



DCM076-10

Ed. 03/2024

INSULIN ELISA

per analisi di routine

Determinazione immunoenzimatica diretta del livello di insulina nel siero o plasma umano

IVD

LOT

Vedere etichetta esterna

2°C 8°C

 $\Sigma = 96$ test

REF DKO076

1. SCOPO PREVISTO

Per uso diagnostico *in vitro*

Per uso professionale in laboratorio

Insulin ELISA è un dispositivo diagnostico manuale *in vitro* destinato alla determinazione quantitativa di insulina nel siero o nel plasma umano da una popolazione adulta. I risultati devono essere impiegati in associazione ad altri dati clinici e di laboratorio come ausilio nella diagnosi di diabete mellito e ipoglicemia.

2. RILEVANZA CLINICA

Tutti gli organi e i tessuti corporei traggono la propria energia principalmente dal glucosio. Le fonti del glucosio corporeo sono l'apporto alimentare, il glicogeno endogeno e il glucosio derivato dalla gluconeogenesi.

Nella condizione di digiuno, nelle prime 8-12 ore il fegato diventa la prima fonte di glucosio attraverso la glicogenolisi. Durante il digiuno, i livelli di glucosio e quindi di insulina diminuiscono mentre i livelli degli ormoni controregolatori, come l'adrenalina che inibisce la secrezione di insulina, cominciano ad aumentare per aiutare a mantenere la normoglicemia.

Durante l'alimentazione, l'insulina è l'ormone principale nel controllo del metabolismo del glucosio. Dopo un pasto a base di carboidrati, i livelli di glucosio aumentano e stimolano la secrezione di insulina.

L'insulina è un ormone prodotto dalle cellule beta del pancreas: stabilizza i livelli di glucosio nel sangue promuovendo l'assunzione del glucosio a livello cellulare, l'accumulo di glicogeno nel fegato e l'assorbimento del glucosio da parte dei muscoli e del tessuto adiposo, inoltre inibisce la produzione epatica di glucosio.

Nel diabete le funzioni delle cellule beta sono di solito compromesse così come la secrezione di insulina e quindi i livelli di glucosio nel sangue^{1,2}. L'insulinorestenza in un primo momento causa un aumento della produzione di insulina per mantenere una condizione di quasi normoglicemia. Il diabete si sviluppa a seguito di un'ulteriore compromissione dell'insulinorestenza della funzione beta-cellulare, con conseguente graduale deterioramento delle cellule beta secernenti insulina e perdita completa del controllo dei livelli di glucosio nel sangue^{3,4}. Prima di sviluppare il diabete di tipo 2 conclamato³ in genere si verifica una fase di alterata tolleranza al glucosio e di aumento dei livelli di glucosio plasmatico a digiuno.

La secrezione di insulina è anche compromessa in caso di diabete mellito gestazionale (DMG). Il DMG è un disturbo eterogeneo che si verifica in circa il 7-10% di tutte le gravidanze⁵.

I livelli di insulina sono anche alterati in caso di ipoglicemia, una condizione caratterizzata da un livello di glucosio nel sangue inferiore al normale e da livelli di insulina anormalmente elevati.

L'ipoglicemia è di solito causata da terapie per il diabete, per esempio una dose di insulina troppo alta, un'assunzione inadeguata di cibo dopo l'assunzione di farmaci per il diabete o, in rari casi, dall'insulinoma, un cancro del pancreas che provoca la secrezione di quantità anormali di insulina da parte delle cellule beta. Le misurazioni dei livelli di insulina, insieme ad altri dati clinici e di laboratorio, possano supportare la diagnosi di ipoglicemia nei pazienti che mostrano manifestazioni cliniche tipiche^{2, 6-9}.

3. PRINCIPIO DEL METODO

Il test Insulin ELISA è un dosaggio a sandwich basato sul legame simultaneo dell'insulina umana a due anticorpi monoclonali, uno immobilizzato sulla piastra del micropozzetto, l'altro coniugato con perossidasi di rafano (HRP).

Dopo l'incubazione, la separazione del legato dal libero viene eseguita con un semplice lavaggio della fase solida. Quindi, l'enzima HRP nella parte libera reagisce con il substrato (H_2O_2) e il substrato TMB e sviluppa un colore blu che cambia in giallo quando viene aggiunta la soluzione di arresto (H_2SO_4). L'intensità del colore è proporzionale alla concentrazione di insulina nel campione.

La concentrazione di insulina nel campione viene calcolata attraverso una curva di calibrazione.

4. REATTIVI, MATERIALI E STRUMENTAZIONE

4.1. Reattivi e materiali forniti nel kit

1. Calibrators (6 flaconi, 1 mL ciascuno)

ProClin >0,0015%, BSA 1%

CAL0

CAL1

CAL2

CAL3

CAL4

CAL5

REF DCE002/7606-0

REF DCE002/7607-0

REF DCE002/7608-0

REF DCE002/7609-0

REF DCE002/7610-0

REF DCE002/7611-0

2. Controlli (1 fiala, 1 mL)

La concentrazione del controllo è indicata sul Certificato di analisi. ProClin >0.0015%, BSA 1%

REF DCE045/7603-0

3. Coniugato (1 fiala, 13 mL)

Anticorpo monoclonale anti-insulina coniugato con perossidasi di rafano (HRP). ProClin >0.0015%, BSA 0,1%

REF DCE002/7602-0

4. Micropiastra rivestita (1 micropiastra rompibile)

Anticorpo monoclonale anti-insulina adsorbito su micropiastra

REF DCE002/7603-0

5. Substrato TMB (1 fiala, 15 mL)

H₂O₂ -TMB 0,26 g/L (evitare qualsiasi contatto con la pelle). ProClin <0.0015%

REF DCE004-0

6. Soluzione di arresto (1 fiala, 15 mL)

Acido solforico 0,15 mol/L (evitare qualsiasi contatto con la pelle)

REF DCE005-0

7. Soluzione di lavaggio conc. 50X (1 fiala, 20 mL)

NaCl 45 g/L; Tween-20 55 g/L. ProClin >0.0015%

REF DCE006-0

4.2. Materiali richiesti ma non forniti

Acqua distillata

4.3. Materiali e strumentazione ausiliari

Erogatore automatico

Pipette di precisione

Lettore di micropiastre (450 nm, 620-630 nm)

5. AVVERTENZE

- Questo kit è destinato all'uso *in vitro* esclusivamente da parte di professionisti. Non per uso interno o esterno in esseri umani o animali.
- Utilizzare adeguati dispositivi di protezione individuale mentre si lavora con i reagenti forniti.
- Seguire le buone prassi di laboratorio (GLP, Good Laboratory Practice) per la manipolazione di emoderivati.
-  Il materiale di origine animale utilizzato nella preparazione del kit è stato ottenuto da animali certificati come sani e la proteina bovina è stata ottenuta da Paesi non infettati dalla BSE, ma tali materiali devono essere trattati come potenzialmente infettivi.
- Alcuni reagenti (calibratori, controllo, coniugato e soluzione di lavaggio) contengono piccole quantità di ProClin™ 300 (>0.0015%, <0,06%) come conservante. Evitare il contatto con pelle o mucose.
- Classificazione secondo il regolamento (CE) n. 1272/2008 [CLP]

Sensibilizzazione cutanea, categoria 1



Attenzione

Contiene: ProClin 300

Indicazioni di pericolo:

H317 - Può provocare una reazione allergica cutanea.

Consigli di prudenza:

P261 - Evitare di respirare la polvere / i fumi / i gas / la nebbia / i vapori / gli aerosol.

P280 - Indossare guanti/indumenti protettivi / proteggere gli occhi / proteggere il viso / proteggere l'udito.

P321 - Trattamento specifico (vedere istruzioni supplementari di pronto soccorso su questa etichetta).
P333+P313 - In caso di irritazione o eruzione della pelle: Consultare un medico.

P362+P364 - Togliere tutti gli indumenti contaminati e lavarli prima di indossarli nuovamente.

- La Stop Solution è costituita da una soluzione di acido solforico diluito. L'acido solforico è velenoso e corrosivo e può essere tossico se ingerito. Per prevenire possibili ustioni chimiche, evitare il contatto con la cute e con gli occhi.
- Evitare l'esposizione del reagente TMB/H₂O₂ a luce solare diretta, metalli o ossidanti. Non congelare la soluzione.

6. PRECAUZIONI

- Attenersi rigorosamente alla sequenza dei passaggi di pipettaggio forniti in questo protocollo. I dati sulle prestazioni qui rappresentati sono stati ottenuti utilizzando i reagenti specifici elencati in queste istruzioni per l'uso.
- Tutti i reagenti devono essere conservati refrigerati a 2-8 °C nel contenitore originale. Tutte le eccezioni sono chiaramente indicate.
- Lasciare che tutti i componenti del kit e i campioni raggiungano la temperatura ambiente (22-28 °C) e mescolare bene prima dell'uso.
- Non scambiare i componenti di kit di lotti diversi. La data di scadenza stampata sulle etichette della confezione e delle fiale deve essere rispettata. Non utilizzare alcun componente del kit dopo la data di scadenza.
- Se si utilizzano apparecchiature automatizzate, l'utente ha la responsabilità di assicurarsi che il kit sia stato adeguatamente convalidato per il suo utilizzo/scopo previsto.
- La rimozione incompleta o imprecisa del liquido dai pozzetti potrebbe influenzare la precisione del dosaggio e/o aumentare il background. Per migliorare le prestazioni del kit sui sistemi automatici, si raccomanda di aumentare il numero di lavaggi.
- È importante che il tempo di reazione in ogni pozzetto sia mantenuto costante per ottenere risultati riproducibili. Il pipettaggio dei campioni non deve andare oltre i dieci minuti per evitare deviazioni del dosaggio. Se sono necessari più di 10 minuti, seguire lo stesso ordine di erogazione. Se si utilizza più di una piastra, si raccomanda di ripetere la curva dose-risposta in ogni piastra.
- L'aggiunta della soluzione di substrato TMB avvia una reazione cinetica, che viene terminata dall'aggiunta della soluzione di arresto. Pertanto, il substrato TMB e la soluzione di arresto devono essere aggiunti nella stessa sequenza per eliminare qualsiasi deviazione temporale durante la reazione.
- Osservare le linee guida per l'esecuzione del controllo di qualità nei laboratori medici analizzando i controlli e/o i sieri in pool.
- La massima precisione è richiesta per la ricostituzione e l'erogazione dei reagenti.
- I campioni microbiologicamente contaminati, altamente lipemici, itterici o emolizzati non devono essere utilizzati nel dosaggio.
- I lettori di piastre misurano verticalmente. Non toccare il fondo dei pozzetti.
- Quando si pipettano i reagenti del dosaggio, compresi campioni, calibratori e controlli, è necessario utilizzare puntali monouso nuovi per ridurre il rischio di contaminazione da carryover. In caso contrario, i risultati potrebbero non essere validi.

7. CONSERVAZIONE E STABILITÀ DEI REAGENTI

Conservare il kit a 2-8 °C, al buio.

- Il kit è stabile a 2-8 °C fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta esterna del kit.
- Una volta aperto, il kit è stabile a 2-8 °C per 6 mesi.
- La soluzione di lavaggio diluita è stabile per 30 giorni a 2-8 °C.

Nota importante: aprire il sacchetto contenente la micropiastra rivestita solo quando è a temperatura ambiente e chiuderlo immediatamente dopo l'uso.

8. RACCOLTA E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

Il dosaggio deve essere effettuato su campioni di siero (provette di campionamento standard o provette contenenti gel per la separazione del siero) o plasma (litio eparina, sodio eparina o EDTA di potassio).

Conservazione dei campioni	Durata
2-8 °C	96 ore
Cicli di congelamento/scongelamento	3 cicli

9. PROCEDURA

9.1. Preparazione di calibratori e controlli

Prima dell'uso, miscelare delicatamente per 5 minuti con un miscelatore a rotazione. I calibratori sono pronti per l'uso e hanno le seguenti concentrazioni:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅
µIU/mL	0	3	10	30	80	200

I controlli sono pronti per l'uso; la concentrazione del controllo è stampata sull'etichetta.

9.2. Preparazione del coniugato

Pronto all'uso. Miscelare delicatamente per 5 minuti in un mixer a rotazione.

9.3. Preparazione della soluzione di lavaggio

Diluire il contenuto della fiala "Soluzione di lavaggio conc. 50X" con acqua distillata fino a un volume finale di 1000 mL prima dell'uso. Per i volumi più piccoli, rispettare il rapporto di diluizione 1:50.

È possibile osservare la presenza di cristalli all'interno della soluzione di lavaggio concentrata; in tal caso, mescolare a temperatura ambiente fino alla completa dissoluzione dei cristalli. Per una maggiore precisione, diluire l'intero flacone di soluzione di lavaggio concentrata a 1000 mL, avendo cura anche di trasferire completamente i cristalli sciaccando il flacone, quindi mescolare fino a quando i cristalli non si dissolvono completamente.

9.4. Preparazione dei campioni

La determinazione del Insulin può essere eseguita in campioni di siero o plasma umano.

Per un confronto accurato per stabilire i valori normali, prelevare un campione di siero mattutino a digiuno.

Raccogliere il sangue mediante puntura venosa in contenitori vacutainer e separare il siero (dopo la formazione del coagulo) o il plasma dalle cellule mediante centrifugazione.

Conservare il campione a -20 °C se la determinazione non viene eseguita lo stesso giorno della raccolta del campione. Prima dell'uso, miscelare delicatamente per 5 minuti con un miscelatore a rotazione.

9.5. Procedura

- **Lasciare che tutti i reagenti raggiungano la temperatura ambiente (22-28 °C) per almeno 30 minuti.** Alla fine del dosaggio, conservare immediatamente i reagenti a 2-8 °C: evitare una lunga esposizione a temperatura ambiente.
- Le strisce di micropozzetti rivestiti non utilizzate devono essere rilasciate in modo sicuro nella busta di alluminio contenente l'essiccante e conservate a 2-8 °C.
- Per evitare potenziali contaminazioni microbiche e/o chimiche, i reagenti inutilizzati non devono mai essere trasferiti nelle fiale originali.
- Poiché è necessario eseguire la determinazione in duplicato per migliorare la precisione dei risultati del test, preparare due pozzetti per ogni punto della curva di calibrazione (C₀-C₅), due per il controllo, due per ogni campione, uno per il bianco.

Reagente	Calibratore	Campione/ Controlli	Bianco
Calibratore C ₀ -C ₅	100 µL		
Campione / Controlli		100 µL	
Coniugato	100 µL	100 µL	
Incubare per 2 ore a temperatura ambiente (22- 28 °C). Rimuovere il contenuto da ogni pozzetto, lavare i pozzetti 3 volte con 300 µL di soluzione di lavaggio diluita.			
Nota importante: durante ogni fase di lavaggio, agitare delicatamente la piastra per 5 secondi e rimuovere la soluzione in eccesso picchiettando la piastra capovolta su un tovagliolo di carta assorbente.			
Lavatore automatico: se si utilizzano apparecchiature automatiche, lavare i pozzetti almeno 5 volte.			
Substrato TMB	100 µL	100 µL	100 µL
Incubare per 15 minuti, al buio, a temperatura ambiente (22-28 °C).			
Soluzione di arresto	100 µL	100 µL	100 µL
Agitare delicatamente la micropiastra Leggere l'assorbanza (E) a 450 nm contro una lunghezza d'onda di riferimento di 620-630 nm o contro il bianco entro 5 minuti.			

10. CONTROLLO QUALITÀ

Le buone prassi di laboratorio (GLP) richiedono l'inclusione di campioni per il controllo della qualità in ogni serie di dosaggi al fine di verificare le prestazioni del dosaggio. I controlli devono essere trattati come campioni sconosciuti e i risultati devono essere analizzati con metodi statistici appropriati.

I controlli forniti nel kit devono essere testati come se fossero sconosciuti e hanno lo scopo di agevolare la valutazione della validità dei risultati ottenuti in ogni piastra di dosaggio.

La concentrazione media di ciascun livello di controllo è documentata nel rapporto del controllo di qualità incluso in ciascun kit. Tali livelli di concentrazione media sono determinati in base a diversi dosaggi eseguiti in duplicato in più posizioni su ciascuna piastra.

DiaMetra raccomanda agli utenti di conservare le annotazioni grafiche dei valori di controllo generati con ciascun dosaggio, tra cui medie mobili, DS e % CV. Queste informazioni faciliteranno l'analisi delle tendenze dei controlli per quanto riguarda le prestazioni dei lotti di controllo attuali e pregressi rispetto ai dati forniti nel controllo di qualità. Le tendenze aiuteranno a identificare i dosaggi che generano valori di controllo significativamente diversi dal rispettivo intervallo medio.

Quando si interpretano i dati dei controlli, occorre tenere conto del fatto che il prodotto è stato progettato e sviluppato come prodotto per l'utilizzo manuale. L'intervallo riportato sul certificato del controllo di qualità deve essere appropriato per i dosaggi eseguiti manualmente e rispettando rigorosamente la procedura di dosaggio descritta sopra. Gli esperti del controllo di qualità riconoscono che, a causa delle differenze di condizioni e di prassi, si avrà sempre una variabilità nei valori medi e nella precisione delle misurazioni dei controlli eseguite da laboratori diversi¹⁰.

11. CALCOLO DEI RISULTATI

Le densità ottiche (DO) di alcuni calibratori e campioni possono essere superiori a 3,0, ossia potenzialmente al di fuori dell'intervallo di misurazione del lettore di micropiastre. Quando le DO sono superiori a 3,0, eseguire una lettura a 405 nm oltre a 450 nm e 620 nm (filtro di riferimento per la sottrazione delle interferenze dovute alla plastica). Per i lettori di micropiastre incapaci di leggere la piastra a 3 lunghezze d'onda allo stesso tempo.

si consiglia di procedere come segue:

- Leggere la micropiastra a 450 nm e a 620 nm.
- Leggere nuovamente la piastra a 405 nm e 620 nm.
- Individuare i pozzetti le cui DO a 450 nm sono superiori a 2,0.
- Selezionare le DO corrispondenti lette a 405 nm e moltiplicare questi valori a 405 nm per il fattore di conversione 3,0 (dove $DO_{450}/DO_{405} = 3,0$), cioè: $DO_{450\text{ nm}} = DO_{405\text{ nm}} \times 3,0$.

Avvertenza: il fattore di conversione 3,0 è solo suggerito. Per una migliore precisione, si consiglia all'utente di calcolare il fattore di conversione specifico per il proprio lettore.

Sono disponibili vari pacchetti software di elaborazione dei dati, che possono essere utilizzati per generare la curva di calibrazione media e per calcolare le concentrazioni medie di campioni e controlli sconosciuti. È necessario effettuare un adattamento della curva spline cubica, **includendo il calibratore 0**. Può essere utilizzato un adattamento della curva logistica a 4 parametri (4PL) che include il calibratore 0. Gli altri algoritmi di adattamento della curva non sono raccomandati.

In alternativa, è possibile preparare una curva di calibrazione su carta millimetrata semilogaritmica tracciando un grafico con l'assorbanza media sull'asse delle ordinate e la concentrazione dell'analita sull'asse delle ascisse. Nella curva di calibrazione deve essere incluso il calibratore 0. Leggere il valore medio dell'assorbanza di ciascun campione sconosciuto dalla curva.

Affinché i risultati del dosaggio siano considerati validi, i calibratori e i controlli del kit devono rientrare nelle specifiche riportate nel certificato di analisi specifico del lotto.

In caso contrario, i risultati dei test associati non saranno validi e i campioni dovranno essere analizzati nuovamente.

12. INTERVALLO DI MISURAZIONE

L'intervallo di misurazione del test (AMR) è 2,1-200 µIU/mL. Qualsiasi lettura di valori inferiori a 2,1 µIU/mL deve essere indicata come "< 2,1 µIU/mL".

13. METROLOGIA E TRACCIABILITÀ

I calibratori di questo kit sono tracciabili allo standard internazionale OMS per l'insulina (IS-83/500).

14. VALORI ATTESI

I seguenti intervalli sono stati determinati utilizzando il test Insulin ELISA e sono forniti unicamente a scopo informativo. L'intervallo di riferimento al 95% per gli adulti apparentemente sani relativo alla condizione di digiuno è stato calcolato attraverso un metodo non parametrico secondo le linee guida tratte dal documento CLSI C28-A3 "Defining, Establishing and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory".

	n	Mediana (µIU/mL)	Intervallo di riferimento (µIU/mL)
Adulti	119	8,8	2,1 – 27,7

Gli intervalli sopraindicati devono essere considerati solo come linee guida; si raccomanda a ogni laboratorio di stabilire i propri intervalli di valori attesi sulla base della propria popolazione di pazienti.

15. CARATTERISTICHE DI AZIONE

Sono mostrati i dati più rappresentativi delle prestazioni. I risultati ottenuti nei singoli laboratori possono variare.

15.1. Capacità di rilevamento

Il limite di bianco (LoB), il limite di rilevazione (LoD) e il limite di quantificazione (LoQ) sono stati stabiliti secondo le linee guida tratte da CLSI EP17-A, "Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation" usando 6 campioni bianchi e 6 a basso livello.

Sensibilità	Concentrazione
Limite del bianco (LoB)	1,2 µIU/mL
Limite di rilevamento (LoD)	1,8 µIU/mL
Limite della determinazione quantitativa (LoQ)	2,1 µIU/mL

15.2. Esattezza

L'esattezza è stata dimostrata attraverso un test di recupero per il test Insulin ELISA con lo standard internazionale OMS per l'insulina (IS-83/500).

15.3. Precisione

La precisione del test Insulin ELISA è stata determinata eseguendo un complesso studio di precisione.

Ripetibilità: un totale di 6 campioni di siero è stato analizzato in cinque repliche, una volta al giorno per 5 giorni da 3 operatori.

I dati di un lotto rappresentativo sono mostrati di seguito:

Campione	n	Conc. media (μ U/mL)	Intra-test (ripetibilità)	
			DS	% CV
1	75	9,2	0,5	5,3%
2	75	22,7	0,9	4,0%
3	75	36,6	1,3	3,6%
4	75	84,7	4,1	4,8%
5	75	117,3	6,8	5,8%
6	75	167,8	7,6	4,5%

Riproducibilità: un totale di 6 campioni di siero sono stati analizzati in cinque repliche, una volta al giorno per 5 giorni da 3 operatori. I risultati dei dati combinati di due lotti sono mostrati di seguito:

Campione	n	Conc. media (μ U/mL)	All'interno del laboratorio (riproducibilità)	
			DS	% CV
1	150	9,3	1,2	12,6%
2	150	22,5	1,5	6,5%
3	150	36,0	2,9	8,2%
4	150	84,0	5,8	6,9%
5	150	117,8	10,9	9,2%
6	150	169,3	17,2	10,1%

15.4. Linearità

La linearità è stata valutata in base al documento CLSI EP-06, "Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures". Per la concentrazione di insulina con il test Insulin ELISA, la procedura di misurazione mostra linearità per l'intervallo da 1,7 a 251,9 μ U/mL entro la deviazione ammissibile di linearità (ADL) di $\pm 15\%$.

15.5. Confronto del metodo

Il test Insulin ELISA è stato confrontato con un dosaggio manuale automatico quantitativo disponibile in commercio, in base al documento CLSI EP-9A, "Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples". Ogni metodo ha esaminato un totale di 41 campioni, selezionati per rappresentare un ampio intervallo di concentrazioni di insulina. L'analisi di regressione di Passing-Bablok è stata effettuata sui dati comparativi:

n	Pendenza [IC 95%]	Intercetta (ng/mL) [IC 95%]	Coefficiente di correlazione (r)
41	1,0 [0,952-1,093]	-0,6 [-1,56-0,19]	0,98

15.6. Specificità analitica

La specificità è stata valutata con i seguenti reagenti crociati.

Reagente crociato	Concentrazione testata (unità)	Reattività crociata media %
Peptide C	100 ng/mL	-0,1%
Proinsulina	1.000 ng/mL	0,1%
Insulina glargine	1.000 μ U/mL	23,7%

Le seguenti sostanze non interferiscono con un bias $> \pm 15\%$ nel test Insulin ELISA quando le concentrazioni sono inferiori alla soglia dichiarata presentata nella tabella seguente.

Reagente potenzialmente interferente	Concentrazione di soglia
Bilirubina, coniugata	15 mg/dL
Bilirubina, non coniugata	15 mg/dL
Emoglobina	200 mg/dL
Proteine totali	8,3 g/dL
Trigliceridi	500 mg/dL

15.7. Studio su siero-plasma

È stato condotto uno studio di confronto tra matrici del test Insulin ELISA per valutare la differenza tra i tipi di provette (provette per la separazione del siero (SST), per plasma in litio eparina, per plasma in sodio eparina e plasma in K2 EDTA) rispetto ai campioni di controllo (siero tappo rosso, senza additivo) secondo le linee guida CLSI EP9-A3. È stato valutato un totale di 20 campioni (16 nativi, 4 additivi) per coprire l'intervallo del test. L'analisi di regressione lineare è stata effettuata su dati comparativi:

Tipo di campione	Pendenza [IC 95%]	Intercetta (ng/mL) [IC 95%]	Coefficiente di correlazione (r)
SST	1,0 [Da 0,92 a 1,02]	0,3 [Da -1,41 a 2,01]	0,99
Litio eparina	1,0 [Da 0,93 a 1,09]	-1,8 [Da -4,56 a 0,87]	0,99
Sodio eparina	1,0 [Da 0,90 a 1,04]	-1,4 [Da -3,86 a 1,13]	0,99
EDTA	1,1 [Da 1,04 a 1,18]	1,3 [Da -1,28 a 3,80]	0,99

15.8. Effetto hook

L'effetto hook è stato analizzato usando concentrazioni di insulina fino a 25.000 µIU/mL. Non è stato osservato alcun effetto hook.

16. LIMITAZIONI D'USO

- Come nel caso di qualsiasi procedura diagnostica, i risultati devono essere interpretati unitamente ai dati clinici del paziente e alle altre informazioni a disposizione del medico.
- Non sono state stabilite le caratteristiche di azione di questo dosaggio nella popolazione pediatrica.
- Gli anticorpi eterofili nel siero umano possono reagire con le immunoglobuline dei reagenti, interferendo con gli immunodosaggi *in vitro*¹¹. I pazienti regolarmente esposti agli animali o a prodotti derivati da siero animale possono essere soggetti a questa interferenza, quindi si potrebbero osservare valori anomali.

17. GESTIONE DEI RIFIUTI

I reagenti devono essere smaltiti in conformità alle normative locali.

Tutti i materiali che sono entrati in contatto con i campioni e i reagenti devono essere smaltiti in conformità con le normative nazionali, regionali e locali.

18. BIBLIOGRAFIA

1. Khan RMM, Chua ZJY, Tan JC, Yang Y, Liao Z, Zhao Y. From Pre-Diabetes to Diabetes: Diagnosis, Treatments and Translational Research. *Medicina* (Kaunas). 2019 Aug 29;55(9):546
2. Pourmotabbed G, Kitabchi AE. Hypoglycemia. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 2001 Jun;28(2):383-400.
3. Göke B. Implications of blood glucose, insulin resistance and beta-cell function in impaired glucose tolerance. *Diabetes Res Clin Pract.* 1998 Jul;40 Suppl:S15-20.
4. Rett K, Wicklmayr M, Mehnert H. What is the clinical significance of insulin resistance? *J Cardiovasc Pharmacol.* 1992;20 Suppl 11:S22-6.
5. Behboudi-Gandevani, S., Amiri, M., Bidhendi Yarandi, R. et al. The impact of diagnostic criteria for gestational diabetes on its prevalence: a systematic review and meta-analysis. *Diabetol Metab Syndr* 11, 11 (2019).
6. John Service F. Hyperinsulinemic hypoglycemia in adults. *Ann Endocrinol (Paris).* 2004 Feb;65(1):88-95.
7. Service FJ. Hypoglycemias. *West J Med.* 1991 Apr;154(4):442-54.
8. Service FJ. Hypoglycemia. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 1997 Dec;26(4):937-55.
9. Field JB. Hypoglycemia. Definition, clinical presentations, classification, and laboratory tests. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 1989 Mar;18(1):27-43.
10. Basic QC Practices On-line Course; <http://www.Westgard.com>.
11. Boscatto, LM. and Stuart, MC., 'Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays'. *Clin Chem*, 34, 1988, pp 27-33

19. IDENTIFICATORE DELLE REVISIONI

Le aggiunte o le modifiche alle istruzioni per l'uso sono indicate dall'evidenziazione in grigio.

20. RECLAMI SUI PRODOTTI E SUPPORTO TECNICO

Per un paziente/utente/terza parte nell'Unione Europea e nei Paesi con un regime normativo simile (Regolamento 2017/746/UE relativo ai dispositivi medico-diagnostici *in vitro*); se, durante l'uso di questo dispositivo o come risultato del suo utilizzo, si è verificato un incidente grave, segnalarlo al produttore e/o al suo rappresentante autorizzato e all'autorità normativa nazionale.

Il produttore può essere contattato tramite il relativo servizio clienti o il team di supporto tecnico. I dettagli di contatto sono disponibili di seguito e sul sito Web dell'azienda: www.diametra.com.

Ed. 03/2024

DCM076-10



DCM076-10

Ed. 03/2024

INSULIN ELISA

for routine analysis

Direct immunoenzymatic detection of insulin level in human serum or plasma

IVD

LOT

See external label

2°C  8°C $\Sigma = 96$ tests

REF DKO076

1. INTENDED PURPOSE

For *In Vitro* Diagnostic Use
For Laboratory Professional Use

Insulin ELISA is a manual *in vitro* diagnostic device intended for the quantitative determination of insulin in human serum or plasma from an adult population. Results are to be used in conjunction with other clinical and laboratory data as an aid in the diagnosis of diabetes mellitus and hypoglycaemia.

2. CLINICAL SIGNIFICANCE

All body organs and tissues derive their energy primarily from glucose. The sources of body glucose are dietary intake, endogenous glycogen and glucose derived from gluconeogenesis.

During a fasting state, the liver becomes the first source of glucose through glycogenolysis during the first 8 to 12 hours of fasting. During fasting, glucose and thus insulin levels decrease while counterregulatory hormone levels, such as epinephrine which inhibits insulin secretion, begin to rise to help maintain normoglycemia.

During the fed state, insulin is the main hormone in controlling glucose metabolism. After a meal containing carbohydrate, glucose levels increase and stimulate insulin secretion.

Insulin is a hormone produced by beta cells of the pancreas that stabilise blood glucose levels by directing the cells to take up glucose, promoting hepatic storage as glycogen, glucose uptake by muscles and adipose tissue and by inhibiting hepatic glucose production.

In the context of diabetes, beta cell functions are usually impaired as well as insulin secretion and thus blood glucose levels^{1,2}. Insulin resistance leads at first to an increased insulin production to maintain a near-normoglycaemia. Diabetes then results from a further deterioration of insulin resistance of beta cell function, leading to a gradual deterioration of insulin-secreting beta cells and to a complete loss of blood glucose level control^{3,4}. Affected individuals usually pass through a phase of impaired glucose tolerance and increased fasting plasma glucose levels before developing overt type 2 diabetes³.

Insulin secretion is also impaired in the context of gestational diabetes mellitus (GDM). GDM is a heterogenous disorder that occurs in around 7 – 10% of all pregnancies⁵.

insulin levels are also altered in the context of hypoglycaemia, a condition characterised by a blood glucose level lower than normal and abnormally high insulin levels.

Hypoglycaemia is usually caused by diabetes-related treatments, for example an excessively high insulin dose, an inadequate food intake after taking diabetes medication or, in rare cases, by insulinoma, a pancreatic cancer where beta cells secrete abnormal amounts of insulin. Measurements of insulin levels are considered, together with other clinical and laboratory data, to help in the diagnosis of hypoglycaemia in patients that show typical clinical manifestations^{2,6-9}.

3. PRINCIPLE OF THE METHOD

The Insulin ELISA is a sandwich assay based on simultaneous binding of human insulin to two monoclonal antibodies, one immobilised on the microwell plate and the other conjugated with horseradish peroxidase (HRP).

After the incubation, the bound/free separation is performed by a simple solid phase washing. Then, the enzyme HRP in the bound fraction reacts with the Substrate (H_2O_2) and the TMB Substrate and develops a blue colour that changes into yellow when the Stop Solution (H_2SO_4) is added. The colour intensity is proportional to the insulin concentration in the sample.

Insulin concentration in the sample is calculated through a calibration curve.

4. REAGENTS, MATERIALS AND INSTRUMENTATION

4.1. Reagents and materials supplied in the kit

1. Calibrators (6 vials, 1 mL each)

ProClin >0.0015%, BSA 1%

CAL0	REF DCE002/7606-0
CAL1	REF DCE002/7607-0
CAL2	REF DCE002/7608-0
CAL3	REF DCE002/7609-0
CAL4	REF DCE002/7610-0
CAL5	REF DCE002/7611-0

2. Control (1 vial, 1 mL)

Concentration of Control is indicated on the Certificate of Analysis. ProClin >0.0015%, BSA 1%

REF DCE045/7603-0

3. Conjugate (1 vial, 13 mL)

Monoclonal anti- Insulin conjugated with horseradish peroxidase (HRP). ProClin >0.0015%, BSA 0.1%

REF DCE002/7602-0

4. Coated Microplate (1 microplate breakable)

Monoclonal anti- Insulin adsorbed on microplate

REF DCE002/7603-0

5. TMB Substrate (1 vial, 15 mL)

H₂O₂-TMB (0.26 g/L) (avoid any skin contact)

ProClin <0.0015%

REF DCE004-0

6. Stop Solution (1 vial, 15 mL)

Sulphuric acid 0.15M (avoid any skin contact)

REF DCE005-0

7. 50X Conc. Wash Solution (1 vial, 20 mL)

NaCl 45 g/L; Tween-20 55 g/L. ProClin >0.0015%

REF DCE006-0

4.2. Materials required but not provided

Distilled water

4.3. Auxiliary materials and instrumentation

Automatic dispenser

Precision Pipetting Devices

Microplate reader (450 nm, 620-630 nm)

5. WARNINGS

- This kit is intended for *in vitro* use by professional persons only. Not for internal or external use in Humans or Animals.
- Use appropriate personal protective equipment while working with the reagents provided.
- Follow Good Laboratory Practice (GLP) for handling blood products.
-  Material of animal origin used in the preparation of the kit has been obtained from animals certified as healthy and the bovine protein has been obtained from countries not infected by BSE, but these materials should be handled as potentially infectious.
- Some reagents (calibrators, controls, conjugate and wash solution) contain small amounts of ProClin™ 300 (>0.0015%, <0.06%) as preservative. Avoid contact with skin or mucosa.

- Classification according to Regulation (EC) No. 1272/2008 [CLP]

Skin sensitivity, Category 1



Warning

Contains: ProClin 300

Hazard statements:

H317 - May cause an allergic skin reaction.

Precautionary statements:

P261 - Avoid breathing dust / fume / gas / mist / vapours / spray.

P280 - Wear protective gloves/ protective clothing / eye protection / face protection / hearing protection.

P321 - Specific treatment (see supplemental first aid instruction on this label).

P333+P313 - If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/attention.

P362+P364 - Take off contaminated clothing and wash it before reuse.

- The Stop Solution consists of a diluted sulphuric acid solution. Sulphuric acid is poisonous, corrosive and can be toxic if ingested. To prevent chemical burns, avoid contact with skin and eyes.
- Avoid the exposure of reagent TMB/H₂O₂ to direct sunlight, metals or oxidants. Do not freeze the solution.

6. PRECAUTIONS

- Please adhere strictly to the sequence of pipetting steps provided in this protocol. The performance data represented here were obtained using specific reagents listed in this Instruction For Use.
- All reagents should be stored refrigerated at 2 – 8°C in their original container. Any exceptions are clearly indicated.
- Allow all kit components and specimens to reach room temperature (22 – 28°C) and mix well prior to use.
- Do not interchange kit components from different lots. The expiry date printed on box and vials labels must be observed. Do not use any kit component beyond their expiry date.
- If you use automated equipment, the user has the responsibility to make sure that the kit has been appropriately validated for its intended use/purpose.
- The incomplete or inaccurate liquid removal from the wells could influence the assay precision and/or increase the background. To improve the performance of the kit on automatic systems is recommended to increase the number of washes.
- It is important that the time of reaction in each well is held constant for reproducible results. Pipetting of samples should not extend beyond ten minutes to avoid assay drift. If more than 10 minutes are needed, follow the same order of dispensation. If more than one plate is used, it is recommended to repeat the dose response curve in each plate
- Addition of the TMB Substrate solution initiates a kinetic reaction, which is terminated by the addition of the Stop Solution. Therefore, the TMB Substrate and the Stop Solution should be added in the same sequence to eliminate any time deviation during the reaction.

- Observe the guidelines for performing quality control in medical laboratories by assaying controls and/or pooled sera.
- Maximum precision is required for reconstitution and dispensation of the reagents.
- Samples microbiologically contaminated, highly lipemic, icteric or haemolysed should not be used in the assay.
- Plate readers measure vertically. Do not touch the bottom of the wells.
- Fresh disposable tips must be used when pipetting assay reagents including samples, calibrators and controls to mitigate the risk of carryover contamination. Failure to do so may lead to invalid results.

7. REAGENT STORAGE AND STABILITY

Store the kit at 2 – 8°C in the dark.

- The kit is stable at 2 – 8°C until the expiry date stated on the external kit label.
- Once opened, the kit is stable at 2 – 8°C for 6 months.
- The diluted wash solution is stable for 30 days at 2 – 8°C.

Important note: open the bag containing the Coated Microplate only when it is at room temperature and close it immediately after use.

8. SAMPLE COLLECTION AND STORAGE

The assay should be performed using serum (standard sampling tubes or tubes containing serum separating gel) or plasma (lithium heparin, sodium heparin or potassium EDTA) samples.

Sample Storage	Duration
2 – 8 °C	96 hours
Freeze/thaw cycles	3 cycles

9. PROCEDURE

9.1. Preparation of Calibrators and Controls

Before use, mix for 5 minutes with a rotating mixer. The calibrators are ready for use and have the following concentration:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅
µIU/mL	0	3	10	30	80	200

The control is ready to use; the concentration is printed on the label.

9.2. Preparation of the Conjugate

The conjugate is ready to use.

9.3. Preparation of the Wash Solution

Dilute the content of the vial "50X Conc. Wash Solution" with distilled water to a final volume of 1000 mL prior to use. For smaller volumes respect the 1:50 dilution ratio.

It is possible to observe the presence of crystals within the concentrated wash solution; in this case mix at room temperature until the complete dissolution of crystals. For greater accuracy, dilute the whole bottle of concentrated

wash solution to 1000 mL, taking care also to transfer crystals completely by rinsing of the bottle, then mix until crystals are completely dissolved.

9.4. Preparation of Samples

The determination of insulin can be performed in human serum (standard sampling tubes or tubes containing serum separating gel) or plasma (lithium heparin, sodium heparin or potassium EDTA) samples.

For accurate comparison to establish normal values, a fasting morning serum sample should be obtained.

Collect blood by venepuncture into vacutainers and separate serum (after clot formation) or plasma from the cells by centrifugation.

Store the sample at -20°C if the determination is not performed on the same day of the sample collection. Before using, mix gently, for 5 minutes, with a roller mixer.

9.5. Procedure

- **Allow all reagents to reach room temperature (22 – 28 °C) for at least 30 minutes.** At the end of the assay, immediately store the reagents at 2 – 8°C: avoiding long exposure to room temperature.
- Unused coated microwell strips should be released securely in the foil pouch containing desiccant and stored at 2 – 8°C.
- To avoid potential microbial and/or chemical contamination, unused reagents should never be transferred into the original vials.
- As it is necessary to perform the determination in duplicate in order to improve accuracy of the test results, prepare two wells for each point of the calibration curve (C₀-C₅), two for the Control, two for each sample, one for Blank.

Reagent	Calibrator	Sample/Control	Blank
Calibrator C ₀ -C ₅	100 µL		
Sample/Control		100 µL	
Conjugate	100 µL	100 µL	

Incubate 2 h at room temperature (22 – 28 °C). Remove the contents from each well, wash the wells 3 times with 300 µL of diluted wash solution.

Important note: during each washing step, gently shake the plate for 5 seconds and remove excess solution by tapping the inverted plate on an absorbent paper towel.

Automatic washer: if you use automated equipment, wash the wells at least 5 times.

TMB Substrate	100 µL	100 µL	100 µL
---------------	--------	--------	--------

Incubate at 22 – 28°C for 15 minutes in the dark.

Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL
---------------	--------	--------	--------

Shake gently the microplate.
Read the absorbance (E) at 450 nm against a reference wavelength of 620-630 nm or against Blank within 5 minutes.

10. QUALITY CONTROL

Good Laboratory Practice (GLP) requires the use of quality control specimens in each series of assays in order to check the performance of the assay. Controls should be treated as unknown samples, and the results analysed with appropriate statistical methods.

The kit control provided in the kit should be tested as unknown and is intended to assist in assessing the validity of results obtained with each assay plate.

The mean concentration of each control level is documented in the QC report included with each kit. These mean concentration levels are determined over several assays which are run in duplicate in multiple locations across each plate.

DiaMetra recommends the users to maintain graphic records of the control values generated with each assay run, including the running means, SDs and %CVs. This information will facilitate the controls trending analysis relating to the performance of current and historical control lots relative to the supplied Quality Control data. The trending will assist in the identification of assays which give control values significantly different from their average range.

When interpreting control data, users should note that this product was designed and developed as a manual product. The range stated on the QC certificate should be appropriate for assays that are performed manually and with strict adherence to the Assay Procedure described above. It is recognised by Quality Control professionals, that as a result of differences in conditions and practices, there will always be variability in the mean values and precision of control measurements between different laboratories¹⁰.

11. CALCULATION OF RESULTS

The optical densities (ODs) of some calibrators and samples may be higher than 3.0 which may be outside of the measurement range of the microplate reader. Where ODs are higher than 3.0, perform a reading at 405 nm in addition to 450 nm and 620 nm (reference filter for the subtraction of interferences due to the plastic).

For microplate readers unable to read the plate at 3 wavelengths at the same time it is advisable to proceed as follows:

- Read the microplate at 450 nm and at 620 nm.
- Read again the plate at 405 nm and 620 nm.
- Find out the wells whose ODs at 450 nm are higher than 2.0
- Select the corresponding ODs read at 405 nm and multiply these values at 405 nm by the conversion factor

3.0 (where $OD\ 450/OD\ 405 = 3.0$), that is: $OD\ 450\ nm = OD\ 405\ nm \times 3.0$.

Warning: The conversion factor 3.0 is suggested only. For better accuracy, the user is advised to calculate the conversion factor specific for his own reader.

A variety of data reduction software packages are available, which may be employed to generate the mean calibration curve and to calculate the mean concentrations of unknown samples and controls. A smoothed cubic spline curve fit, **including Calibrator 0 is required**. A 4-parameter logistic (4-PL) fit including Calibrator 0 can be used. Other curve fitting algorithms are not recommended.

Alternatively, a calibration curve may be prepared on semi-log graph paper by plotting mean absorbance on the Y-axis against concentration of analyte on the X-axis. Calibrator 0 should be included in the calibration curve. Read the mean absorbance value of each unknown sample off the curve.

In order for the assay results to be considered valid the kit calibrators and control must fall within the specifications detailed in the lot specific certificate of analysis.

If a control is out of its specified range, the associated test results are invalid and samples must be retested.

12. MEASURING RANGE

The assay measuring range (AMR) is 2.1 – 200 µIU/mL. Any value that reads below 2.1 µIU/mL should be reported as “< 2.1 µIU/mL”.

13. METROLOGY AND TRACEABILITY

The calibrators of this kit are traceable to the WHO International Standard for insulin (IS-83/500).

14. EXPECTED VALUES

The following ranges were determined using the Insulin ELISA and are provided for information only. The 95 % reference interval for apparently healthy adults collected in a fasting state were calculated by a non-parametric method following guidance from CLSI C28-A3 “Defining, Establishing and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory”.

	n	Median (µIU/mL)	Reference interval (µIU/mL)
Adults	119	8.8	2.1 – 27.7

The above ranges should be considered as guidelines only; it is recommended that each laboratory establish its own expected range based upon its own patient population.

15. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Representative performance data are shown. Results obtained at individual laboratories may vary.

15.1. Detection Capability

The limit of blank (LoB), limit of detection (LoD) and limit of quantitation (LoQ) were determined with guidance from CLSI EP17-A, "Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation" using 6 blanks and 6 low level samples.

Sensitivity	Concentration
Limit of Blank (LoB)	1.2 µIU/mL
Limit of Detection (LoD)	1.8 µIU/mL
Limit of Quantitation (LoQ)	2.1 µIU/mL

15.2. Trueness

Trueness has been demonstrated through a recovery test for the Insulin ELISA with the WHO International Standard for Insulin (IS-83/500).

15.3. Precision

Precision of the Insulin ELISA was determined by performing a complex precision study.

Repeatability: A total of 6 serum samples were assayed in five replicates, once a day for 5 days by 3 operators. Data from one representative lot is shown below:

Sample	n	Mean Conc. (µIU/mL)	Within run (Repeatability)	
			SD	CV%
1	75	9.2	0.5	5.3%
2	75	22.7	0.9	4.0%
3	75	36.6	1.3	3.6%
4	75	84.7	4.1	4.8%
5	75	117.3	6.8	5.8%
6	75	167.8	7.6	4.5%

Reproducibility: A total of 6 serum samples were assayed in five replicates, once a day for 5 days by 3 operators. Results for the combined data from two lots is shown below:

Sample	n	Mean Conc. (µIU/mL)	Within Laboratory (Reproducibility)	
			SD	CV%
1	150	9.3	1.2	12.6%
2	150	22.5	1.5	6.5%
3	150	36.0	2.9	8.2%
4	150	84.0	5.8	6.9%
5	150	117.8	10.9	9.2%
6	150	169.3	17.2	10.1%

15.4. Linearity

Linearity was evaluated based on CLSI EP-06, "Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures". For insulin concentration by Insulin ELISA, the measurement procedure shows linearity for the interval from 1.7 to 251.9 µIU/mL within the allowable deviation of linearity (ADL) of $\pm 15\%$.

15.5. Method comparison

The Insulin ELISA was compared against a commercially available quantitative manual assay following CLSI EP-9A, "Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples". A total of 41 samples, selected to represent a wide range of insulin concentrations, was assayed by each method. Passing-Bablok regression analysis was performed on the comparative data:

n	Slope [95% CI]	Intercept (ng/mL) [95% CI]	Correlation coefficient (r)
41	1.0 [0.952 – 1.093]	-0.6 [-1.56 – 0.19]	0.98

15.6. Analytical Specificity

The specificity was assessed with the following cross-reactants.

Cross-reactant	Concentration tested (unit)	Mean %Cross reactivity
C-Peptide	100 ng/mL	-0.1%
Proinsulin	1000 ng/mL	0.1%
Insulin Glargine	1000 µIU/mL	23.7%

The following substances do not interfere with a bias of $> \pm 15\%$ in the Insulin ELISA assay when the concentrations are below the stated threshold presented in the following table.

Potentially Interfering Reagent	Threshold Concentration
Bilirubin, conjugated	15 mg/dL
Bilirubin, unconjugated	15 mg/dL
Hemoglobin	200 mg/dL
Total Protein	8.3 g/dL
Triglycerides	500 mg/dL

15.7. Serum-plasma study

The Insulin ELISA matrix comparison study was performed to evaluate the difference across tube types (serum separator tubes (SST), lithium heparin plasma, sodium heparin plasma and K2 EDTA plasma) versus the control samples (red top serum, without additive) following CLSI EP9-A3 guidelines. A total of 20 samples (16 native, 4 spiked) to cover the assay range were evaluated. Linear regression analysis was performed on the comparative data:

Sample type	Slope [95% CI]	Intercept (ng/mL) [95% CI]	Correlation coefficient (r)
SST	1.0 [0.92 to 1.02]	0.3 [-1.41 to 2.01]	0.99
Lithium Heparin	1.0 [0.93 to 1.09]	-1.8 [-4.56 to 0.87]	0.99
Sodium Heparin	1.0 [0.90 to 1.04]	-1.4 [-3.86 to 1.13]	0.99
EDTA	1.1 [1.04 to 1.18]	1.3 [-1.28 to 3.80]	0.99

15.8. Hook effect

The hook effect was tested using concentrations of insulin up to 25000 µIU/mL. No hook effect was observed.

16. LIMITATIONS OF USE

- As in the case of any diagnostic procedure, results must be interpreted in conjunction with the patient's clinical presentation and other information available to the physician.
- The performance characteristics of this assay have not been established in a paediatric population.
- Heterophilic antibodies in human serum can react with reagent immunoglobulins, interfering with *in vitro* immunoassays¹¹. Patients routinely exposed to animals or to animal serum products can be prone to this interference and anomalous values may be observed.

17. WASTE MANAGEMENT

Reagents must be disposed of in accordance with local regulations.

All materials that have come into contact with samples and reagents must be disposed of in accordance with country, state and local regulations.

18. BIBLIOGRAPHY

1. Khan RMM, Chua ZJY, Tan JC, Yang Y, Liao Z, Zhao Y. From Pre-Diabetes to Diabetes: Diagnosis, Treatments and Translational Research. *Medicina* (Kaunas). 2019 Aug 29;55(9):546
2. Pourmotabbed G, Kitabchi AE. Hypoglycemia. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 2001 Jun;28(2):383-400.
3. Göke B. Implications of blood glucose, insulin resistance and beta-cell function in impaired glucose tolerance. *Diabetes Res Clin Pract.* 1998 Jul;40 Suppl:S15-20.

4. Rett K, Wicklmayr M, Mehnert H. What is the clinical significance of insulin resistance? *J Cardiovasc Pharmacol.* 1992;20 Suppl 11:S22-6.
5. Behboudi-Gandevani, S., Amiri, M., Bidhendi Yarandi, R. et al. The impact of diagnostic criteria for gestational diabetes on its prevalence: a systematic review and meta-analysis. *Diabetol Metab Syndr* 11, 11 (2019).
6. John Service F. Hyperinsulinemic hypoglycemia in adults. *Ann Endocrinol (Paris).* 2004 Feb;65(1):88-95.
7. Service FJ. Hypoglycemias. *West J Med.* 1991 Apr;154(4):442-54.
8. Service FJ. Hypoglycemia. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 1997 Dec;26(4):937-55.
9. Field JB. Hypoglycemia. Definition, clinical presentations, classification, and laboratory tests. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 1989 Mar;18(1):27-43.
10. Basic QC Practices On-line Course; <http://www.Westgard.com>.
11. Boscato, LM. and Stuart, MC., 'Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays'. *Clin Chem*, 34, 1988, pp 27–33

19. REVISION IDENTIFIER

Additions or changes to the IFU are indicated by grey highlighting.

20. PRODUCT COMPLAINTS AND TECHNICAL SUPPORT

For a patient/user/third party in the European Union and in countries with similar regulatory regime (Regulation 2017/746/EU on IVD Medical Devices); if, during the use of this device or as a result of its use, a serious incident has occurred, please report it to the manufacturer and/or its authorised representative and to your national regulatory authority.

The manufacturer can be contacted through their customer service or technical support team. The contact details can be found below and on the company website: www.diametra.com.

Ed. 03/2024

DCM076-10



DCM076-9

Ed. 03/2024

INSULIN ELISA

para el análisis de rutina

Detección inmunoenzimática directa del nivel de insulina en suero o plasma humano

IVD

LOT

Ver etiqueta
externa2°C  8°C $\Sigma = 96$ pruebas

REF DKO076

1. FINALIDAD PREVISTA

Para uso en diagnóstico *in vitro*

Para uso profesional de laboratorio

Insulin ELISA es un dispositivo manual de diagnóstico *in vitro* destinado a la determinación cuantitativa de la insulina en suero o plasma humano de una población adulta. Los resultados deben utilizarse como ayuda en el diagnóstico de la diabetes mellitus y la hipoglucemia junto con otros datos clínicos y de laboratorio.

2. IMPORTANCIA CLÍNICA

Todos los órganos y tejidos del organismo consiguen su energía a través de la glucosa principalmente. Las fuentes de glucosa del organismo se obtienen de la ingesta dietética, el glucógeno endógeno y la glucosa derivada de la gluconeogénesis.

Cuando se está en ayunas, el hígado se convierte en la primera fuente de glucosa a través del proceso de glucogenólisis durante las primeras 8-12 horas de ayuno. Durante el ayuno, disminuyen los niveles de glucosa y, por tanto, de insulina, mientras que los niveles de hormonas contrarreguladoras, como la epinefrina, que inhibe la secreción de insulina, comienzan a aumentar para ayudar a mantener la normoglucemia.

Durante el ciclo alimenticio, la insulina es la principal hormona que controla el metabolismo de la glucosa. Después de ingerir una comida con carbohidratos, los niveles de glucosa aumentan y estimulan la secreción de insulina.

La insulina es una hormona generada por las células beta del páncreas que estabiliza los niveles de glucosa en sangre, controlando las células para que absorban la glucosa, lo que promueve tanto su almacenamiento como glucógeno en el hígado como la absorción de glucosa por parte de los músculos y el tejido adiposo, inhibiendo la producción hepática de glucosa.

Cuando se padece diabetes, las funciones de las células beta suelen estar alteradas, así como la secreción de insulina y, por tanto, los niveles de glucosa en sangre^{1,2}. La resistencia a la insulina provoca en primer lugar un aumento de la producción de insulina para mantener la casi-

normoglucemia. Por tanto, la diabetes se produce por un deterioro adicional que afecta a la resistencia a la insulina y al funcionamiento de las células beta, lo que conlleva un daño gradual en las células beta que segregan insulina y una pérdida total del control del nivel de glucosa en sangre^{3,4}. Los individuos afectados suelen atravesar una fase de intolerancia a la glucosa y un aumento de los niveles de glucosa en plasma en ayunas antes de manifestar una diabetes de tipo 2⁵.

La secreción de insulina también se ve alterada en el contexto de la diabetes mellitus gestacional (DMG). La DMG es un trastorno heterogéneo que se produce en aproximadamente el 7-10 % de todos los embarazos⁶.

Los niveles de insulina también se alteran cuando se padece hipoglucemia, una afección que se caracteriza por un nivel de glucosa en sangre inferior al normal y por niveles de insulina anormalmente altos.

La hipoglucemia suele estar causada por tratamientos relacionados con la diabetes como, por ejemplo, una dosis de insulina excesivamente alta, una ingesta inadecuada de alimentos después de tomar la medicación para la diabetes o, en casos raros, por un insulinoma, un cáncer de páncreas en el que las células beta segregan cantidades anormales de insulina. Las mediciones de los niveles de insulina se consideran, junto con otros datos clínicos y de laboratorio, una ayuda para el diagnóstico de la hipoglucemia en pacientes que presentan manifestaciones clínicas típicas^{7,8,9}.

3. PRINCIPIO DEL MÉTODO

El Insulin ELISA es un ensayo tipo sándwich, que se basa en la unión simultánea de insulina humana a dos anticuerpos monoclonales, uno inmovilizado en la placa de micropocillos y el otro conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP).

Tras la incubación, la separación ligada/libre se realiza mediante un simple lavado en fase sólida. A continuación, la enzima HRP de la fracción ligada reacciona con el sustrato (H_2O_2) y el sustrato de TMB, y desarrolla un color azul que cambia a amarillo cuando se añade la solución de detención (H_2SO_4). La intensidad del color es proporcional a la concentración de insulina de la muestra.

La concentración de insulina de la muestra se calcula mediante una curva de calibración.

4. REACTIVOS, MATERIALES E INSTRUMENTACIÓN

4.1. Reactivos y materiales incluidos en el kit

1. Calibradores (6 viales, 1 mL cada uno)

ProClin >0,0015%, BSA 1%

CAL0	REF	DCE002/7606-0
CAL1	REF	DCE002/7607-0
CAL2	REF	DCE002/7608-0
CAL3	REF	DCE002/7609-0
CAL4	REF	DCE002/7610-0
CAL5	REF	DCE002/7611-0

2. Control (1 vial, 1 mL)

La concentración de control se indica en el certificado de análisis. ProClin >0,0015%, BSA 1%

REF DCE045/7603-0

3. Conjugado (1 vial, 13 mL)

Anticuerpo monoclonal anti insulina conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP). ProClin >0,0015%, BSA 0,1%

REF DCE002/7602-0

4. Microplaca recubierta (1 microplaca que se puede romper)

Anticuerpo monoclonal anti insulina adsorbido en microplaca

REF DCE002/7603-0

5. Sustrato de TMB (1 vial, 15 mL)

H₂O₂-TMB 0,26 g/L (evitar el contacto con la piel).

ProClin <0,0015% REF DCE004-0

6. Solución de detención (1 vial, 15 mL)

Ácido sulfúrico 0,15 mol/L (evitar el contacto con la piel)

REF DCE005-0

7. Solución de lavado 50X Conc. (1 vial, 20 mL)

NaCl 45 g/L; Tween-20 55 g/L. ProClin >0,0015%

REF DCE006-0

4.2. Materiales necesarios pero no suministrados

Agua destilada

4.3. Materiales auxiliares e instrumentación

Dispensador automático

Dispositivos de pipetas de precisión

Lector de microplacas (450 nm, 620-630 nm)

5. ADVERTENCIAS

- Este kit está destinado al uso *in vitro* realizado exclusivamente por profesionales. No es para uso interno o externo en personas ni animales.
- Utilice el equipo de protección personal adecuado cuando trabaje con los reactivos suministrados.
- Siga las prácticas de laboratorio recomendadas (BPL) para manipular productos sanguíneos.
-  El material de origen animal utilizado en la preparación del kit se ha obtenido de animales certificados como sanos y la proteína bovina se ha obtenido de países donde no hay infección de EEB, pero estos materiales deben manejarse como potencialmente infecciosos.
- Algunos reactivos (calibradores, controles, conjugado y diluyente de muestras) contienen pequeñas cantidades de ProClin™ 300 (>0,0015%, <0,06%) como conservante. Evite el contacto con la piel o las mucosas.

- Clasificación según Reglamento (UE) n° 1272/2008 [CLP]

Sensibilización cutánea, categoría 1



Atención

Contiene: ProClin 300

Indicaciones de peligro:

H317 - Puede provocar una reacción alérgica en la piel.

Consejos de prudencia:

P261 - Evitar respirar el polvo / el humo / el gas / la niebla / los vapores / el aerosol.

P280 - Llevar guantes / ropa de protección / equipo de protección para los ojos / la cara / los oídos.

P321 - Se necesita un tratamiento específico (ver instrucciones de primeros auxilios en esta etiqueta).

P333+P313 - En caso de irritación o erupción cutánea: Consultar a un médico.

P362+P364 - Quitar las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas.

- La solución de detención consiste en una solución diluida de ácido sulfúrico. El ácido sulfúrico es venenoso, corrosivo y puede ser tóxico si se ingiere. Para evitar quemaduras químicas, evite el contacto con la piel y los ojos.
- Evite la exposición del reactivo TMB/H₂O₂ a la luz solar directa, a metales o a oxidantes. No congele la solución.

6. PRECAUCIONES

- Siga estrictamente la secuencia de pasos de pipeteado que se indica en este protocolo. Los datos de rendimiento representados en este documento se obtuvieron utilizando los reactivos específicos indicados en estas instrucciones de uso.
- Todos los reactivos deben conservarse refrigerados entre 2 y 8 °C en su envase original. Las excepciones se indican claramente.
- Deje que todos los componentes del kit y las muestras alcancen la temperatura ambiente (22-28 °C) y mezcle bien antes de usarlos.
- No intercambie componentes del kit procedentes de diferentes lotes. Debe respetarse la fecha de caducidad impresa en las etiquetas de la caja y de los viales. No utilice ningún componente del kit después de su fecha de caducidad.
- Si el usuario utiliza un equipo automatizado, tiene la responsabilidad de asegurarse de que el kit ha sido debidamente validado para su uso previsto.
- La eliminación incompleta o imprecisa del líquido de los pocillos podría alterar la precisión del ensayo y/o aumentar el fondo. Para mejorar el rendimiento del kit en sistemas automáticos se recomienda aumentar el número de lavados.
- Es importante que el tiempo de reacción en cada pocillo se mantenga constante para obtener resultados reproducibles. El pipeteo de las muestras no debe prolongarse más de diez minutos para evitar errores en el ensayo. Si se necesitan más de 10 minutos, siga el mismo orden de dispensación. Si se utiliza más de una

placa, se recomienda repetir la curva dosis-respuesta en cada placa.

- La adición de la solución de sustrato de TMB inicia una reacción cinética, que finaliza al añadir la solución de detención. Por lo tanto, el sustrato de TMB y la solución de detención deben añadirse en la misma secuencia para eliminar las posibles desviaciones temporales durante la reacción.
- Respete las directrices para realizar el control de calidad en los laboratorios médicos mediante el ensayo de controles y/o sueros combinados.
- Se requiere la máxima precisión en la reconstitución y dispensación de los reactivos.
- No se deben usar en el ensayo muestras contaminadas microbiológicamente, muy lipémicas, **ictéricas** o hemolizadas.
- Los lectores de placas miden en vertical. No toque el fondo de los pocillos.
- **Deben emplearse puntas desechables nuevas al pipetear reactivos de ensayo, incluidas las muestras, los calibradores y los controles, para mitigar el riesgo de contaminación por arrastre. De lo contrario, los resultados podrían no ser válidos.**

7. ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD DE LOS REACTIVOS

Almacene el kit a 2-8 °C en un lugar oscuro.

- El kit es estable a 2-8 °C hasta la fecha de caducidad indicada en su etiqueta externa.
- Una vez abierto, el kit es estable a 2-8 °C durante 6 meses.
- La solución de lavado diluida es estable durante 30 días a 2-8 °C.

Nota importante: abra la bolsa que contiene la microplaca recubierta solo cuando esté a temperatura ambiente y ciérrela inmediatamente después de su uso.

8. RECOGIDA Y ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS

El ensayo debe realizarse usando muestras de suero (tubos de muestras estándar o tubos que contienen gel de separación de suero) o plasma (heparina de litio, heparina de sodio o EDTA de potasio).

Almacenamiento de muestras	Duración
2-8 °C	96 horas
Ciclos de congelación/descongelación	3 ciclos

9. PROCEDIMIENTO

9.1. Preparación de calibradores y controles

Antes de utilizar, mezclar suavemente durante 5 minutos con un mezclador de rodillos.

Los calibradores están listos para utilizarse y tienen las siguientes concentraciones:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅
µIU/mL	0	3	10	30	80	200

Los controles están listos para su uso; la concentración del control está impresa en la etiqueta.

9.2. Preparación del conjugado

El conjugado está listo para usar.

9.3. Preparación de la solución de lavado

Diluir el contenido del vial «50X Conc. Wash Solution» con agua destilada hasta un volumen final de 1000 mL antes de usarlo. Para volúmenes más pequeños, respete la relación de dilución de 1:50.

Es posible que observe la presencia de cristales dentro de la solución de lavado concentrada; en este caso, mezcle a temperatura ambiente hasta la completa disolución de los cristales. Para una mayor precisión, diluya todo el frasco de solución de lavado concentrada a 1000 mL, teniendo cuidado también de transferir los cristales enjuagando completamente el frasco y luego mezclando hasta que los cristales se disuelvan completamente.

9.4. Preparación de las muestras

La determinación de insulina se puede realizar en muestras de suero (tubos de muestras estándar o tubos que contienen gel de separación de suero) o plasma (heparina de litio, heparina de sodio o EDTA de potasio).

Para realizar una comparación precisa que permita establecer valores normales, se debe obtener una muestra de suero matinal en ayunas.

Recoja la sangre mediante venopunción en vacutainers y separe el suero (después de la formación del coágulo) o el plasma de las células mediante centrifugación.

Almacenar la muestra a -20 °C si la determinación no se lleva a cabo el mismo día que se recoge la muestra. Antes de utilizar, mezclar suavemente durante 5 minutos con un mezclador de rodillos.

9.5. Procedimiento

- **Deje que todos los reactivos alcancen la temperatura ambiente (22-28 °C) durante al menos 30 minutos.** Al finalizar el ensayo, almacene inmediatamente los reactivos a 2-8 °C: evite la exposición prolongada a la temperatura ambiente.
- Las tiras de micropocillos recubiertas no utilizadas deben dejarse de forma segura en el envoltorio de papel de aluminio que contiene desecante y almacenarse a 2-8 °C.
- Para evitar que se produzca una posible contaminación microbiana y/o química, los reactivos no utilizados nunca se deberán transferir a los viales originales.
- Como es necesario realizar la determinación por duplicado para mejorar la precisión de los resultados de la prueba, prepare dos pocillos para cada punto de la curva de calibración (C₀-C₅), dos para el control, dos para cada muestra y uno para el blanco.

	Calibrador	Muestra/ Controles	Blanco
Calibrador C ₀ -C ₅	100 µL		
Muestra / Controles		100 µL	
diluida	100 µL	100 µL	
Incube durante 2 h a temperatura ambiente (22-28 °C). Retire el contenido de cada pocillo. Lave los pocillos 3 veces con 300 µL de solución de lavado diluida.			
Nota importante: en cada paso de lavado, agite ligeramente la placa durante 5 segundos y elimine el exceso de solución golpeando la placa invertida sobre un paño de papel absorbente.			
Lavadora automática: si utiliza un equipo automático, lave los pocillos al menos 5 veces.			
Sustrato de TMB	100 µL	100 µL	100 µL
Incube durante 15 minutos en un lugar oscuro a temperatura ambiente (22-28 °C).			
Solución de detención	100 µL	100 µL	100 µL
Agite suavemente la microplaca. Compare la absorbancia (E) a 450 nm con la obtenida con una longitud de onda de referencia de 620-630 nm o con el blanco en un plazo de 5 minutos.			

10. CONTROL DE CALIDAD

Las prácticas de laboratorio recomendadas (BPL) requieren el uso de muestras de control de calidad en cada serie de ensayos para comprobar el rendimiento del ensayo. Los controles deberán tratarse como muestras desconocidas y los resultados deberán analizarse con métodos estadísticos adecuados.

Los controles incluidos en el kit deberán ser probados como desconocidos y están destinados a ayudar a evaluar la validez de los resultados obtenidos con cada placa de ensayo.

La concentración media de cada nivel de control se documenta en el informe de control de calidad que se incluye en cada kit. Los niveles de concentración media se determinan respecto de varios análisis, los cuales se realizan por duplicado en varios puntos diferentes de cada placa.

DiaMetra recomienda que los usuarios mantengan registros gráficos de los valores de control que se generan con cada ensayo, incluida la media de ejecución, la DE (desviación estándar) y el % CV. Esta información facilitará los ensayos de tendencia de los controles relacionados con el rendimiento de lotes de control actuales e históricos relativos a los datos de control de calidad proporcionados. La tendencia facilitará la identificación de los análisis que generan valores de control significativamente distintos de su intervalo medio.

Al interpretar los datos de control, los usuarios deberán tener en cuenta que este producto fue diseñado y desarrollado como un producto manual. El rango establecido en el certificado de control de calidad deberá ser adecuado para los ensayos que se realizan manualmente y en estricto cumplimiento del procedimiento de ensayo anteriormente descrito. Los profesionales del control de calidad reconocen que, como resultado de las diferencias en las condiciones y en las prácticas, siempre habrá variaciones entre laboratorios en los valores medios y en la precisión de las mediciones de control¹⁰.

11. CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

Las densidades ópticas (DO) de algunos calibradores y muestras pueden ser superiores a 3,0, valor que puede quedar fuera del rango de medición del lector de microplacas. Cuando las DO sean superiores a 3,0, realice una lectura a 405 nm, además de a 450 nm y 620 nm (filtro de referencia para la sustracción de interferencias como consecuencia del plástico).

En caso de lectores de microplacas que no puedan leer la placa a 3 longitudes de onda al mismo tiempo.

Se aconseja proceder de la siguiente manera:

- Lea la microplaca a 450 nm y a 620 nm.
- Lea de nuevo la placa a 405 nm y 620 nm.
- Determine los pocillos cuyas DO a 450 nm sean superiores a 2,0.
- Seleccione las DO correspondientes, leídas a 405 nm y multiplique estos valores a 405 nm por el factor de conversión 3,0 (donde $DO_{450}/DO_{405} = 3,0$), es decir:
 $DO_{450\text{ nm}} = DO_{405\text{ nm}} \times 3,0$.

Advertencia: el factor de conversión 3,0 representa una sugerencia únicamente. Para obtener una precisión superior, se aconseja al usuario que calcule el factor de conversión específico para su propio lector.

Hay disponibles diversos paquetes de software de reducción de datos que se pueden utilizar para generar el promedio de la curva de calibración y para calcular el promedio de las concentraciones de muestras y controles desconocidos. **Es necesario** un ajuste de curva de splines cúbicos suavizados, **incluido el calibrador 0**. También se puede usar un ajuste logístico de 4 parámetros (4-PL) que incluya el calibrador 0. No se recomiendan otros algoritmos de ajuste de curva.

También se puede preparar una curva de calibración en papel semilogarítmico mediante el trazado de la absorbancia media en el eje Y frente a la concentración de analitos en el eje X. El calibrador 0 debe incluirse en la curva de calibración. Lea el valor de absorbancia medio de cada muestra desconocida que se encuentra fuera de la curva.

Para que los resultados del ensayo se consideren válidos, los calibradores y el control del kit deben ajustarse a las especificaciones detalladas en el certificado de análisis específico del lote.

Si un control está fuera de su rango especificado, los resultados de la prueba asociados no son válidos y se deben volver a realizar pruebas de las muestras.

12. RANGO DE MEDICIÓN

El rango de medición del ensayo (AMR) es de 2,1-200 µIU/mL. Cualquier valor que sea inferior a 2,1 µIU/mL debe informarse como «< 2,1 µIU/mL».

13. METROLOGÍA Y TRAZABILIDAD

Los calibradores de este kit se pueden trazar según el Estándar internacional de la OMS sobre insulina (IS-83/500).

14. VALORES ESPERADOS

Los rangos siguientes se determinaron usando el Insulin ELISA y se facilitan solo con fines informativos. El intervalo de referencia del 95 % para adultos aparentemente sanos se obtuvo en estado de ayunas y se calculó mediante un método no paramétrico siguiendo la orientación de CLSI C28-A3 "Defining, Establishing and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory".

	n	Mediana (µIU/mL)	Intervalo de referencia (µIU/mL)
Adultos	119	8,8	2,1 – 27,7

Los rangos anteriores deberán ser considerados como directrices solamente; se recomienda que cada laboratorio establezca su propio rango previsto en función de su propia población de pacientes.

15. CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Se muestran los datos de rendimiento representativos. Los resultados obtenidos en diferentes laboratorios pueden diferir.

15.1. Capacidad de detección

Se determinaron el límite de blanco (LoB), el límite de detección (LoD) y el límite de cuantificación (LoQ) siguiendo las pautas de CLSI EP17-A, "Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation", y usando 6 blancos y 6 muestras de bajo nivel.

Sensibilidad	Concentración
Límite de blanco (LoB)	1,2 µIU/mL
Límite de detección (LoD)	1,8 µIU/mL
Límite de cuantificación (LoQ)	2,1 µIU/mL

15.2. Veracidad

Se ha demostrado la veracidad mediante una prueba de recuperación de Insulin ELISA mediante el Estándar internacional de la OMS sobre insulina (IS-83/500).

15.3. Precisión

La precisión de Insulin ELISA se determinó mediante la realización de un estudio de precisión complejo.

Repetibilidad: Se analizaron un total de 6 muestras de suero en 5 réplicas, una vez al día durante 5 días por 3 operadores.

A continuación se muestran los datos de un lote representativo:

Muestra	n	Concentración media (µIU/mL)	Intraprueba (repetibilidad)	
			DE	CV %
1	75	9,2	0,5	5,3 %
2	75	22,7	0,9	4,0 %
3	75	36,6	1,3	3,6 %
4	75	84,7	4,1	4,8 %
5	75	117,3	6,8	5,8 %
6	75	167,8	7,6	4,5 %

Reproducibilidad: se analizó un total de 6 muestras de suero en cinco réplicas, una vez al día durante 5 días por 3 operadores. A continuación, se muestran los resultados de los datos combinados de dos lotes:

Muestra	n	Concentración media (µIU/mL)	Dentro del laboratorio (reproducibilidad)	
			DE	CV %
1	150	9,3	1,2	12,6 %
2	150	22,5	1,5	6,5 %
3	150	36,0	2,9	8,2 %
4	150	84,0	5,8	6,9 %
5	150	117,8	10,9	9,2 %
6	150	169,3	17,2	10,1 %

15.4. Linealidad

La linealidad se evaluó en base a CLSI EP-06, "Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures". Para concentración de insulina mediante Insulin ELISA; el procedimiento de medición muestra linealidad para el intervalo de 1,7 a 251,9 µIU/mL dentro de la desviación de linealidad permitida (ADL) de ±15 %.

15.5. Comparación de métodos

El Insulin ELISA se comparó con un ensayo cuantitativo manual disponible comercialmente, siguiendo CLSI EP-9A, "Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples". Con cada método se realizó el ensayo de un total de 41 muestras seleccionadas para representar un amplio intervalo de concentraciones de insulina. Se realizó el análisis de regresión de Passing y Bablok en los datos comparativos:

n	Pendiente [IC del 95 %]	Intersección (ng/mL) [IC del 95 %]	Coefficiente de correlación (r)
41	1,0 [0,952-1,093]	-0,6 [-1,56-0,19]	0,98

15.6. Especificidad analítica

La especificidad se evaluó con los siguientes reaccionantes cruzados. La especificidad se evaluó con los siguientes reaccionantes cruzados.

Reaccionante cruzado	Concentración probada (unidad)	Promedio en % de reactividad cruzada
Péptido C	100 ng/mL	-0,1 %
Proinsulina	1000 ng/mL	0,1 %
Insulina glargina	1000 µIU/mL	23,7 %

Las siguientes sustancias no interfieren con un sesgo de $> \pm 15\%$ en el ensayo Insulin ELISA cuando las concentraciones están por debajo del umbral indicado presentado en la siguiente tabla.

Reactivos que pueden interferir	Límite máximo de concentración
Bilirrubina, conjugada	15 mg/dL
Bilirrubina, no conjugada	15 mg/dL
Hemoglobina	200 mg/dL
Proteína total	8,3 g/dL
Triglicéridos	500 mg/dL

15.7. Estudio en suero-plasma

El estudio de comparación de la matriz Insulin ELISA se realizó para evaluar la diferencia entre los tipos de tubos (tubos separadores de suero [SST], plasma de heparina de litio, plasma de heparina sódica y plasma K2 EDTA) frente a las muestras de control (tapón rojo para suero, sin aditivos) siguiendo las directrices CLSI EP9-A3. Se evaluó un total de 20 muestras (16 nativas, 4 con aditivos) para cubrir el intervalo. Se realizó un análisis de regresión lineal sobre los datos comparativos:

Tipo de muestra	Pendiente [IC del 95 %]	Intersección (ng/mL) [IC del 95 %]	Coefficiente de correlación (r)
SST	1,0 [0,92 a 1,02]	0,3 [-1,41 a 2,01]	0,99
Heparina de litio	1,0 [0,93 a 1,09]	-1,8 [-4,56 a 0,87]	0,99
Heparina sódica	1,0 [0,90 a 1,04]	-1,4 [-3,86 a 1,13]	0,99
EDTA	1,1 [1,04 a 1,18]	1,3 [-1,28 a 3,80]	0,99

15.8. Efecto gancho

El efecto gancho se analizó utilizando concentraciones de insulina de hasta 25 000 µIU/mL. No se observó efecto gancho.

16. LÍMITES DE USO

- Como en cualquier procedimiento diagnóstico, los resultados se deberán interpretar junto con los hallazgos clínicos del paciente y otra información de la que el médico disponga.
- Las características de rendimiento de este análisis no se han establecido para una población pediátrica.
- Los anticuerpos heterofílicos en el suero humano pueden presentar reacciones con las inmunoglobulinas reactivas, que interfieren con los inmunoensayos *in vitro*¹¹. Los pacientes que se exponen habitualmente a animales o a productos de suero animal pueden ser propensos a esta interferencia y puede que se observen valores anómalos.

17. GESTIÓN DE RESIDUOS

Los reactivos deben eliminarse de acuerdo con la normativa local.

Todos los materiales que hayan entrado en contacto con las muestras y los reactivos deben eliminarse de acuerdo con la normativa nacional, estatal y local.

18. BIBLIOGRAFÍA

1. Khan RMM, Chua ZJY, Tan JC, Yang Y, Liao Z, Zhao Y. From Pre-Diabetes to Diabetes: Diagnosis, Treatments and Translational Research. Medicina (Kaunas). 2019 Aug 29;55(9):546
2. Pourmotabbed G, Kitabchi AE. Hypoglycemia. Obstet Gynecol Clin North Am. 2001 Jun;28(2):383-400.
3. Göke B. Implications of blood glucose, insulin resistance and beta-cell function in impaired glucose tolerance. Diabetes Res Clin Pract. 1998 Jul;40 Suppl:S15-20.
4. Rett K, Wicklmayr M, Mehnert H. What is the clinical significance of insulin resistance? J Cardiovasc Pharmacol. 1992;20 Suppl 11:S22-6.
5. Behboudi-Gandevani, S., Amiri, M., Bidhendi Yarandi, R. et al. The impact of diagnostic criteria for gestational diabetes on its prevalence: a systematic review and meta-analysis. Diabetol Metab Syndr 11, 11 (2019).
6. John Service F. Hyperinsulinemic hypoglycemia in adults. Ann Endocrinol (Paris). 2004 Feb;65(1):88-95.
7. Service FJ. Hypoglycemias. West J Med. 1991 Apr;154(4):442-54.
8. Service FJ. Hypoglycemia. Endocrinol Metab Clin North Am. 1997 Dec;26(4):937-55.
9. 7: Field JB. Hypoglycemia. Definition, clinical presentations, classification, and laboratory tests. Endocrinol Metab Clin North Am. 1989 Mar;18(1):27-43.
10. Basic QC Practices On-line Course; <http://www.Westgard.com>.

11. Boscato, LM. and Stuart, MC., 'Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays'. *Clin Chem*, 34, 1988, pp 27–33

19. IDENTIFICADOR DE REVISIÓN

Las adiciones o cambios en las instrucciones de uso se han resaltado en gris.

20. RECLAMACIONES SOBRE PRODUCTOS Y ASISTENCIA TÉCNICA

Para un paciente/usuario/tercero en la Unión Europea y en países con un régimen regulatorio similar: Reglamento (UE) 2017/746 sobre los productos sanitarios para diagnóstico in vitro; si, durante el uso de este dispositivo o como resultado de su uso, se ha producido un incidente grave, informe del

mismo al fabricante y/o a su representante autorizado y al organismo regulador nacional.

Puede contactar con el fabricante a través del servicio de atención al cliente o del equipo de asistencia técnica. Los datos de contacto se encuentran a continuación y en el sitio web de la empresa: www.diametra.com.

Ed. 03/2024

DCM076-10

	DE ES FR EN IT PT	<i>In vitro</i> Diagnostikum Producto sanitario para diagnóstico <i>In vitro</i> Dispositif medical de diagnostic <i>in vitro</i> <i>In vitro</i> Diagnostic Medical Device Dispositivo medico-diagnostico <i>in vitro</i> Dispositivos medicos de diagnostico <i>in vitro</i>		DE ES FR EN IT PT	Hergestellt von Elaborado por Fabriqué par Manufacturer Produttore Produzido por
	DE ES FR EN IT PT	Achtung, Begleitdokumente Precaución, consulte los documentos adjuntos Attention, veuillez consulter les documents d'accompagnement Caution, consult accompanying documents Attenzione, consultare la documentazione allegata Atenção, consultar os documentos de acompanhamento	 yyyy-mm	DE ES FR EN IT PT	Herstellungs datum Fecha de fabricacion Date de fabrication Date of manufacture Data di produzione Data de produção
 yyyy-mm-dd	DE ES FR EN IT PT	Verwendbar bis Estable hasta (usar antes de último día del mes) Utiliser avant (dernier jour du mois indiqué) Use by (last day of the month) Utilizzare prima del (ultimo giorno del mese) Utilizar (antes ultimo día do mês)		DE ES FR EN IT PT	Biogefährdung Riesco biológico Risque biologique Biological risk Rischio biologico Risco biológico
	DE ES FR EN IT PT	Gebrauchsanweisung beachten Consultar las instrucciones Consulter le mode d'emploi Consult instructions for use Consultare le istruzioni per l'uso Consultar instruções para uso		DE ES FR EN IT PT	Chargenbezeichnung Codigo de lote Numero de lot Batch code Codice del lotto Codigo do lote
 $\Sigma = xx$	DE ES FR EN IT PT	Ausreichend für "n" Tests Contenido suficiente para "n" tests Contenu suffisant pour "n" tests Contains sufficient for "n" tests Contenuto sufficiente per "n" saggi Contém o suficiente para "n" testes		DE ES FR EN IT PT	Inhalt Contenido del estuche Contenu du coffret Contents of kit Contenuto del kit Conteúdo do kit
 Max Min	DE ES FR EN IT PT	Temperaturbereich Limitación de temperatura Limites de température de conservation Temperature limitation Limiti di temperatura Temperaturas limites de conservação		DE ES FR EN IT PT	Bestellnummer Número de catálogo Références du catalogue Catalogue number Numero di Catalogo Número do catálogo
	DE ES FR EN IT PT	Vor direkter Sonneneinstrahlung schützen Mantener alejado de la luz solar Tenir à l'écart de la lumière du soleil Keep away from sunlight Tenere lontano dalla luce solare Mantenha longe da luz solar			