

INSULIN

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

IVD



LOT

Vedere etichetta esterna

2°C  8°C



$\Sigma = 96$ test

REF DKO076

DESTINAZIONE D'USO

Il kit Insulin é un dosaggio immunoenzimatico diretto in fase solida per la determinazione quantitativa dell'insulina in siero o plasma umano. Il kit Insulin è destinato al solo uso di laboratorio.

1. SIGNIFICATO CLINICO

L'insulina è un ormone polipeptidico che regola il metabolismo dei carboidrati. Oltre ad avere come principale ruolo l'omeostasi dei carboidrati, ha effetti sul metabolismo dei lipidi e regola il rilascio dei depositi lipidici del fegato.

L'insulina è coinvolta nell'assorbimento del glucosio nel muscolo e nel tessuto adiposo, nell'aumento della replicazione del DNA e nella sintesi proteica, modifica l'attività di numerosi enzimi (effetto allosterico), favorisce la sintesi del glicogeno, degli acidi grassi, l'assorbimento degli aminoacidi, inibisce la proteolisi, la lipolisi, e la gluconeogenesi. Le cellule Beta rilasciano l'insulina in modo glucosio-dipendente.

I livelli di glucosio nel sangue variano da circa 70 mg/dL a 110 mg/dL (3,9 – 6,1 mmol/L), tranne subito dopo il consumo di un pasto, quando il livello del glucosio nel sangue aumenta temporaneamente. Questo effetto omeostatico è il risultato di molti fattori, di cui la regolazione dell'ormone è il più importante.

Vi sono alcune patologie in cui è coinvolta l'insulina: diabete mellito, insulinoma, sindrome metabolica e sindrome da ovaie policistiche. Ci sono due tipi di diabete mellito: tipo 1 (degradazione autoimmune di insulina prodotta dalle cellule beta del pancreas con conseguente mancanza assoluta dell'insulina) e tipo 2 (sindrome multifattoriale dovuta ad una predisposizione genetica ed influenza dei fattori ambientali, ad esempio obesità, età ed inattività fisica, con conseguente resistenza all'insulina delle cellule che richiedono insulina per l'assorbimento del glucosio. Questa forma di diabete ha una componente fortemente ereditaria). In entrambi i casi la

produzione dell'insulina deve essere supportata per via farmacologica di insulina somministrata per via endovenosa.

La determinazione quantitativa dei livelli di insulina nel sangue può aiutare a determinare le dosi.

2. PRINCIPIO DEL METODO

Il test Insulin ELISA è basato sulla cattura simultanea dell'insulina umana da parte di due anticorpi monoclonali, uno immobilizzato nella micropiastra, l'altro coniugato con la perossidasi di rafano (HRP).

Dopo un determinato periodo di incubazione, la separazione libero-legato si ottiene mediante semplice lavaggio della fase solida.

L'enzima presente nella frazione legata, catalizza la reazione tra il Substrato (H_2O_2) ed il TMB-Substrate (TMB), sviluppando una colorazione blu che vira al giallo dopo aggiunta dello Stop Solution (H_2SO_4).

L'intensità del colore sviluppato è proporzionale alla concentrazione di insulina presente nel campione.

La concentrazione dell'insulina nel campione è calcolata in base ad una curva standard.

3. REATTIVI, MATERIALI E STRUMENTAZIONE

3.1. Reattivi e materiali forniti nel kit

1. Insulin Standards (6 flaconi)

STD0 (3 mL)	REF DCE002/7606-0
STD1 (1 mL)	REF DCE002/7607-0
STD2 (1 mL)	REF DCE002/7608-0
STD3 (1 mL)	REF DCE002/7609-0
STD4 (1 mL)	REF DCE002/7610-0
STD5 (1 mL)	REF DCE002/7611-0

2. Insulin Control (1 flacone, 1 mL)

La concentrazione del Controllo è Lotto-specifica ed è indicata sul Foglio di Controllo

REF DCE045/7603-0

3. Conjugate (1 flacone, 13 mL)

Anticorpo monoclonale anti-insulin coniugato a perossidasi di rafano (HRP) **REF** DCE002/7602-0

4. Coated Microplate (1 micropiastra breakable)
Anticorpo monoclonale anti-insulina adsorbito sulla micropiastra **REF DCE002/7603-0**
5. TMB-Substrate (1 flacone, 15 mL)
H₂O₂-TMB (0,26 g/L) (evitare il contatto con la pelle) **REF DCE004-0**
6. Stop Solution (1 flacone, 15 mL)
Acido Solforico 0,15 mol/L (evitare il contatto con la pelle) **REF DCE005-0**
7. 50X Conc. Wash Solution (1 flacone, 20 mL)
NaCl 45 g/L; Tween-20 55 g/L **REF DCE006-0**

3.2. Reattivi necessari non forniti nel kit

Acqua distillata.

3.3. Materiale e strumentazione ausiliare

Dispensatori automatici.

Lettore per micropiastre (450 nm).

Note

Conservare tutti i reattivi a 2÷8°C al riparo dalla luce.

Aprire la busta del reattivo 3 (Coated Microplate) solo dopo averla riportata a temperatura ambiente e chiuderla subito dopo il prelievo delle strip da utilizzare.

4. AVVERTENZE

- Questo test kit è per uso in vitro, da eseguire da parte di personale esperto.
- Usare i previsti dispositivi di protezione individuale mentre si lavora con i reagenti forniti.
- Materiali di origine animale usati per la preparazione di questo kit sono stati ottenuti da animali sani e le proteine bovine sono state ottenute da paesi non affetti da BSE, ma comunque questi materiali dovrebbero essere usati come potenzialmente contagiosi.
- Il TMB Substrato contiene un irritante, che può essere dannoso se inalato, ingerito o assorbito attraverso la cute. Per prevenire lesioni, evitare l'inalazione, l'ingestione o il contatto con la cute e con gli occhi.
- 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.
- Questo metodo permette la determinazione quantitativa di insulina da 3 a 200 µIU/mL.

5. PRECAUZIONI

- Si prega di attenersi rigorosamente alla sequenza dei passaggi indicata in questo protocollo.
- Tutti i reattivi devono essere conservati a temperatura controllata di 2-8°C nei loro contenitori originali. Eventuali eccezioni sono chiaramente indicate.
- Prima dell'uso lasciare tutti i componenti dei kit e i campioni a temperatura ambiente (22-28°C) e mescolare accuratamente.
- Non scambiare componenti dei kit di lotti diversi. Devono essere osservate le date di scadenza riportate sulle etichette della scatola e di tutte le fiale. Non utilizzare componenti oltre la data di scadenza.
- Qualora si utilizzi strumentazione automatica, è responsabilità dell'utilizzatore assicurarsi che il kit sia stato opportunamente validato.
- Un lavaggio incompleto o non accurato dei pozzetti può causare una scarsa precisione e/o un'elevato background.
- Per la riproducibilità dei risultati, è importante che il tempo di reazione di ogni pozzetto sia lo stesso. Per evitare il time shifting durante la dispensazione degli reagenti, il tempo di dispensazione dei pozzetti non dovrebbe estendersi oltre i 10 minuti. Se si protrae oltre, si raccomanda di seguire lo stesso ordine di dispensazione. Se si utilizza più di una piastra, si raccomanda di ripetere la curva di calibrazione in ogni piastra.
- L'aggiunta del TMB Substrato dà inizio ad una reazione cinetica, la quale termina con l'aggiunta della Stop Solution. L'aggiunta del TMB Substrato e della Stop Solution deve avvenire nella stessa sequenza per evitare tempi di reazione differenti.
- Osservare le linee guida per l'esecuzione del controllo di qualità nei laboratori clinici testando controlli e/o pool di sieri.
- Osservare la massima precisione nella ricostituzione e dispensazione dei reagenti.
- Non usare campioni microbiologicamente contaminati, altamente lipemici o emolizzati.
- I lettori di micropiastre leggono l'assorbanza verticalmente. Non toccare il fondo dei pozzetti.

6. PROCEDIMENTO

6.1. Preparazione degli Standard (S₀...S₅)

Gli standards hanno le seguenti concentrazioni:

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

Una volta aperti gli standards sono stabili per almeno 60 giorni a 2÷8°C. Contengono un conservante.

6.2. Preparazione della Wash Solution

Prima dell'uso, diluire il contenuto di ogni fiala di soluzione di lavaggio tamponata concentrata (50x) con acqua distillata fino al volume di 1000 mL. Per preparare volumi minori rispettare il rapporto di diluizione di 1:50. La soluzione di lavaggio diluita è stabile a 2÷8°C per almeno 30 giorni.

6.3. Preparazione del campione

Seguire le buone norme di laboratorio nell'utilizzo di prodotti a base di sangue.

Per un accurato confronto al fine di determinare i valori normali, dovrebbero essere prelevati campioni di siero la mattina a digiuno.

Per ottenere il siero, il sangue dovrebbe essere raccolto in un tubo per prelievi senza additivi o anticoagulanti. Permettere al sangue di coagularsi. Centrifugare il campione per separare il siero dalle cellule.

I campioni dovrebbero essere refrigerati a 2÷8°C per un periodo massimo di 5 giorni. Se non possono essere dosati entro questo tempo, dovrebbero essere conservati a -20°C fino a 30 giorni. Evitare ripetuti cicli di congelamento e scongelamento.

Campioni di pazienti con concentrazioni di insulina al di sopra dei 200 µIU/mL possono essere diluiti (ad esempio 1:10 o superiori) con lo standard 0 e testati di nuovo. La concentrazione dei campioni si ottiene moltiplicando il risultato per il fattore di diluizione.

Il Controllo è pronto all'uso.

6.4. Procedimento

Portare tutti i reattivi a temperatura ambiente (22÷28°C).

Allestire in doppio i pozzetti della micropiastra per ciascuno degli standard, controlli e campioni da testare e un pozzetto per il bianco. Riporre le strip della micropiastra non utilizzate nell'apposita busta di alluminio e conservare a 2-8°C.

Reagente	Standard	Campione /Controllo	Bianco
Standard S ₀ -S ₅	100 µL		
Campione /Controllo		100 µL	
Conjugate	100 µL	100 µL	
Incubare 2 h a temperatura ambiente (22-28°C). Allontanare la miscela di reazione. Lavare i pozzetti 3 volte con 0,3 mL di Wash Solution diluita.			
TMB Substrate	100 µL	100 µL	100 µL
Incubare 15 minuti al buio a temperatura ambiente (22-28°C).			
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL
Agitare delicatamente la piastra. Leggere l'assorbanza (E) a 450 nm contro il Bianco.			

7. CONTROLLO QUALITA'

Ogni laboratorio dovrebbe testare i controlli a valori bassi, medi e alti della curva di responso standard per monitorare le performance del kit. Questi controlli dovrebbero essere trattati come sconosciuti ed i valori determinati in ogni procedura analitica eseguita. Tabelle di controllo di qualità dovrebbero essere effettuate per seguire le prestazioni dei reagenti forniti. Metodi statistici pertinenti dovrebbero essere usati per accertarne le tendenze. Deviazioni significative dalle prestazioni stabilite possono indicare un inosservato cambiamento nelle condizioni sperimentali o il decadimento dei reattivi del kit. Reattivi freschi dovrebbero essere utilizzati per determinare la causa delle variazioni.

7.1. Interpretazione dei risultati

Se per calcolare i risultati è stato usato il computer, è imperativo che i valori dei calibratori cadano entro il 10 % delle concentrazioni assegnate.

8. RISULTATI

8.1. Note

La OD dello Standard 5 dovrebbe essere $\geq 1,0$.

La densità ottica (O.D.) di alcuni tra calibratori e campioni potrebbe risultare maggiore di 3,0, in questo caso, potrebbero essere fuori dal range di misura del lettore di micropiastra. È quindi necessario, per O.D. maggiori di 3,0, effettuare una lettura 405 nm oltre che a 450 nm e a 620 nm (filtro di riferimento per la sottrazione delle interferenze dovute alla plastica).

Per lettori di micropiastre non progettati per leggere la piastra a tre differenti lunghezze d'onda allo stesso

tempo, è consigliabile di procedere nel seguente modo:

- Leggere la micropiastra a 450 nm ed a 620 nm.
- Leggere ancora la piastra a 405 nm ed a 620 nm.
- Trovare I pozzetti le quali OD a 450 nm sono maggiori di 2,0
- Selezionare le corrispondenti ODs lette a 405 nm e moltiplicare questi valori a 405 nm per il fattore di conversione 3,0 (dove $OD\ 450/OD\ 405 = 3,0$), che è: $OD\ 450\ nm = OD\ 405\ nm \times 3,0$.

Attenzione: Il fattore di conversione 3,0 è solamente suggerito. Per una migliore accuratezza, l'utente è invitato a calcolarsi il fattore di conversione specifico per il proprio lettore.

8.2. Estinzione Media

Calcolare l'estinzione media (Em) di ciascun punto della curva standard ($S_0 - S_5$) e di ogni campione.

8.3. Curva Standard – Metodo automatico

Usare la smoothed cubic spline (suggerita) oppure la funzione 4 parametri logistic come algoritmo di calcolo.

8.4. Curva Standard – Metodo manuale

Una curva di responso è usata per determinare la concentrazione di insulina in un campione sconosciuto.

Registrare le OD ottenute dal tabulato del lettore della micropiastra conforme all'esempio 1.

Mettere in grafico le OD medie per ogni duplicato degli standard contro le concentrazioni corrispondenti di insulina in $\mu IU/mL$ su grafico lineare.

Disegnare la migliore curva che fitti i valori attraverso i punti disegnati.

Per determinare la concentrazione di insulina per un campione incognito, localizzare la OD media dei duplicati dei campioni incogniti corrispondenti sull'asse verticale del grafico, trovare il punto di intersezione sulla curva e leggere la concentrazione (in $\mu IU/mL$) sull'asse orizzontale del grafico (è possibile ricavare la media dei duplicati del campione incognito come indicato).

9. VALORI DI RIFERIMENTO

I livelli di insulina sono consistentemente più alti in plasma che in siero; tuttavia è preferibile usare siero. I range assegnati da Diametra sono in accordo con i lavori pubblicati in letteratura.

Questi range dovrebbero essere usati solo come indicazione:

	$\mu IU/mL$
Bambini <12 yrs	<10
Adulti (Normali)	0.7 – 9.0
Diabetici (Tipo II)	0.7 – 25

10. PARAMETRI CARATTERISTICI

10.1. Precisione

10.1.1. Intra-Assay

La variabilità all'interno dello stesso kit è stata determinata replicando (20x) tre differenti livelli di siero. La variabilità intra-assay è $\leq 5,0\%$.

10.1.2. Inter-Assay

La variabilità tra kit differenti è stata determinata replicando tre differenti livelli di siero con kit appartenenti a lotti diversi. La variabilità inter-assay è $\leq 10,0\%$.

10.2. Specificità

L'anticorpo impiegato presenta le seguenti reazioni crociate, valutata aggiungendo le sostanze interferenti. La cross-reattività è stata calcolata derivando il rapporto tra dose di sostanze interferenti su dose di insulina necessaria per ottenere la stessa assorbanza:

Insulina	100%
Proinsulina	N.D.
C-Peptide	N.D.

10.3. Accuratezza

La prova di recupero condotta su tre campioni arricchiti con 7 - 14 - 28 - 56 $\mu IU/mL$ di antigene ha dato un valore medio ($\pm SD$) di $101,02\% \pm 5,57\%$.

La prova di diluizione condotta su tre campioni diluiti 2 - 4 - 8 volte ha dato un valore medio ($\pm SD$) di $96,94\% \pm 5,41\%$.

10.4. Sensibilità

La concentrazione minima di insulina misurabile che può essere distinta dallo Standard 0 è $0,25\ \mu IU/mL$.

10.5. Correlazione

Il kit Insulin (Diametra) è stato comparato con un metodo di riferimento. Sono stati testati 30 campioni di siero. I dati sono stati confrontati mediante analisi di regressione lineare. La curva di regressione è:
(Insulin Diametra) = $0,88 \times (\text{metodo di rif.}) - 0,23$
 $r^2 = 0,963$

10.6. Hook Effect

Il kit Diametra Insulin non presenta effetto Hook fino a $25000\ \mu IU/mL$.

11. DISPOSIZIONI PER LO SMALTIMENTO

I reagenti devono essere smaltiti in accordo con le leggi locali.

BIBLIOGRAFIA

- Eastham R.D Biochemical Values in Clinical Medicine, 7th Ed. Bristol. England. Jonh Wright & Sons, Ltd (1985).
- Gerbitz, V.K.D., J. Clin. Chem. Biochem. 18, 313-326 (1980)
- Boehm TM, et al Diabetes Care 479-490. (1979)
- Wayne PA National Committee for Clinical Laboratory Standards. Procedure for the collection of diagnostic blood specimens by venipuncture: approved standards. 4th Ed. NCCLS (1988)
- Turkinton RW., et al Archive of Internal Med. 142
- Sacks BD Carbohydrates in Burtis, C.A. and Ashwood, AR (Eds) Tietz Textbook OF Clinical Chemistry. 2nd Ed. Philadelphia w. B. Saunders Co. 1994
- Kahn CR, et al. Diabetes Care 2 283 – 295 (1979)

Ed. 09/2011

DCM076-6

DiaMetra S.r.l. Headquater: Via Garibaldi, 18

20090 SEGRATE (MI) Italy

Tel. 0039-02-2139184 – 02-26921595

Fax 0039-02-2133354.

Manufactory: Via Giustozzi 35/35a – Z.I Paciana –

06034 FOLIGNO (PG) Italy

Tel. 0039-0762-24864

Fax 0039-0762-316197

E-mail: info@diametra.com



INSULIN

Direct immunoenzymatic determination of insulin level in human serum or plasma

IVD



LOT

See external label

2°C 8°C



Σ = 96 tests

REF DKO076

INTENDED USE

Insulin kit is a direct solid phase enzyme immunoassay for quantitative determination of insulin in human serum or plasma.

Insulin kit is intended for laboratory use only.

1. CLINICAL SIGNIFICANCE

Insulin is a polypeptide hormone that regulates carbohydrate metabolism. Apart from being the primary effector in carbohydrate homeostasis, it has effects on fat metabolism and it can change the liver's ability to release fat stores.

Insulin is involved in: control of cellular intake of glucose in muscle and adipose tissue, increase of DNA replication and protein synthesis, modification of the activity of numerous enzyme (allosteric effect), increased glycogen, fatty acid synthesis, aminoacid uptake, decreased proteinolysis, lipolysis, gluconeogenesis.

Beta cells release insulin in a glucose-dependent way.

In most humans blood glucose levels vary from about 70 mg/dL to perhaps 110 mg/dL (3.9 to 6.1 mmol/L) except shortly after eating when the blood glucose level rises temporarily. This homeostatic effect is the result of many factors, of which hormone regulation is the most important.

There are several conditions in which insulin disturbance is pathologic: diabetes mellitus, insulinoma, metabolic syndrome and polycystic ovary syndrome. There are two types of diabetes mellitus: type 1 (autoimmune-mediated destruction of insulin producing beta cells in the pancreas resulting in absolute insulin deficiency), and type 2 (multifactor syndrome with combined influence of genetic susceptibility and influence of environmental factors, the best known being obesity, age, and physical inactivity, resulting in insulin resistance in cells requiring insulin for glucose absorption. This form of diabetes is strongly inherited). In both cases the insulin production must be increased by medication or delivering insulin by intravenous

method.

The quantitative determination of insulin can help to determinate the dose to delivery.

2. PRINCIPLE

Insulin ELISA test is based on simultaneous binding of human insulin by two monoclonal antibodies, one immobilized on microwell plates and the other conjugates with horseradish peroxidase (HRP).

After incubation, the bound/free separation is performed by a simple solid-phase washing.

The enzyme in the bound-fraction reacts with the Substrate (H_2O_2) and the TMB Substrate and develops a blu color 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.

The insulin concentration in the sample is calculated based on a standard curve.

3. REAGENT, MATERIAL AND INSTRUMENTATION

3.1. Reagent and material supplied in the kit

1. Insulin Standards (6 vials)

STD0 (3 mL)	REF DCE002/7606-0
STD1 (1 mL)	REF DCE002/7607-0
STD2 (1 mL)	REF DCE002/7608-0
STD3 (1 mL)	REF DCE002/7609-0
STD4 (1 mL)	REF DCE002/7610-0
STD5 (1 mL)	REF DCE002/7611-0

2. Insulin Control (1 vial, 1 mL)

Concentration of Control is Lot-specific and is indicated on Quality Control Report

REF DCE045/7603-0

3. Conjugate (1 vial, 13 mL)

Monoclonal antibody anti-insulin conjugated with horseradish peroxidase (HRP) REF DCE002/7602-0

4. Coated Microplate (1 microplate breakable)

Monoclonal antibody 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)
REF DCE004-0
6. Stop Solution (1 vial, 15 mL)
Sulphuric acid 0.15 mol/L (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
REF DCE006-0

3.2. Reagents necessary not supplied

Distilled water.

3.3. Auxiliary materials and instrumentation

Automatic dispenser.

Microplates reader (450 nm).

Note

Store all reagents between 2÷8°C in the dark.

Open the bag of reagent 3 (Coated Microplate) only when it is at room temperature and close it immediately after use.

4. WARNINGS

- This kit is intended for in vitro use by professional persons only.
- Use appropriate personal protective equipment while working with the reagents provided.
- 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.
- The TMB Substrate contains an irritant, which may be harmful if inhaled, ingested or absorbed through the skin. To prevent injury, avoid inhalation, ingestion or contact with skin and eyes.
- The Stop Solution consists of a diluted sulphuric acid solution. Sulphuric acid is poisonous and 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 directed sunlight, metals or oxidants.
- This method allows the quantitative determination of insulin from 3 to 200 µIU/mL.

5. PRECAUTIONS

- Please adhere strictly to the sequence of pipetting steps provided in this protocol.
- 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 dates printed on the labels of the box and of the vials must be observed. Do not use any kit component beyond their expiry date.
- If you use automated equipment is your responsibility to make sure that the kit has been appropriately tested.
- The incomplete or inaccurate liquid removal from the wells could influence the assay precision and/or increase the background.
- 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 should not be used in the assay. Highly lipemic or haemolysed specimens should similarly not be used
- Plate readers measure vertically. Do not touch the bottom of the wells.

6. PROCEDURE

6.1. Preparation of the Standards (S₀...S₅)

The Standards have the following concentrations:

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

Once opened, the standards are stable 2 months at 2÷8°C . A preservative has been added.

6.2. Preparation of Wash Solution

Dilute the contents of each vial of the buffered wash solution concentrate (50x) with distilled water to a final volume of 1000 ml prior to use. For smaller volumes respect the 1:50 dilution ratio. The diluted wash solution is stable for 30 days at 2÷8°C.

6.3. Preparation of the Sample

Follow Good laboratory procedures for handling blood products.

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

To obtain the serum, the blood should be collected in a venipuncture tube without additives or anti-coagulants. Allow the blood to clot. Centrifuge the specimen to separate the serum from the cells.

Samples may be refrigerated at $2\pm 8^{\circ}\text{C}$ for a maximum period of 5 days. If the specimens cannot be assayed within this time, the samples may be stored at temperatures of -20°C for up to 30 days. Avoid repetitive freezing and thawing.

Patient specimens with insulin concentrations above $200\text{ }\mu\text{IU/mL}$ may be diluted (for example 1:10 or higher) with standard zero and re-assayed. The sample's concentration is obtained by multiplying the result by the dilution factor.

The Control is ready for use.

6.4. Procedure

Bring all reagents to room temperature ($22\pm 28^{\circ}\text{C}$).

Format the microplate wells for each calibrator, control and patient specimen to be assayed in duplicate and one well for blank. Replace any unused microwell strips back into the aluminium bag seal and store at $2\pm 8^{\circ}\text{C}$.

Reagent	Standard	Sample/ Control	Blank
Standard S_0-S_5	100 μL		
Sample/ Control		100 μL	
Conjugate	100 μL	100 μL	
Incubate 2 h at room temperature ($22-28^{\circ}\text{C}$). Remove the contents from each well. Wash the wells 3 times with 300 μL of diluted Wash Solution.			
TMB Substrate	100 μL	100 μL	100 μL
Incubate 15 minutes in the dark at room temperature ($22\pm 28^{\circ}\text{C}$).			
Stop Solution	100 μL	100 μL	100 μL
Shake the microplate gently. Read the absorbance (E) at 450 nm against Blank.			

7. QUALITY CONTROL

Each laboratory should assay controls at levels in the low, medium and high ranges of the dose response curve for monitoring assay performance. These controls should be treated as unknowns and values determined in every test procedure performed. Quality control charts should be maintained to follow

the performance of the supplied reagents. Pertinent statistical methods should be employed to ascertain trends. Significant deviation from established performance can indicate unnoticed change in experimental conditions or degradation of kit reagents. Fresh reagents should be used to determine the reason for the variations.

7.1. Interpretation of results

If computer controlled data reduction is used to calculate the results of the test, it is imperative that the predicted values for the calibrators fall within 10% of the assigned concentrations.

8. RESULTS

8.1. Note

The OD of Calibrator 5 should be ≥ 1 .

The optical densities (O.D.s) of some calibrators and samples may be higher than 3.0, in such a case, they could be out of the measurement range of the microplate reader. It is therefore necessary, for O.D.s higher than 3.0, to 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 $\text{OD } 450/\text{OD } 405 = 3.0$), that is:
$$\text{OD } 450\text{ nm} = \text{OD } 405\text{ nm} \times 3.0.$$

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.

8.2. Mean Absorbance

Calculate the mean of the absorbance (E_m) for each point of the standard curve and of each sample.

8.3. Standard Curve – Automatic method

Use the smoothed cubic spline– preferred – or 4 parameters logistic function as calculation algorithm.

8.4. Standard Curve – Manual method

A dose response curve is used to ascertain the concentration of insulin in unknown specimens.

Record the OD obtained from the printout of the microplate reader. Plot the average OD for each duplicate calibrator versus the corresponding insulin concentration in $\mu\text{IU/mL}$ on linear graph paper.

Draw the best-fit curve through the plotted points.

To determine the concentration of insulin for an unknown, locate the average absorbance of the duplicates for each unknown on the vertical axis of the graph, find the intersecting point on the curve, and read the concentration (in $\mu\text{IU/mL}$) from the horizontal axis of the graph (the duplicates of the unknown may be averaged as indicated).

9. REFERENCE VALUES

Insulin values are consistently higher in plasma than in serum; thus, serum is preferred.

The following ranges have been assigned by Diametra in concordance with the published literature.

These ranges should be used as guidelines only:

	$\mu\text{IU/mL}$
Children <12 yrs	<10
Adult (Normal)	0.7 – 9.0
Diabetic (Type II)	0.7 – 25

10. PERFORMANCE AND CHARACTERISTICS

10.1. Precision

10.1.1. Intra Assay Variation

Within run variation was determined by replicate (20x) determination of three different levels of serum in one assay. The within assay variability is $\leq 5.0\%$.

10.1.2. Inter Assay Variation

Between run variation was determined by replicate measurements of three different level of serum in different lots. The between assay variability is $\leq 10.0\%$.

10.2. Specificity

The cross reaction of the antibody calculated by deriving a ratio between dose of interfering substance to dose of insulin needed to produce the same absorbance:

Insulin	100%
Proinsulin	N.D.
C-Peptide	N.D.

10.3. Accuracy

The recovery on three serum samples spiked with 7 - 14 - 28 - 56 $\mu\text{IU/mL}$ of antigen gave an average value ($\pm$ SD) of $101.02\% \pm 5.57\%$.

The dilution test performed on three sera diluted 2 - 4 - 8 times gave an average value ($\pm$ SD) of $96.94\% \pm 5.41\%$.

10.4. Sensitivity

The lowest detectable concentration of insulin that can be distinguished from the zero standard is $0.25 \mu\text{IU/mL}$.

10.5. Correlation

Diametra Insulin ELISA was compared to a reference method Insulin assay. 30 serum samples were compared by linear regression analysis.

The linear regression curve was calculated:

$$(\text{Insulin Diametra}) = 0.88 * (\text{Ref. method}) - 0.23$$

$$r^2 = 0.963$$

10.6. Hook Effect

Diametra Insulin assay shows no Hook effect until 25000 mIU/mL.

11. WASTE MANAGEMENT

Reagents must be disposed off in accordance with local regulations.

BIBLIOGRAPHY

- Eastham R.D Biochemical Values in Clinical Medicine, 7th Ed. Bristol. England. Jonh Wright & Sons, Ltd (1985).
- Gerbitz, V.K.D., J. Clin. Chem. Biochem. 18, 313-326 (1980)
- Boehm TM, et al Diabetes Care 479-490. (1079)
- Wayne PA National Committee for Clinical Laboratory Standards. Procedure for the collection of diagnostic blood specimens by venipuncture: approved standards. 4th Ed. NCCLS (1988)
- Turkinton RW, et al Archive of Internal Med. 142
- Sacks BD Carbohydrates in Burtis, C.A. and Ashwood, AR (Eds) Tietz Textbook OF Clinical Chemistry. 2nd Ed. Philadelphia w. B. Saunders Co. 1994
- Kahn CR, et al. Diabetes Care 2 283 – 295 (1979)

Ed. 09/2011

DCM076-6

DiaMetra S.r.l. Headquarter: via Garibaldi, 18
20090 SEGRATE (MI) Italy

Tel. 0039-02-2139184 – 02-26921595

Fax 0039-02-2133354.

Manufactory: Via Giustozzi 35/35a – Z.I Paciana –
06034 FOLIGNO (PG) Italy

Tel. 0039-0762-24864

Fax 0039-0762-316197

E-mail: info@diametra.com

	DIA.METRA SRL	
Mod. PIS	PACKAGING INFORMATION SHEET	

IT

Spiegazione dei simboli

GB

Explanation of symbols

FR

Explication des symboles

ES

Significado de los simbolos

DE

Verwendete Symbole

PT

Explicação dos simbolos

	DE In vitro Diagnostikum ES Producto sanitario para diagnóstico In vitro FR Dispositif medical de diagnostic in vitro GB In vitro Diagnostic Medical Device IT Dispositivo medico-diagnostico in vitro PT Dispositivos medicos de diagnostico in vitro		DE Hergestellt von ES Elaborado por FR Fabriqué par GB Manufacturer IT Produttore PT Produzido por
REF	DE Bestellnummer ES Número de catálogo FR Références du catalogue GB Catalogue number IT Numero di Catalogo PT Número do catálogo	 yyyy-mm	DE Herstellungs datum ES Fecha de fabricacion FR Date de fabrication GB Date of manufacture IT Data di produzione PT Data de produção
 yyyy-mm-dd	DE Verwendbar bis ES Establa hasta (usar antes de último día del mes) FR Utiliser avant (dernier jour du mois indiqué) GB Use by (last day of the month) IT Utilizzare prima del (ultimo giorno del mese) PT Utilizar (antes ultimo dia do mês)		DE Biogefährdung ES Riesco biológico FR Risque biologique GB Biological risk IT Rischio biologico PT Risco biológico
	DE Gebrauchsanweisung beachten ES Consultar las instrucciones FR Consulter le mode d'emploi GB Consult instructions for use IT Consultare le istruzioni per l'uso PT Consultar instruções para uso		DE Chargenbezeichnung ESCodigo de lote FRNumero de lot GBBatch code ITCodice del lotto PTCodigo do lote
 $\Sigma = xx$	DE Ausreichend für "n" Tests ES Contenido suficiente para "n" tests FR Contenu suffisant pour "n" tests GB Contains sufficient for "n" tests IT Contenuto sufficiente per "n" saggi PT Contém o suficiente para "n" testes		DE Inhalt ES Contenido del estuche FR Contenu du coffret GB Contents of kit IT Contenuto del kit PT Conteúdo do kit
 Max Min	DE Temperaturbereich ES Límitación de temperatura FR Limites de température de conservation GB Temperature limitation IT Limiti di temperatura PT Temperaturas limites de conservação		

	DIA.METRA SRL	
<i>Mod. PIS</i>	PACKAGING INFORMATION SHEET	

SUGGERIMENTI PER LA RISOLUZIONE DEI PROBLEMI/TROUBLESHOOTING

ERRORE CAUSE POSSIBILI/ SUGGERIMENTI

Nessuna reazione colorimetrica del saggio

- mancata dispensazione del coniugato
- contaminazione del coniugato e/o del Substrato
- errori nell'esecuzione del saggio (es. Dispensazione accidentale dei reagenti in sequenza errata o provenienti da flaconi sbagliati, etc.)

Reazione troppo blanda (OD troppo basse)

- coniugato non idoneo (es. non proveniente dal kit originale)
- tempo di incubazione troppo breve, temperatura di incubazione troppa bassa

Reazione troppo intensa (OD troppo alte)

- coniugato non idoneo (es. non proveniente dal kit originale)
- tempo di incubazione troppo lungo, temperatura di incubazione troppa alta
- qualità scadente dell'acqua usata per la soluzione di lavaggio (basso grado di deionizzazione)
- lavaggi insufficienti (coniugato non completamente rimosso)

Valori inspiegabilmente fuori scala

- contaminazione di pipette, puntali o contenitori- lavaggi insufficienti (coniugato non completamente rimosso)

CV% intra-assay elevato

- reagenti e/o strip non portate a temperatura ambiente prima dell'uso
- il lavatore per micropiastre non lava correttamente (suggerimento: pulire la testa del lavatore)

CV% intersaggio elevato

- condizioni di incubazione non costanti (tempo o temperatura)
- controlli e campioni non dispensati allo stesso tempo (con gli stessi intervalli) (controllare la sequenza di dispensazione)
- variabilità intrinseca degli operatori

ERROR POSSIBLE CAUSES / SUGGESTIONS

No colorimetric reaction

- no conjugate pipetted reaction after addition
- contamination of conjugates and/or of substrate
- errors in performing the assay procedure (e.g. accidental pipetting of reagents in a wrong sequence or from the wrong vial, etc.)

Too low reaction (too low ODs)

- incorrect conjugate (e.g. not from original kit)
- incubation time too short, incubation temperature too low

Too high reaction (too high ODs)

- incorrect conjugate (e.g. not from original kit)
- incubation time too long, incubation temperature too high
- water quality for wash buffer insufficient (low grade of deionisation)
- insufficient washing (conjugates not properly removed)

Unexplainable outliers

- contamination of pipettes, tips or containers

insufficient washing (conjugates not properly removed) too high within-run

- reagents and/or strips not pre-warmed to CV% Room Temperature prior to use
- plate washer is not washing correctly (suggestion: clean washer head)

too high between-run - incubation conditions not constant (time, CV % temperature)

- controls and samples not dispensed at the same time (with the same intervals) (check pipetting order)
- person-related variation