B: (1 vial, 6.0 ml)
6. PBS-T Buffer (2 frascos, 5 gr.)

## **MATERIALES REQUERIDOS PERO NO SUMINISTRADOS**

1. Pipetas de precisión y puntas: 0.1 ml, 0.05 ml, 1.0 ml.
2. Agua destilada.
3. Mezclador Vórtex o equivalente
4. Papel absorbente o una toalla de papel.
5. Papel para gráfica.
6. Un Luminómetro.

## **RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA**

1. La sangre se debe extraer usando cierta técnica estándar de venopunción y el suero debe ser separado tan pronto como sea posible. Se debe evitar totalmente hemólisis, lipemia o turbidez en las muestras.
2. Las muestras que son recogidas en tubos que contiene EDTA, heparina, oxalato pueden interferir con los procedimientos del ensayo y por lo tanto debe evitarse.
3. Las muestras se pueden almacenar hasta 48 horas a 2-8°C, antes de ensayo. Los especímenes retenidos para un tiempo más largo pueden ser congelados a -20°C. Las muestras deben ser mezcladas antes de la prueba.

## **ALMACENAMIENTO DE EQUIPO E INSTRUMENTACIÓN**

1. El equipo (antes de ser abierto) debe guardarse a 2-8°C a partir de la recepción, y la placa debe guardarse en una bolsa sellada con desecantes para minimizar la exposición a la humedad del aire. El equipo se puede utilizar dentro de la fecha de caducidad que viene señalada. Se debe consultar la etiqueta del frasco para la fecha de caducidad.
2. El equipo una vez abierto se tendrá que mantener estable hasta que expire la fecha indicada, siempre y cuando se almacene según lo estipulado anteriormente.

### PREPARACIÓN DEL REACTIVO

1. Todos los reactivos deben de ser sometidos a una temperatura ambiente (18-25°C) antes de su uso. Todos los reactivos deben mezclarse suavemente antes de su uso. No inducir la formación de espuma.
2. Para preparar Buffer de Lavado: se debe añadir un frasco de Lavado de concentrado a 500 ml de agua destilada y después se debe mezclar bien. El Buffer de lavado se mantiene estable a una temperatura ambiente, por lo menos durante un par de semanas.

### PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

1. Asegurar el número deseado de micropozos con revestimiento dentro del receptor. Dispensar 50 µl de estándares, muestras, y los controles en los micropocillos apropiados.
2. Dispensar 50 µl del reactivo conjugado enzimático a cada uno de los micropozos. Mezclar suavemente durante 30 segundos.
3. Incubar a 37°C por 60 minutos.
4. Al final de la incubación, se debe retirar la mezcla vaciando el contenido de la placa en un contenedor de residuos.
5. Enjuagar y vaciar la placa 5 veces con solución de lavado de amortiguación.
6. Colocar la placa sobre un papel absorbente o toalla de papel para eliminar todas las gotas de agua residual. El volumen del micropozo es de aproximadamente 300 µl.
7. Dispensar 50 µl de sustrato A y 50 µl de sustrato B. Mezclar suavemente durante 10 segundos.
8. Se debe incubar a una temperatura ambiente en la oscuridad durante 5 minutos y sin agitar. Leer los valores de RLU con un Luminómetro.

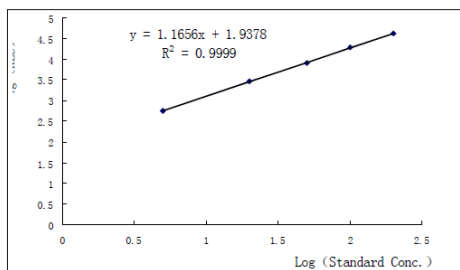
### NOTAS IMPORTANTES

1. El procedimiento de lavado es fundamental. La insuficiencia de lavado se traducirá en mala precisión y lecturas de absorbancia falsamente elevadas.
2. Se recomienda que no más de 32 micropozos sean utilizados para cada ensayo, si el pipeteado es manual, ya que las muestras y los controles deben ser completados dentro de 5 minutos. Una placa de 96 pocillos pueden utilizarse si el pipeteado es automático.
3. La duplicación de todos los estándares y muestras, aunque no es obligatorio, se recomienda.

### CÁLCULO DE RESULTADOS

Se debe construir una curva estándar trazando el RLU obtenido a partir de cada estándar de referencia en contra de su concentración en µIU/ml en papel logarítmico cuadrado, con valores RLU en la vertical o eje Y las concentraciones en la horizontal o eje X. Utilice el RLU valores para cada muestra para determinar la concentración correspondiente de la INS en µIU/ml de la curva estándar. Cualquier espécimen diluido debe ser corregido por el factor de disolución apropiado.

INS (ng/ml)	RLU
5	561.2
20	2,885.2
50	8,186.5
100	18,935.5
200	41,102.3



### VALORES DE REFERENCIA

Cada laboratorio debe establecer sus propios rangos normales sobre la base de la población de pacientes. El rango normal es de entre 2.0 µIU/ml y 20 µIU/ml, que fueron determinados mediante pruebas de 200 muestras de suero en ayunas.

### PERFORMANCE

#### 1. Sensibilidad:

El límite de detección se calcula a partir de la curva estándar mediante la identificación de la concentración correspondiente a la media de RLU diluyente estándar (basado en 10 análisis repetidos), además de SD 2. Por lo tanto, la sensibilidad de la autodiagnóstico del kit INS CLIA se estima en no más alto que 2.5 µIU/ml.

#### 2. Especificidad:

No se detectaron ciertas interferencias en el desempeño de INS en CLIA, con la adición de grandes cantidades de las siguientes sustancias en suero humano.

Interferencias	Concentración
Proinsulina	1,000 pmol/l

### REFERENCIAS

1. Gerich JE: hormonales de control de la homeostasis. EN Galloway JA, Potvin JH, Shuman CR: Diabetes Mellitus, novena edición. Eli Lilly Co, Indianápolis, 1988 pp 46-63
2. Rasmussen H, Zawalick KC. Ganesan S, Calle R, Zawalich fue: Fisiología y fisiopatología de la secreción de insulina. Diab Care 13:655-666,1990
3. Gammeltoft S: los receptores de insulina: vinculante cinética y la estructura-función de la relación de la insulina. Physiol Rev 64:1321-1378,1984
4. Rosen OM: Después de la insulina se une, Ciencia 237:1452-1458,1987
5. Schwartz MW, Figlewicz D, Baskin DG, Woods SC, Porte D Jr insulina en el cerebro: Un hormonal regulador del balance energético. Endocrin Rev 13:387-414,1992