

INTENCIÓN DE USO

La CLIA de péptido C (CP) de inmunoensayo de Quimioluminiscencia se ha diseñado para la determinación cuantitativa de la concentración de C-P en suero humano.

RESUMEN Y APLICACIÓN

La insulina es un miembro que estructuralmente relacionados con las proteínas reguladoras, otras proteínas de este grupo incluyen la similar a la insulina y factores de crecimiento relaxina. La insulina es producida por las células β de los islotes pancreáticos y se sintetiza inicialmente como una preprohormona 12kDa, que el peso es de 9 kDa, 86 - prohormona de aminoácidos y de envasado posterior en los gránulos de almacenamiento. Dentro de estos gránulos, el disulfuro de los enlaces se forma entre las cadenas A y B de la molécula de la insulina y la región C-péptido es escindida, dando como resultado el ácido amino-51, 6 kDa molécula de insulina madura. Tras la estimulación, las células de los islotes de liberación cantidades equimolares de insulina y péptido C, y pequeñas cantidades de proinsulina y otras intermedios (<5% de la secreción de insulina normal total). La glucosa Basal y estimulada por la que circulan las concentraciones de insulina son relativamente estables durante la infancia aumentan durante la pubertad debido a la disminución de sensibilidad a la insulina. Las concentraciones de insulina tienden a ser mayor en las personas obesas, en particular aquellos con una mayor proporción de visceral (abdominal) la grasa. Las hormonas de la glucosa contra-reguladoras, tales como glucagón, glucocorticoides, hormona de crecimiento y epinefrina, insulina y disminuir la sensibilidad a la acción, los niveles de insulina pueden aumentar durante exógenos administración de estas sustancias. La medición de las concentraciones circulantes de insulina puede ser útil en la evaluación diagnóstica de varias condiciones. Los niveles elevados de insulina en suero en presencia de concentraciones de glucosa baja pueden ser indicativo de patológicos hiperinsulinismo, por ejemplo, nesidioblastosis y el tumor de células de los islotes. Elevados niveles séricos de insulina en ayunas con las concentraciones de glucosa normales o elevadas, y la respuesta exagerada de insulina y glucosa a la administración de glucosa exógena son característicos de las formas resistentes a la insulina de la intolerancia a la glucosa y la diabetes mellitus y otras condiciones de resistencia a la insulina. Alto las concentraciones circulantes de insulina pueden ser involucradas en la patogénesis de la hipertensión y las enfermedades cardiovasculares. Por el contrario, la insulina baja concentraciones en la presencia de hiperglucemia sugieren deficiencia de insulina, por ejemplo, insulino-dependiente o Tipo I diabetes mellitus. La medición de la secreción de insulina inmediata o después de la primera fase-una carga de glucosa aguda pueden ser predictivos del tipo I de la diabetes mellitus. Aunque el péptido-C de insulina biológicamente inactivo, tiene una mayor vida media en circulación de la insulina y sufre un metabolismo hepático relativamente mínima. Además, el péptido C de los ensayos de la insulina puede ser analítica más sensible que los ensayos de la insulina. Debido a estos factores, las mediciones de péptido C de la insulina puede ser útil para evaluar la secreción de insulina en una variedad de condiciones clínicas.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

La prueba de CP CLIA es una fase sólida de dos sitios de inmunoensayo. Un anticuerpo monoclonal se aplica sobre la superficie de los pocillos de microtitulación y otro anticuerpo monoclonal marcado con peroxidasa de rábano picante se usa como trazador. Las moléculas de CP en la solución estándar o suero "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 el lavado. La actividad de peroxidasa de rábano unido en los pozos de entonces se analizó las reacciones de Quimioluminiscencia. La Unidad de Luz relacionados (URL) de la reacción es proporcional a la concentración de actual CP en la muestra.

MATERIALES SUMINISTRADOS

1. Placa recubiertas de anticuerpos monoclonales para el péptido C (anti-CP MAb) (96 pozos).
2. Reactivo conjugado enzima: peroxidasa de rábano picante (HRP) anticuerpo anti-CP MAb (1 vial, 6.0ml).
3. Referencias estándares: 0.6, 1.2, 2.4, 5, 11 ng/ml. (5 viales, liofilizado).
4. Sustrato A (1 vial / 6.0 ml).
5. Sustrato B (1 vial / 6.0 ml).
6. PBS-T en polvo (2 frascos, 5gr).

MATERIALES REQUERIDOS PERO NO SUMINISTRADOS

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

RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

1. La sangre debe extraerse utilizando técnicas estándar de punción venosa y el suero debe separarse de las células rojas tan pronto como sea posible. Se debe evitar el uso excesivo de muestras hemolíticas, lipémicas o turbias.
2. Las muestras de plasma recogidas en tubos con EDTA, heparina u oxalato pueden interferir con la prueba o procedimientos y deben de ser evitado.
3. Las muestras deben estar cerradas y se pueden almacenar hasta 48 horas a 2 ~ 8°C, antes del ensayo. Las muestras para un tiempo más largo se pueden congelar a -20°C. Las muestras descongeladas deben mezclarse antes de la prueba. Se deben evitar emplear varios ciclos de congelación y descongelación.

ALMACENAMIENTO DE EQUIPO E INSTRUMENTACIÓN

1. Los kits de prueba sin abrir deben almacenarse a 2 ~ 8°C a la recepción y la microplaca se debe mantener en una bolsa sellada con desecantes para minimizar la exposición a la humedad del aire. El equipo de prueba se puede utilizar hasta la fecha de vencimiento de la prueba. Consulte la etiqueta del envase para ver la fecha de vencimiento.
2. Los equipos de prueba que son abiertos, son estables hasta la fecha de expiración mostrada, siempre que se almacena de la forma prescrita anteriormente.

PREPARACIÓN DEL REACTIVO

1. Todos los reactivos deben estar a una temperatura ambiente (18 ~ 25°C) antes de su uso. Todos los reactivos deben de ser mezclados suavemente a través de inversión o girando antes de su uso. No inducir a la formación de espuma.
2. Para preparar el buffer de lavado: añadir un frasco de lavado a 500 ml de agua destilada, y mezclar bien. El buffer de lavado es estable a temperatura ambiente, por lo menos durante dos semanas.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

1. Identificar el número de micropozos. Dispense 50 μ l de estándares de referencia, muestras y controles en los pozos determinados.
2. Dispense 50 μ l de reactivo conjugado enzimático a cada pocillo. Mezclar suavemente durante 30 segundos.
3. Incubar a 37°C durante 60 minutos.
4. Al final de la incubación, se elimina la mezcla de incubación al vaciar el contenido en una placa de residuos de envases.
5. Enjuagar y vaciar la microplaca 5 veces con buffer de lavado. Colocar los micropozos sobre papel absorbente o toallas de papel para eliminar todas las gotas de agua residual. El volumen de cada micropozo es de 350 μ l.
6. Dispensar 50 μ l de sustrato A y 50 μ l de sustrato B en cada micropocillo. Mezclar suavemente durante 10 segundos.
7. Incubar a temperatura ambiente en la oscuridad durante 5 minutos sin agitación y posteriormente leer los valores de RLU con un Luminómetro.

NOTAS IMPORTANTES

1. El procedimiento de lavado es crítico. Un lavado insuficiente producirá una mala precisión y elevados valores de RLU.
2. Se recomienda que no más de 32 micropozos se utilicen para cada ensayo, el pipeteo de todos los estándares, muestras y controles debe de ser completados dentro de 5 minutos. Un placa completa de 96 pozos pueden realizarse de manera sencilla si el pipeteo es automático.
3. La duplicación de todos los estándares y las muestras, aunque no es obligatorio, se recomienda.

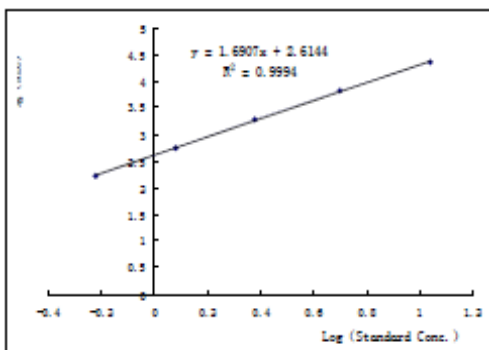
CÁLCULO DE RESULTADOS

1. Calcular el valor medio de todos los reactivos duplicados. En dado caso, los valores promedios deben de ser utilizados para el trazado.
2. Trazar el log10RLU para cada estándar de referencia contra el logaritmo común de la correspondiente concentración de la CP en ng/ml en el papel gráfico, con valores de RLU en el eje y y concentración en el eje x.
3. Lea la concentración de cada control y la muestra por interpolación en la curva de calibración.
4. El uso de la computadora puede llegar a simplificar estos cálculos. Si el proceso que se utiliza es automático, se recomienda una función de regresión lineal para ajustar la curva.

EJEMPLO DE LA CURVA ESTÁNDAR

A continuación, se muestra una curva típica estándar para fines de ilustración solamente, y nunca se debe utilizar en lugar de la curva de calibración real.

C-P (ng/ml)	RLU
0.6	168.7
1.2	549.4
2.4	1,917.0
5	6,537.4
11	224,267.7



VALORES DE REFERENCIA

Cada laboratorio debe establecer su propio rango normal, basado en la población de pacientes. El rango normal es de entre 0.4 ng/ml y 5.7 ng/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 de calibración mediante la identificación de la concentración correspondiente a la media de diluyente estándar RLU (basado en 10 análisis repetidos), además de SD 2. Por lo tanto, la sensibilidad de CP CLIA kit se estima en no más alto que 0.3ng/ml.

2. Especificidad:

No se detectó interferencia con el desempeño de autobiografía CP CLIA con la adición de ciertas grandes cantidades de las siguientes sustancias de suero humano.

INTERFERENCIAS	CONCENTRACIÓN
Proinsulina	1000 pmol/l

3. Precisión:

Intra-ensayo de precisión se determinó analizando 20 repeticiones de cada uno de los sueros de control.

Suero	Número	Media	SD	CV%
Bajo	20	2.01	0.09	4.37
Alto	20	4.66	0.25	5.48

Inter-ensayo de precisión se determinó analizando duplicados de cada uno de los sueros de control en 10 carreras por separado.

Suero	Número	Media	SD	CV%
Bajo	10	1.78	0.13	7.11
Alto	10	4.06	0.26	6.53

4. Alta dosis de efecto gancho:

En este ensayo de CP, las muestras de pacientes se disparó a niveles de PC de hasta 21 ng/ml no demuestran aparadoxical disminución de la RLU's (alto efecto gancho de la dosis).

5. Precisión:

Para las muestras en el rango de 0.3 ng/ml a 11 ng/ml, la correlación entre la autobiografía y el kit de CP CLIA, se describen mediante la ecuación:

Referencia	No. de Muestras	Análisis de Regresión	Coefficiente de Correlación
Beckman acceso 2	180	Y=0.9385x + 1.0452	0.9688

LIMITACIONES

1. Los resultados confiables y reproducibles serán obtenidos cuando el procedimiento del ensayo se lleve con una completa comprensión del prospecto y con el cumplimiento de las buenas prácticas de laboratorio.
2. Los anticuerpos heterófilos en el suero humano pueden reaccionar con el reactivo de inmunoglobulinas, lo que interfiere con la de vitro inmunoensayos. Los pacientes expuestos rutinariamente a los animales o productos de origen animal o suero puede ser propensos a esta interferencia con valores anómalos por lo tanto se pueden observar. Información adicional puede ser necesaria para el diagnóstico.

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, Zawalik 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