



Insulin

DPC®

Coat-A-Count® Insulin

English

Intended Use: Coat-A-Count Insulin is a solid-phase ^{125}I radioimmunoassay designed for the quantitative measurement of insulin in serum. It is intended strictly for *in vitro* diagnostic use as an aid in clinical diagnosis.

Catalog Numbers: **TKIN1** (100 tubes), **TKIN2** (200 tubes), **TKIN5** (500 tubes), **TKINX** (1000 tubes).



The 100-tube kit contains less than 3 microcuries (111 kilobecquerels) of radioactive ^{125}I insulin; the 200-tube kit contains less than 6 microcuries (222 kilobecquerels); the 500-tube kit contains less than 15 microcuries (555 kilobecquerels); and the 1000-tube kit contains less than 30 microcuries (1110 kilobecquerels).

CDC Analyte Identifier Code: **2812**
CDC Test System Identifier Code: **13030**
CLIA Complexity Category: **High**

Summary and Explanation of the Test

Human insulin is a polypeptide hormone originating in the beta cells of the pancreas and serving as a principal regulator for the storage and production of carbohydrates. Its secretion is normally stimulated by increases in the amount of glucose in circulation. This leads to higher insulin levels and more rapid tissue-assimilation of glucose — followed by a decline in the insulin level as the glucose level subsides.

In a number of conditions, notably insulinoma and diabetes, this relationship is impaired. Insulin tends to circulate at inappropriately high levels in patients with insulin-secreting pancreatic tumors; such tumors can thus be a cause of hypoglycemia. Accordingly, insulin immunoassays — used sometimes in connection with provocative doses of tolbutamide or calcium — play an essential role in the identification (and localization) of insulinomas. The finding of fasting hypoglycemia in association with

an *inappropriately high* serum insulin concentration is considered diagnostic.

Insulin levels do not figure in the subclassification of diabetes worked out by the National Diabetes Data Group. Nevertheless, when obtained in the course of a glucose tolerance test, they appear to be of some prognostic value in predicting the benefits of insulin therapy and the likelihood of progression to insulin-dependence and the complications (such as retinopathy) characteristic of diabetes.

The application of insulin radioimmunoassay to patients already undergoing insulin therapy is complicated by the fact that such therapy typically leads to the formation of anti-insulin antibodies capable of interfering with the assay. Some investigators have sought therefore to measure insulin in urine, or in serum samples subjected to column chromatography or PEG precipitation. But the measurement of "free" insulin remains of limited interest as a technique for monitoring insulin therapy in the absence of statistics establishing therapeutic or toxic ranges. So far it appears that glucose control in diabetics cannot in general be achieved by normalizing the insulin profile. Nor is it known at what point abnormally high insulin levels become dangerous.

Principle of the Procedure

The Coat-A-Count Insulin procedure is a solid-phase radioimmunoassay, wherein ^{125}I -labeled insulin competes for a fixed time with insulin in the patient sample for sites on insulin-specific antibody. Because the antibody is immobilized to the wall of a polypropylene tube, simply decanting the supernatant suffices to terminate the competition and to isolate the antibody-bound fraction of the radiolabeled insulin. Counting the tube in a gamma counter then yields a number, which converts by way of a calibration curve to a measure of the insulin present in the patient sample.

Reagents to Pipet: 1

Total Incubation Time: Overnight (18–24 hours) or 3 hours (with Calibrator B omitted).

Total Counts at Iodination:
approximately 40,000 cpm

Warnings and Precautions

For *in vitro* diagnostic use.

Reagents: Store at 2–8°C in a refrigerator designated for incoming radioactive materials. Dispose of in accordance with applicable laws.

Do not use reagents beyond their expiration dates.

Some components supplied in this kit may contain human source material and/or other potentially hazardous ingredients which necessitate certain precautions.

Follow universal precautions, and handle all components as if capable of transmitting infectious agents. Source materials derived from human blood were tested and found nonreactive for syphilis; for antibodies to HIV 1 and 2; for hepatitis B surface antigen; and for antibodies to hepatitis C.

Sodium azide, at concentrations less than 0.1 g/dL, has been added as a preservative. On disposal, flush with large volumes of water to prevent the buildup of potentially explosive metal azides in lead and copper plumbing.

Water: Use distilled or deionized water.

Radioactivity

A copy of any radioisotope license certificate (Specific or General) issued to a US customer must be on file with Diagnostic Products Corporation before kits or components containing radioactive material can be shipped. These radioactive materials may be acquired by any customer with the appropriate Specific license. Under a General license these radioactive materials may be acquired only by physicians, veterinarians in the practice of veterinary medicine, clinical laboratories and hospitals — and strictly for *in vitro* clinical or laboratory tests not involving external or internal administration of the radioactive material or its radiation to human beings or other animals. Its acquisition, receipt, storage, use, transfer and disposal are all subject to the regulations and a (General or Specific) license of the U.S. Nuclear Regulatory Commission or a State with which the NRC has entered into an

agreement for the exercise of regulatory control.

Handle radioactive materials according to the requirements of your General or Specific license. To minimize exposure to radiation, the user should adhere to guidelines set forth in the National Bureau of Standards publication on the *Safe Handling of Radioactive Materials* (Handbook No. 92, issued March 9, 1964) and in subsequent publications issued by State and Federal authorities.

Wipe up spills promptly and decontaminate affected surfaces. Avoid generation of aerosols. Dispose of solid radioactive waste according to license requirements. General licensees (holders of NRC Form 483) may dispose of solid radioactive waste as nonradioactive waste, after removing labeling. Specific licensees (NRC Form 313) should refer to Title 10, Code of Federal Regulations, Part 20. Licensees in Agreement States should refer to the appropriate regulations of their own state. General licensees may dispose of liquid radioactive waste of the type contained in this product through a laboratory sink drain. Licensees must remove or deface labels from empty containers of radioactive materials before disposal of solid waste. Specific licensees may dispose of small quantities of liquid radioactive waste of the type used in this product through a laboratory sink drain. Refer to the appropriate regulations applicable to your laboratory.

Materials Supplied: Initial Preparation

Insulin Ab-Coated Tubes (TIN1)

Polypropylene tubes coated with antibodies to insulin and packaged in zip-lock bags. Store refrigerated and protected from moisture, carefully resealing the bags after opening. Stable at 2–8°C until the expiration date marked on the bag. Color: lime green.

TKIN1: 100 tubes. **TKIN2:** 200 tubes.

TKIN5: 500 tubes. **TKINX:** 1000 tubes.

¹²⁵I Insulin (TIN2)

A *concentrate*, consisting of iodinated insulin. To each vial add a measured **100 mL** of distilled or deionized water, and mix by *gentle* inversion. Stable at 2–8°C for 30 days after preparation, or until the

expiration date marked on the label.

TKIN1: 1 vial. **TKIN2:** 2 vials.

TKIN5: 5 vials. **TKINX:** 10 vials.

Insulin Calibrators (INC3–9)

Seven vials, labeled A through G, of lyophilized processed in nonhuman serum. *At least 30 minutes before use*, reconstitute the zero calibrator A with **6.0 mL** of distilled or deionized water, and each of the remaining calibrators B through G with **3.0 mL** of distilled or deionized water. Use volumetric pipets and mix by *gentle* swirling. Stable at -20°C for 30 days after reconstitution. Aliquot, if necessary, to avoid repeated freezing and thawing.

TKIN1: 1 set. **TKIN2:** 1 set.

TKIN5: 2 sets. **TKINX:** 3 sets.

The reconstituted calibrators have *lot-specific* insulin values representing *approximately* 0, 5, 15, 50, 100, 200 and 350 micro-International Units of insulin per milliliter ($\mu\text{IU/mL}$, WHO 1st IRP 66/304) in processed in nonhuman serum. Intermediate calibration points can be obtained by mixing the calibrators in suitable proportions.

Materials Required But Not Provided

Gamma counter — compatible with standard 12x75 mm tubes

Vortex mixer

Reagent Preparation

Distilled or deionized water

Graduated cylinder: 100 mL

Volumetric pipets: 3.0 mL and 6.0 mL

Radioimmunoassay

Plain 12x75 mm polypropylene tubes — for use as NSB tubes, available from DPC

Micropipets: 200 μL and 1,000 μL .

Foam decanting rack — available from DPC

Logit-log graph paper — available from DPC (catalog number: ZP797)

A tri-level, human serum-based immunoassay control, containing insulin as one of over 25 assayed constituents, is available from DPC (catalog number: CON6).

Specimen Collection

No special preparations are necessary. Collect blood by venipuncture²⁰ into plain tubes (without anticoagulant), noting the time of collection, and separate the serum from the cells.

The use of an ultracentrifuge is recommended to clear lipemic samples.

Hemolyzed, icteric or grossly contaminated samples may give erroneous results.

Blood collection tubes from different manufacturers may yield differing values, depending on materials and additives, including gel or physical barriers, clot activators and/or anticoagulants. Coat-A-Count Insulin has not been tested with all possible variations of tube types. Consult the section on Alternate Sample Types for details on tubes that have been tested.

Volume Required: 200 μL of serum per tube.

In collecting samples for insulin determinations, it is important to avoid hemolysis, which can lead to spuriously low results.^{22,23}

Storage: $2-8^{\circ}\text{C}$ for 7 days, or for up to 3 months frozen at -20°C .²¹

Before assay, allow the samples to come to room temperature ($15-28^{\circ}\text{C}$) and mix by *gentle* swirling or inversion. Aliquot, if necessary, to avoid repeated thawing and freezing. Do *not* attempt to thaw frozen specimens by heating them in a waterbath. Samples contaminated from the administration of radioactivity to the patient are unsuitable for use.

Radioimmunoassay Procedure

All components must be at room temperature ($15-28^{\circ}\text{C}$) before use. An automatic pipettor-diluter is *not* recommended for this assay.

- 1 Plain Tubes:** Label four plain (uncoated) 12x75 mm polypropylene tubes T (total counts) and NSB (nonspecific binding) in duplicate.

Because nonspecific binding in the Coat-A-Count procedure is characteristically low, the NSB tubes may be safely omitted without compromising accuracy or quality control.

Coated Tubes: Label fourteen Insulin Ab-Coated Tubes A (maximum binding) and B through G in duplicate. Label additional antibody-coated tubes, also in duplicate, for controls and patient samples.

Calibrator	Approximate $\mu\text{IU/mL}$ 1st IRP [66/304]
A (MB)	0
B*	5
C	15
D	50
E	100
F	200
G	350

* Omit calibrator B if the alternate, 3-hour incubation at room temperature (15–28°C) will be used at step 4.

- Pipet **200 μL** of the zero calibrator A into the NSB and A tubes, and **200 μL** of each remaining calibrator, control and patient sample into the tubes prepared. **Pipet directly to the bottom.**

Dilute patient serum samples expected to contain insulin concentrations greater than the highest calibrator with the zero calibrator before assay.

It is good laboratory practice to use a disposable-tip micropipet, changing the tip between samples, in order to avoid carryover contamination.

- Add **1.0 mL** of ^{125}I Insulin to every tube. Vortex.
Samples should not be left in the tubes for extended periods of time. Following step 2 (sample addition), step 3 (tracer addition) should be completed with minimal delay, with no more than 40 minutes elapsing between the addition of the first sample and the completion of tracer addition. Set the T tubes aside for counting (at step 6); they require no further processing.
- Incubate for **18–24 hours** at room temperature (15–28°C).
Alternatively, incubate for 3 hours at room temperature (15–28°C), omitting the 5 $\mu\text{IU/mL}$ calibrator (Calibrator B). This approach allows for same-day

comparable results (see the Performance Data sections).

- Decant thoroughly.

Removing all visible moisture will greatly enhance precision. Using a foam decanting rack, decant the contents of all tubes (except the T tubes) and allow them to drain for 2 or 3 minutes. Then strike the tubes sharply on absorbant paper to shake off all residual droplets.

- Count for **1 minute** in a gamma counter.

Calculation of Results

To calculate insulin concentrations from a logit-log representation of the calibration curve, first calculate for each pair of tubes the average NSB-corrected counts per minute:

Net Counts = (Average CPM) minus (Average NSB CPM)

Then determine the binding of each pair of tubes as a percent of maximum binding (MB), with the NSB-corrected counts of the A tubes taken as 100%:

Percent Bound = (Net Counts / Net MB Counts) $\times$ 100

(The calculation can be simplified by omitting the correction for nonspecific binding; samples within range of the calibrators yield virtually the same results when Percent Bound is calculated directly from Average CPM.)

Using logit-log graph paper, plot Percent Bound on the vertical (probability) axis against Concentration on the horizontal (logarithmic) axis for each of the nonzero calibrators, and draw a straight line approximating the path of these points. Results for the unknowns may then be read from the line by interpolation. (The calibration curve for the alternate 3-hour, room temperature (15–28°C) procedure should be based on calibrators C through G only.)

It is good practice to inspect results for agreement within replicates, and to construct a graph of the calibration curve (even if the calculations are handled by computer) as a visual check on the appropriateness of the transformation used and as a way to detect deviant calibration points. We also recommend

keeping track of these data reduction parameters:

T = Total Counts (as counts per minute)

$\%NSB = 100 \times (\text{Average NSB Counts} / \text{Total Counts})$

$\%MB = 100 \times (\text{Net Counts} / \text{Total Counts})$

And the 20, 50 and 80 percent "intercepts," where

20% = Concentration at 20 Percent Bound, etc.

Note that other approaches, e.g. a sound implementation of the 4-parameter logistic, are also acceptable. See Dudley RA, et al. Guidelines for immunoassay data reduction. Clin Chem 1985;31:1264-71.

Example Run (Basic Procedure): For illustration only, not for calculating results from another run. The values were generated with the overnight procedure. Because the calibrator values are *lot-specific*, concentrations listed in the right-most column may not match the values of the calibrators supplied in your shipment. (See "Example Run – Basic Procedure" table.)

Example Run (Alternate 3-hour Procedure): For illustration only, not for calculating results from another run. The values were generated with the 3-hour room-temperature procedure. Because the calibrator values are *lot-specific*, concentrations listed in the right-most column may not match the values of the calibrators supplied in your shipment. (See "Example Run – Alternate Procedure" table.)

Quality Control

Controls or serum pools with at least two insulin concentration levels (low and high) should routinely be assayed as unknowns.

Report patient results only if the control results for that assay meet your laboratory's established criteria for acceptability.

It is good laboratory practice to record for each assay the lot numbers of the components used, as well as the dates when they were first reconstituted or opened. We also recommend charting control results from day to day — as described, for example, in Westgard JO, et al. A multi-rule chart for quality control. Clin Chem 1981;27:493-501. Note that

repeat samples can serve as a valuable additional tool for monitoring interassay precision, and that pairs of control tubes can be spaced throughout the assay to help verify the absence of significant drift.

Expected Values

In a study of 103 serum samples from fasting adult volunteers with fasting glucose levels less than or equal to 110 mg/dL, the Coat-A-Count Insulin assay yielded a median of 8.3 $\mu\text{IU/mL}$, with 95 percent of the results being 22 $\mu\text{IU/mL}$ or less.

Laboratories should consider these results *as guidelines only*. Each laboratory should establish its own reference ranges.

Performance Data

See Tables and Graphs for data *representative* of the Coat-A-Count Insulin. Insulin results in the sections below are expressed as $\mu\text{IU/mL}$. Except as noted, all results were obtained using an overnight, room-temperature incubation.

Calibration Range: 5 – 350 $\mu\text{IU/mL}$ (WHO 1st IRP 66/304). The calibrators are *lot-specific*.

Analytical Sensitivity:

Basic Overnight Procedure: 1.2 $\mu\text{IU/mL}$

Alternate 3-hour incubation: 4.6 $\mu\text{IU/mL}$

Precision Profile: A precision profile is displayed, based on approximately 20 degrees of freedom and representing the intraassay CVs to be expected for samples assayed in duplicate using the Basic Procedure. (See "Precision Profile" graph.)

Intraassay Precision (Within-Run):

Statistics were calculated for each of five samples from the results of 20 pairs of tubes in a single assay. The study was done using the Alternate Procedure. (See "Intraassay Precision" table.)

Interassay Precision (Run-to-Run):

Statistics were calculated for each of four samples from the results of pairs of tubes in 20 different assays. The study was done using the Basic Procedure. (See "Interassay Precision" table.)

Specificity: The Coat-A-Count Insulin antiserum is highly specific for insulin, with a particularly low crossreactivity to compounds (other than insulin and pro-insulin) that might be present in patient samples. (See "Specificity" table.)

End-of-Run Effect: None up to approximately 250 tubes. (See "End-of-Run Effect" table.)

Linearity: Samples were assayed under various dilutions. (See "Linearity" table for representative data.)

Recovery: Samples spiked 1 to 19 with three insulin solutions (329, 1,420 and 3,535 $\mu\text{IU/mL}$) were assayed. (See "Recovery" table for representative data.)

Bilirubin: Severe icterus (bilirubin up to 200 mg/L) may cause an increase of values. (See "Bilirubin" table.)

Hemolysis: Presence of packed red blood cells in concentrations up to 30 $\mu\text{L/mL}$ can lead to spuriously low results.^{22,23} (See "Hemolysis" table.)

Lipemia: To simulate various degrees of lipemia, patient samples were spiked with a fat emulsion consisting of a mixture of lipids. The stock solution had a triglycerides concentration of 20,000 mg/dL . The results showed that lipemia has no clinically significant effect on the assay.

Alternate Sample Type: To assess the effect of alternate sample types, blood was collected from 20 volunteers into plain, heparinized, EDTA and Becton Dickinson SST[®] vacutainer tubes. All samples were assayed by the Coat-A-Count Insulin procedure, with the following results.

(Heparin) = $0.863 (\text{Serum}) + 1.05 \mu\text{IU/mL}$
 $r = 0.972$

(EDTA) = $0.774 (\text{Serum}) + 0.54 \mu\text{IU/mL}$
 $r = 0.952$

(SST) = $0.97 (\text{Plain Tubes}) + 1.51 \mu\text{IU/mL}$
 $r = 0.986$

Means:

21.3 $\mu\text{IU/mL}$ (Serum)
19.4 $\mu\text{IU/mL}$ (Heparin)
17.0 $\mu\text{IU/mL}$ (EDTA)
22.2 $\mu\text{IU/mL}$ (SST)

Protein Effect: To simulate various protein concentrations, experiments were performed in which 2.0 mL aliquots of a human serum pool were freeze-dried and

then reconstituted with various volumes of water. Each reconstituted aliquot was then assayed by the Coat-A-Count Insulin procedure. Note that aliquots reconstituted with half the original volume represent an extremely high protein concentration, on the order of 14 g/dL . (The factor to correct for reconstitution volume is tabulated below.) These results indicate that even wide variations in protein have virtually no effect on the Coat-A-Count Insulin assay. (See "Protein Effect" table.)

Method Comparison: The Coat-A-Count assay was compared to DPC's IMMULITE Insulin assay on 172 patient samples, with insulin concentrations ranging from approximately 5.3 to 200 $\mu\text{IU/mL}$. (See graph.) By linear regression:

(CAC) = $0.90 (\text{IML}) + 0.99 \mu\text{IU/mL}$
 $r = 0.973$

Means:

36 $\mu\text{IU/mL}$ (Coat-A-Count)
39 $\mu\text{IU/mL}$ (IMMULITE)

References

- 1) Bates HM. Insulinoma and pheochromocytoma. Lab Management 1983 (May); 21:11–12, 15. 2) Bennett PH. The diagnosis of diabetes; new international classification and diagnostic criteria. Ann Rev Med 1983;34:295–309. 3) Berntorp K, et al. Relation between plasma insulin and blood glucose in a cross-sectional population study of the oral glucose tolerance test. Acta Endocrinol 1983;102:549–56. 4) Boehm TM, Lebovitz HE. Statistical analysis of glucose and insulin responses to intravenous tolbutamide: evaluation of hypoglycemic and hyperinsulinemic states. Diabetes Care 1979;2:479–90. 5) Fajans SS, Floyd JC. Diagnosis and medical management of insulinomas. Ann Rev Med 1979;30:313–29. 6) Hirata Y, et al. Autoimmunity in diabetes mellitus. Gunma Symposia Endocrinol 1980;17:81–91. 7) Kahn CR, Rosenthal AS. Immunologic reactions to insulin: insulin allergy, insulin resistance and the autoimmune insulin syndrome. Diabetes Care 1979;2:283–95. 8) Kaplan EL, Rubinstein AH, et al. Calcium infusion: a new provocative test for insulinomas. Annals Surgery 1979;190:501–7. 9) Malone JI, Root AW. Plasma free insulin concentrations: keystone to effective management of diabetes mellitus in children. J Pediatr 1981;99:862–7. See also *ibid* 1983;102:800–2. 10) Marschner I, et al. Group experiments on the radioimmunological insulin determination. Horm Metabol Res 1974;6:293–6. 11) National Diabetes Data Group. Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. Diabetes

1979;28:1039–57. 12) Pfeifer MA, et al. Insulin secretion in diabetes mellitus. *Am J Med* 1981;70:579–88. 13) Reeves WG. Insulin antibody determination: theoretical and practical considerations. *Diabetologia* 1983;24:399–403. 14) Sachse G, Willms B. Klinische Bedeutung der Seruminsulinbestimmung: Diagnose und Prognose bei drohendem Sekundrversagen der Sulfonylharnstofftherapie. *Medizin Klinik* 1979;74:1635–40. 15) Schade DS, Eaton RP, Spencer W. Normalization of plasma insulin profiles in diabetic subjects with programmed insulin delivery. *Diabetes Care* 1980;3:9–14. 16) Service FJ, et al. Insulinoma: clinical and diagnostic features of 60 consecutive cases. *Mayo Clinic Proceed* 1976;51:417–29. 17) Turkington RW, Estkowski A, Link M. Secretion of insulin or connecting peptide; a predictor of insulin dependence of obese diabetics. *Arch Intern Med* 1982;142:1102–5. 18) Turkington RW, Weindling HK. Insulin secretion in the diagnosis of adult-onset diabetes mellitus. *JAMA* 1978;240:833–36. See also *ibid* 1979;241:1462–3. 19) Yalow R, Bauman WA. Plasma insulin in health and disease. In: Ellenberg M, Rifkin H, editors. *Diabetes mellitus; theory and practice*. New York: Excerpta Medica, 1983: 119–50. 20) National Committee for Clinical Laboratory Standards. Procedures for the collection of diagnostic blood specimens by venipuncture; approved standard. 4th ed. NCCLS Document H3-A4, Wayne, PA: NCCLS, 1998. 21) Burtis CA, Ashwood ER, editors. *Tietz textbook of clinical chemistry*. 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders, 1994:943–4. 22) Sapin R, Ongagna JC, Gasser F, Grucker D. Insulin measurements in haemolysed serum; influence of insulinase inhibitors. *Clin Chim Acta* 1998;274:111–7. 23) Chevenne D, Letailleur A, Trivin F, Porquet D. Effect of hemolysis on the concentration of insulin in serum determined by RIA and IRMA. *Clin Chem* 1998;44:354–6.

Technical Assistance

In the United States, contact DPC's Technical Services department.
Tel: 800.372.1782, 310.645.8200
Fax: 310.645.9999. To place an order:
Tel: 800.372.1782. Fax: 800.234.4372.
Outside the United States, contact your National Distributor.

The Quality System of Diagnostic Products Corporation is registered to ISO 13485:2003.

Tables and Graphs

Example Run (Basic Procedure)

Tube ¹	Duplicate CPM ²	Average CPM ³	Net CPM ⁴	Percent Bound ⁵	Approx. Insulin μ U/mL ⁶
T ⁷	36,995 37,641	37,318			
(NSB) ⁸	365 344	355			
A (MB) ⁹	13,266 13,326	13,296	12,942	100%	0
B	10,516 10,862	10,689	10,335	80%	8.5
C	8,722 8,480	8,601	8,247	64%	24
D	5,654 5,612	5,633	5,279	41%	64
E	4,082 3,947	4,015	3,660	28%	122
F	2,878 2,848	2,863	2,509	19%	225
G	1,915 1,910	1,913	1,558	12%	420
Unknowns: ¹⁰					
X1	10,554 10,771	10,663	10,308	80%	9.1
X2	7,137 7,204	7,171	6,816	53%	38
X3	4,243 4,085	4,164	3,810	29%	117

Quality Control Parameters:¹¹

T⁷ = 37,318 cpm

%NSB⁸ = 0.95%

%MB⁹ = 35%

20% Intercept¹² = 209 μ U/mL

50% Intercept = 43 μ U/mL

80% Intercept = 8.9 μ U/mL

Example Run (Alternate Procedure)

Tube ¹	Duplicate CPM ²	Average CPM ³	Net CPM ⁴	Percent Bound ⁵	Approx. Insulin μ U/mL ⁶
T ⁷	46,119 46,295	46,207			
(NSB) ⁸	476 449	463			
A (MB) ⁹	9,400 9,569	9,485	9,022	100%	0
C	7,492 7,557	7,525	7,062	78%	24
D	5,695 5,741	5,718	5,256	58%	64
E	4,221 4,164	4,193	3,730	41%	122
F	2,926 2,988	2,957	2,495	28%	225
G	2,183 2,123	2,153	1,691	19%	420

Unknowns:¹⁰

X1	7,069 6,975	7,022	6,560	73%	32
X2	4,505 4,753	4,629	4,167	46%	103

Quality Control Parameters:¹¹

T⁷ = 46,207 cpm

%NSB⁸ = 1.0%

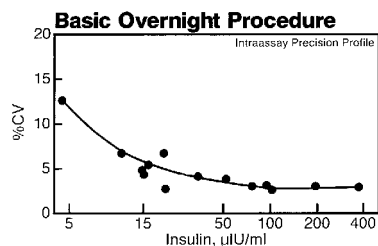
%MB⁹ = 20%

20% Intercept¹² = 359 μ U/mL

50% Intercept = 88 μ U/mL

80% Intercept = 21 μ U/mL

Precision Profile



Intraassay Precision (μ U/mL) (Alternate procedure)

	Mean ¹	SD ²	CV ³
1	17	1.6	9.3%
2	39	2.0	5.1%
3	80	2.8	3.5%
4	117	3.6	3.1%
5	278	14	5%

Interassay Precision (μ U/mL) (Basic Procedure)

	Mean ¹	SD ²	CV ³
1	16	1.6	10.0%
2	35	2.5	7.1%
3	76	5.5	7.2%
4	95	4.7	4.9%

End-of-Run Effect (μ U/mL)

	Tubes ¹ 31-44	Tubes 85-98	Tubes 139-152	Tubes 193-206	Tubes 247-260
1	8.6	7.6	8.3	7.7	9.3
2	12	10	11	9	11
3	13	14	14	15	16
4	30	32	33	29	30
5	40	41	37	39	41
6	110	116	122	116	112
7	116	117	116	123	124

Linearity (μIU/mL)

	Dilution ¹	Observed ²	Expected ³	%O/E ⁴
1	32 in 32 ⁵	126	—	—
	16 in 32	65	63	103%
	8 in 32	31	31	100%
	4 in 32	14	16	88%
	2 in 32	7.4	7.8	95%
	1 in 32	3.9	3.9	100%
2	32 in 32	148	—	—
	8 in 16	79	74	107%
	4 in 16	43	37	116%
	2 in 16	18	19	95%
	1 in 16	8.6	9.2	93%
3	32 in 32	169	—	—
	8 in 16	86	85	101%
	4 in 16	45	42	107%
	2 in 16	22	21	105%
	1 in 16	9.4	10.5	90%

Specificity

Compound ¹	Amount Added ² ng/mL	% Cross-reactivity ³
Pro-insulin	5	32%
C-Peptide	1,000	ND
Glucagon	1,000	ND

ND: not detectable⁴**Recovery (μIU/mL)**

	Solution ¹	Observed ²	Expected ³	% O/E ⁴
1	—	0	—	—
	A	16	16	100%
	B	74	71	104%
	C	166	177	94%
2	—	3.7	—	—
	A	19	20	95%
	B	74	75	99%
	C	189	180	105%
3	—	9.2	—	—
	A	27	25	108%
	B	81	80	101%
	C	177	185	96%
4	—	29	—	—
	A	45	44	102%
	B	97	98	99%
	C	196	204	96%

Bilirubin (μIU/mL)

	Unspiked ²	Bilirubin ¹	
		100 mg/L	200 mg/L
1	12	18	19
2	20	29	29
3	65	76	71
4	124	146	142
5	297	338	310

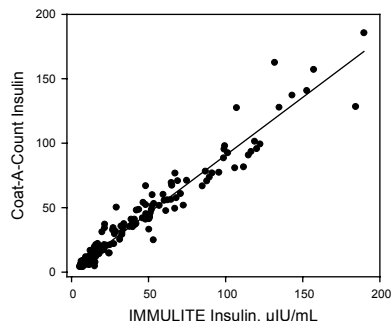
Hemolysis (μIU/mL)

	Unspiked ²	Packed Red Blood Cells ¹			
		5 μL/mL	10 μL/mL	15 μL/mL	30 μL/mL
1	12	13	10	11	18
2	20	22	19	19	19
3	65	59	49	46	42
4	124	75	58	51	40
5	297	182	124	101	63

Protein Effect (µIU/mL)

Factor ¹	Approx. g/dL ²	Observed ³	Expected ⁴	O/E ⁵
1 2.00×	14.0	257	240	107%
1.50×	10.5	184	180	102%
1.00×	7.0	120	—	(100%)
0.67×	4.7	79	80	99%
2 2.00×	14.0	308	276	112%
1.50×	10.5	199	207	96%
1.00×	7.0	138	—	(100%)
0.67×	4.7	82	92	89%

Method Comparison



$$(CAC) = 0.90 (IML) + 0.99 \mu\text{IU/mL}$$

$$r = 0.973$$

Deutsch. Example Run: ¹Röhrchen, ²Duplikat CPM, ³Mittelwert CPM, ⁴Netto CPM, ⁵Prozent Bindung, ⁶Ca. Insulin, µIU/ml, ⁷Qualitätskontrollparameter, ⁸Total, ⁹%NSB, ¹⁰%MB, ¹¹20% Intercept. **Intraassay Precision:** ¹Mittelwert, ²SD (Standardabweichung), ³CV (Variationskoeffizient). **Interassay Precision:** ¹Mittelwert, ²SD (Standardabweichung), ³CV (Variationskoeffizient). **Linearity:** ¹Verdünnung, ²Beobachtet (B), ³Erwartet (E), ⁴% B/E, ⁵32 in 32. **Recovery:** ¹Lösung, ²Beobachtet (B), ³Erwartet (E), ⁴% B/E. **Specificity:** ¹Verbindung, ²zugesetzte Menge, ³% Kreuzreaktivität, ⁴NN: Nicht nachweisbar. **End-of-Run Effect:** ¹Röhrchen. **Effect of Bilirubin:** ¹Bilirubin, ²Ohne Zugabe von. **Effect of Hemolysis:** ¹Erythrozytenkonzentrat, ²Ohne Zugabe von. **Protein Effect:** ¹Faktor, ²Gemessene Konzentration, ³Beobachtet (B), ⁴Erwartet (E), ⁵% B/E.

Español. Example Run: ¹Tubo, ²Duplicado CPM, ³Media CPM, ⁴CPM Netas, ⁵Porcentaje de unión, ⁶Insulin, aprox., µIU/ml, ⁷Parámetros del control de calidad, ⁸Total, ⁹%NSB, ¹⁰%MB, ¹¹Corte al 20%. **Intraassay Precision:** ¹Media, ²DS, ³CV. **Interassay Precision:** ¹Media, ²DS,

³CV. **Linearity:** ¹Dilución, ²Observado (O), ³Esperado (E), ⁴%O/E, ⁵32 en 32. **Recovery:** ¹Solución, ²Observado (O), ³Esperado (E), ⁴%O/E. **Specificity:** ¹Compuesto, ²Cantidad añadida, ³% Reacción cruzada, ⁴ND: no detectable. **End-of-Run Effect:** ¹Tubos. **Effect of Bilirubin:** ¹Bilirubina, ²Sin añadir. **Effect of Hemolysis:** ¹Packed Red Blood Cells, ²Sin añadir. **Protein Effect:** ¹Factor, ²Concentración aparente, ³Observado (O), ⁴Esperado (E), ⁵%O/E.

Français. Example Run: ¹Tube, ²Duplicate CPM, ³CPM moyen, CPM corrigé, ⁵Pourcentage lié, ⁶Approx. Insuline, µIU/ml, ⁷Paramètres Contrôle de Qualité, ⁸Total, ⁹%NSB, ¹⁰%MB, ¹¹20% Intercept. **Intraassay Precision:** ¹Moyenne, ²SD, ³CV. **Interassay Precision:** ¹Moyenne, ²SD, ³CV. **Linearity:** ¹Dilution, ²Observé (O), ³Attendu (A), ⁴%O/A, ⁵32 dans 32. **Recovery:** ¹Solution, ²Observé (O), ³Attendu (A), ⁴%O/A. **Specificity:** ¹Composé, ²ajouté, ³Réaction croisée%, ⁴ND: non détectable. **End-of-Run Effect:** ¹Tubes. **Effect of Bilirubin:** ¹Bilirubine, ²Non chargés. **Effect of Hemolysis:** ¹Culot Erythrocytaire, ²Non chargés. **Protein Effect:** ¹Facteur, ²Concentration apparente, ³Observé (O), ⁴Attendu (A), ⁵%O/A.

Italiano. Example Run: ¹Provetta, ²CPM in duplicato, ³CPM Medio, ⁴CPM Netti, ⁵Percentuale di Legato, ⁶Appross. Insulina, µIU/mL, ⁷Parametri per il Controllo di Qualità, ⁸Totale, ⁹%NSB, ¹⁰%MB, ¹¹Intercetta al 20%. **Intraassay Precision:** ¹Media, ²SD (Deviazione Standard), ³CV (Coefficiente di Variazione). **Interassay Precision:** ¹Media, ²SD (Deviazione Standard), ³CV (Coefficiente di Variazione). **Linearity:** ¹Diluizione, ²Osservato (O), ³Atteso (A), ⁴%O/A, ⁵32 in 32. **Recovery:** ¹Soluzione, ²Osservato (O), ³Atteso (A), ⁴%O/A. **Specificity:** ¹Composto, ²quantità aggiunta, ³Percentuale di Crossreattività, ⁴ND: non determinabile. **End-of-Run Effect:** ¹Provette. **Effect of Bilirubin:** ¹Bilirubina, ²Semplice. **Effect of Hemolysis:** ¹Cellule rosse impatte, ²Semplice. **Protein Effect:** ¹Fattore, ²Concentrazione apparente, ³Osservato (O), ⁴Atteso (A), ⁵%O/A.

Português. Example Run: ¹Tubo, ²Duplicado CPM, ³Média de CPM, ⁴Net CPM, ⁵Percentagem de Ligação, ⁶Aprox. Insulina, µIU/mL, ⁷Parâmetros do controle de qualidade, ⁸Total, ⁹%NSB, ¹⁰%MB, ¹¹20% Intercepção. **Intraassay Precision:** ¹Média, ²Desvio padrão, ³Coefficiente de variação. **Interassay Precision:** ¹Média, ²Desvio padrão, ³Coefficiente de variação. **Linearity:** ¹Diluição, ²Observado (O), ³Esperado (E), ⁴%O/E, ⁵32 em 32. **Recovery:** ¹Solução, ²Observado (O), ³Esperado (E), ⁴%O/E. **Specificity:** ¹Composto, ²Quantidade adicionada, ³Percentagem de reação cruzada, ⁴ND: não detectável. **End-of-Run Effect:** ¹Tubos. **Effect of Bilirubin:** ¹Bilirubina, ²Não adicionada. **Effect of Hemolysis:** ¹Hemáceas, ²Não adicionada. **Protein Effect:** ¹Factor,

Deutsch

Coat-A-Count Insulin

Anwendung: Festphasen Radioimmunoassay (beschichtete Röhrchen) zur quantitativen Bestimmung von Insulin im Serum. Der Test ist ausschließlich in der In-Vitro-Diagnostik als Hilfestellung bei der klinischen Diagnose einzusetzen.

Artikelnummern: **TKIN1** (100 Tests), **TKIN2** (200 Tests), **TKIN5** (500 Tests), **TKINX** (1000 Tests).



Die Packung mit 100 Röhrchen enthält weniger als 3 Microcurie (111 Kilobecquerel) an radioaktivem ¹²⁵I-markiertem Insulin; die Packung mit 200 Röhrchen enthält weniger als 6 Microcurie (222 Kilobecquerel); die Packung mit 500 Röhrchen enthält weniger als 15 Microcurie (555 Kilobecquerel) und die Packung mit 1000 Röhrchen enthält weniger als 30 Microcurie (1110 Kilobecquerel).

Klinische Relevanz

Humanes Insulin ist ein Polypeptidhormon, das in den Beta-Zellen des Pankreas gebildet wird und als Regulator für die Speicherung und Produktion von Kohlehydraten verantwortlich ist. Seine Sekretion wird normalerweise durch einen Anstieg der Menge in Zirkulation befindlicher Glukose stimuliert. Dies führt zu höheren Insulinspiegeln und zu schnellerer Gewebsaufnahme von Glukose, gefolgt von einem Absinken des Insulinspiegels wenn der Glukosespiegel wieder abnimmt.

Bei einer Reihe von Erkrankungen, insbesondere bei Insulinom und Diabetes ist diese Wechselbeziehung gestört. Bei Patienten mit Insulin-sezernierenden Pankreastumoren zirkuliert Insulin in unangemessen hohen Konzentrationen und kann somit Ursache von Hypoglykämien sein. Demzufolge spielen Insulin Immunoassays — manchmal in Verbindung mit Provokationstests mit

Tolbutamid oder Kalzium — eine wichtige Rolle bei der Identifizierung (und Lokalisierung) von Insulinomen. Das Vorliegen einer durch Fasten bedingten Hypoglykämie in Verbindung mit einem unangemessen hohen Serum-Insulin-Spiegel hat diagnostische Bedeutung.

Insulin-Werte fallen nicht unter die Subklassifizierung für Diabetes, wie sie von der „National Diabetes Data Group“ ausgearbeitet wurden. Dennoch sind Insulin-Werte, nach Durchführung eines Glukose-Toleranztests, von gewissem prognostischem Wert, um den Wert einer Insulintherapie oder der Wahrscheinlichkeit eines Progresses zur Insulin-abhängigkeit und den für Diabetes charakteristischen Komplikationen (wie z. B. einer Retinopathie) vorherzusagen.

Die Verwendung von Insulin-Immunoassays bei Patienten unter Insulintherapie ist problematisch durch die Tatsache, dass eine derartige Therapie zur Bildung von anti-Insulin-Antikörpern führt und diese möglicherweise solche Assays beeinträchtigen können. Aus diesem Grund haben einige Wissenschaftler nach Möglichkeiten gesucht Insulin in Urin oder in Serumproben nach Aufbereitung mittels Säulenchromatographie oder PEG-Präzipitation zu bestimmen. Die Bestimmung von „freiem“ Insulin als Methode zur Verlaufskontrolle einer Insulintherapie ist aber nur von begrenztem Interesse aufgrund des Fehlens von statistischen Angaben zu therapeutischen bzw. toxischen Bereichen. Eine Glukosekontrolle bei Diabetikern durch Normalisierung des Insulinprofils kann somit nicht generell bewerkstelligt werden. Darüber hinaus ist nicht bekannt, ab welchem Punkt abnormal hohe Insulinspiegel für den Patienten gefährlich werden können.

Methodik

Der Insulin Coat-A-Count RIA ist ein Festphasen Radioimmunoassay, bei dem ¹²⁵I-markiertes Insulin eine vorgegebene Zeit mit dem Insulin im Patientenserum um die Antikörperbindungsstellen auf der Innenwand von Polypropylen-Röhrchen konkurriert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wird der Überstand abgegossen oder abgesaugt und die an die Antikörper gebundene Fraktion in

einem Gamma-Counter gemessen. Die Counts sind zu der Konzentration umgekehrt proportional. Durch Vergleich mit unter gleichen Bedingungen behandelten Standards lässt sich die Konzentration des Insulin im Serum aus der Standardkurve ablesen.

Zu pipettierende Reagenzien: 1

Testdauer: über Nacht (18–24 Stunden) oder 3 Stunden (mit weglassen des Standard B).

Totalaktivität zum Zeitpunkt der Markierung: ca. 40 000 cpm

Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Zur *In-vitro*-Diagnostik.

Reagenzien: Die Packung mit den Reagenzien sollte bei 2–8°C in einem Kühlschrank gelagert werden, der für radioaktives Material ausgewiesen ist. Die Entsorgung muss nach den jeweils gültigen Gesetzen erfolgen.

Die Reagenzien dürfen nur bis zum Verfallsdatum verwendet werden.

Einige Komponenten des Kits können Material humanen Ursprungs und/oder in anderer Weise gefährliche Inhaltsstoffe enthalten, die es unbedingt notwendig machen die folgenden Vorsichtsmaßnahmen einzuhalten.

Die generell geltenden Vorsichtsmaßnahmen sind einzuhalten und alle Komponenten als potenziell infektiös zu behandeln. Alle aus menschlichem Blut gewonnenen Materialien wurden auf Syphilis, Antikörper gegen HIV-1 und HIV-2, Hepatitis-B-Oberflächenantigen und Hepatitis-C-Antikörper untersucht und negativ befundet.

Bestimmten Komponenten wurde Natriumazid (<0,1 g/dl) hinzugefügt. Um die Bildung von explosiven Metallaziden in Blei- und Kupferrohren zu vermeiden, sollten die Reagenzien nur zusammen mit großen Wassermengen in die Kanalisation gespült werden.

Wasser: Destilliertes bzw. deionisiertes Wasser benutzen.

Radioaktivität

Der Umgang mit radioaktivem Material ist in Deutschland genehmigungspflichtig. Deshalb muss der DPC eine Kopie der aktuellen gültigen Umgangsgenehmigung des Kunden vorliegen, bevor radioaktive Reagenzien versendet werden dürfen. Die Strahlenschutzverordnung ist zu beachten.

Das radioaktive Material ist gemäß der jeweiligen Umgangsgenehmigung zu handhaben.

Die Strahlenexposition ist zu minimieren. Spritzer sind sofort aufzuwischen und die betroffene Oberfläche zu dekontaminieren. Aerosolbildung ist zu vermeiden. Flüssiger und fester radioaktiver Abfall sind unter Beachtung der gültigen Richtlinien zu entsorgen.

Bestandteile der Testpackung: Vorbereitung

Insulin Antikörper-beschichtete Röhrchen (TIN1)

Polypropylen Röhrchen beschichtet mit Antikörpern gegen Insulin, verpackt in wiederverschließbaren Plastikbeuteln. Kühl lagern, vor Feuchtigkeit schützen und nach dem Öffnen wieder sorgfältig verschließen. Lagerung bei 2–8°C bis zum Verfallsdatum. Farbe: Limettengrün.

TKIN1: 100 Röhrchen.

TKIN2: 200 Röhrchen.

TKIN5: 500 Röhrchen.

TKINX: 1000 Röhrchen.

¹²⁵I Insulin (TIN2)

Konzentrat jodiertes Insulin. Jedes Röhrchen mit **100 ml** destilliertem oder deionisiertem Wasser verdünnen und durch vorsichtiges Umdrehen mischen. Bei 2–8°C 30 Tage nach der Vorbereitung oder bis zum Verfallsdatum haltbar.

TKIN1: 1 Flasche. **TKIN2:** 2 Flaschen.

TKIN5: 5 Flaschen. **TKINX:** 10 Flaschen.

Insulin Standards (INC3–9)

7 Flaschen, A – G, lyophilisiert aufbereitet in nicht-humaner Serummatrix.

Mindestens 30 Minuten vor Testbeginn, den 0-Standard A mit **6,0 ml** destilliertem oder deionisiertem Wasser, und die restlichen Standards B – G mit je **3,0 ml** destilliertem oder deionisiertem Wasser auflösen. Volumetrische Pipetten verwenden. Durch vorsichtiges Umdrehen

mischen. Bei –20°C 30 Tage nach Auflösen haltbar. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen vermeiden. Bei Bedarf portionieren.

TKIN1: 1 Set. **TKIN2:** 1 Set.

TKIN5: 2 Sets. **TKINX:** 3 Sets.

Die aufgelösten Standards haben chargenspezifische Insulin Werte von ca. 0, 5, 15, 50, 100, 200 und 350 µIU/ml, (WHO 1st IRP 66/304) in aufbereiteter non-humaner Serummatrix. Weitere Standardkurvenpunkte können durch Mischen der Standards hergestellt werden.

Erforderliche Laborgeräte und Hilfsmittel

Gammacounter – kompatibel mit 12x75 mm Röhrchen

Wirbelmischer

Reagenzienvorbereitung

Destilliertes oder entionisiertes Wasser

Messzylinder: 100 ml

Volumetrische Pipetten: 3,0 ml und 6,0 ml

Radioimmunoassay

Unbeschichtete 12x75 mm Polypropylen-Röhrchen – für T und NSB Röhrchen, erhältlich bei DPC

Mikropipetten: 200 µl und 1 000 µl.

Dekantierständer – erhältlich bei DPC.

Logit-Log-Papier – erhältlich bei DPC (Artikelnummer: ZP797)

DPC Immunoassay-Kontrolle (> 25 Parameter, 3 Konzentrationen) (Artikelnummer: CON6).

Probengewinnung

Es ist keine besondere Vorbereitung notwendig. Blutentnahme durch Venenpunktion²⁰ in Röhrchen ohne Zusätze (ohne Antikoagulantien), Trennung des Serums von den Blutzellen, Abnahmezeitpunkt notieren.

Der Einsatz einer Ultrazentrifuge wird zur Klärung von lipämischen Proben empfohlen.

Hämolytische, ikterische oder stark kontaminierte Proben können zu fehlerhaften Ergebnissen führen.

Blutentnahmeröhrchen von verschiedenen Herstellern können differierende Werte

verursachen. Dies hängt von den verwendeten Materialien und Additiven (Gel oder physische Trennbarrieren, Gerinnungsaktivatoren und /oder Antikoagulantien) ab. Coat-A-Count Insulin sind nicht mit allen möglichen Röhrchenvariationen ausgetestet worden. Details der getesteten Röhrchenarten sind dem Kapitel "Alternative Probenarten" zu entnehmen.

Erforderliche Menge: 200 µl Serum pro Röhrchen.

Bei der Abnahme der Blutproben ist darauf zu achten, dass eine Hämolyse vermieden wird, da dies zu falsch erniedrigten Werten führen kann.^{22,23}

Lagerung: 7 Tage bei 2–8°C, oder 3 Monate bei –20°C.²¹

Die Proben vor Testbeginn auf Raumtemperatur (15–28°C) bringen und vorsichtig durchmischen. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen ist zu vermeiden. Bei Bedarf portionieren. Gefrorene Proben dürfen *nicht* durch Erhitzen im Wasserbad aufgetaut werden. Patientenproben, die durch radiologische Verabreichung von Radioaktivität kontaminiert sind, sind für die Verwendung im RIA nicht geeignet.

Testansatz und Durchführung

Alle Testkomponenten vor Testbeginn auf Raumtemperatur (15–28°C) bringen. Ein automatischer Pipettor-Dilutor wird für den Test nicht empfohlen.

- 1 Unbeschichtete Röhrchen:** Jeweils 2 unbeschichtete 12x75 mm Polypropylen-Röhrchen mit T (Totalaktivität) und NSB (unspezifische Bindung) beschriften.

Da die unspezifische Bindung im Coat-A-Count RIA normalerweise niedrig ist hat sie keinen signifikanten Einfluss auf die Messwerte. Es kann deshalb auch auf das Mitführen der NSB-Röhrchen verzichtet werden.

Beschichtete Röhrchen: Jeweils 2 Insulin-Antikörper-beschichtete Röhrchen mit A (maximale Bindung, 0-Standard) und von B bis G beschriften. Jeweils 2 weitere Antikörper-beschichtete Röhrchen für Kontrollen und Patientenproben beschriften.

Standard	ca. $\mu\text{IU/ml}$ 1st IRP [66/304]
A (MB)	0
B*	5
C	15
D	50
E	100
F	200
G	350

* Standard B bei Verwendung der 3-Stunden Inkubation bei Raumtemperatur (15–28°C) weglassen, verwendet bei Schritt 4.

- 2** Jeweils **200 μl** des 0-Standards A in die NSB und A Röhrchen und jeweils **200 μl** der restlichen Standards, Kontrollen und Patientenproben in die vorbereiteten Röhrchen pipettieren.

Direkt auf den Boden des Röhrchens pipettieren.

Patientenproben mit Konzentrationen oberhalb des Messbereichs müssen vor der Messung mit 0-Standard verdünnt werden.

Es ist gute Laborpraxis Pipetten mit Einmalspitzen zu verwenden und die Spitze von Probe zu Probe zu wechseln um Verschleppung zu vermeiden.

- 3** **1,0 ml** ¹²⁵I Insulin in jedes Röhrchen hinzufügen. Mischen.

Die Patientenproben sollten nicht für längere Zeit in den Röhrchen belassen werden. Arbeitsschritt 2 (Zugabe der Proben) und Arbeitsschritt 3 (Zugabe des Tracers) sollten ohne größere Verzögerung durchgeführt werden. Zwischen Zugabe der ersten Patientenprobe und nach Abschluss des Tracer-Pipettierschritts sollten nicht mehr als 40 Minuten liegen. Die T-Röhrchen bis zur Messung (siehe Schritt 6) beiseite stellen; sie bedürfen keiner weiteren Behandlung.

- 4** Für **18–24 Stunden** bei Raumtemperatur (15–28°C) inkubieren.

Alternativ, für 3 Stunden bei Raumtemperatur (15–28°C) inkubieren unter Weglassen des 5 $\mu\text{IU/ml}$ Standard (Standard B). Dieses Verfahren führt zu vergleichbaren Werten am gleichen

Tag. (siehe Kapitel "Performance Data").

- 5** Vollständig dekantieren.

Vollständiges Entfernen der Flüssigkeit verbessert die Präzision deutlich. Mit Hilfe eines Dekantierständers alle Röhrchen (außer die T-Röhrchen) dekantieren oder absaugen und 2–3 Minuten umgedreht stehen lassen. Anschließend werden die Röhrchen kräftig auf Fließpapier ausgeklopft, um alle restlichen Tröpfchen zu entfernen.

- 6** Alle Röhrchen **1 Minute** im Gamma-Counter messen.

Berechnung der Ergebnisse

Um die Konzentrationen aus der Logit-Log Darstellung der Standardkurve abzulesen werden zunächst die Mittelwerte der Röhrchenpaare, bereinigt um den Mittelwert der NSB Counts pro Minute (cpm) berechnet:

Netto Counts = (Mittelwert CPM) minus (Mittelwert **NSB** CPM)

Anschließend wird die Bindung jedes Röhrchenpaars als Prozent der Maximalbindung (MB, B0) bestimmt. Hierzu werden die mittleren CPM des A-Standards korrigiert um die mittlere NSB als 100% gesetzt:

Prozentbindung = (Netto Counts / Netto **MB** Counts) $\times$ 100

(Die Berechnung kann durch Weglassen der Korrektur um die NSB vereinfacht werden. Für Proben innerhalb des Standardbereichs werden nahezu identische Konzentrationen berechnet, wenn B/B0 direkt aus den CPM ermittelt wird.)

Die so ermittelten B/B0 aller Standards außer des 0-Standards werden auf der y-Achse auf Logit-Log Papier gegen die Konzentration auf der x-Achse (logarithmisch) aufgetragen. Die Punkte werden mit bestmöglicher Annäherung durch eine gerade Linie verbunden. Die Ergebnisse der unbekannten Proben können dann durch Interpolation an der Kurve abgelesen werden. (Die Standardkurve für die alternative 3-Stundeninkubation bei Raumtemperatur (15–28°C) sollte nur mittels der Standards C – G erstellt werden.)

Es ist gute Laborpraxis die Ergebnisse der Doppelbestimmung auf Übereinstimmung zu prüfen und eine Grafik der Standardkurve darzustellen (auch wenn die eigentliche Berechnung durch ein Computerprogramm erfolgt) um visuell zu überprüfen, ob für die Standardkurve die geeignete Transformation verwendet wurde und um eventuell abweichende Standardkurvenpunkte zu entdecken. Es wird weiterhin empfohlen, folgende Parameter der Berechnung zu protokollieren:

$T = \text{Totalaktivität (als Counts pro Minute)}$

$\%NSB = 100 \times (\text{Mittelwert NSB Counts} / \text{Total Counts})$

$\%MB = 100 \times (\text{Netto Counts} / \text{Total Counts})$

und die 20, 50 und 80 Prozent "intercepts," wobei

20% = Konzentration bei 20 Prozent Bindung, etc.

Bitte beachten Sie, dass auch andere Auswertungen z. B. nach der 4-Parameter-Logistik akzeptabel sind. Siehe: Dudley RA, et al. Guidelines for immunoassay data reduction. Clin Chem 1985;31:1264-71.

Auswertebeispiel (Basis Verfahren):

Dieses Beispiel dient nur zur Veranschaulichung und ist nicht dazu geeignet, Werte aus einem anderen Testansatz damit zu ermitteln. Die Werte wurden mittels der über-Nacht-Inkubation ermittelt. Aufgrund der *Chargenabhängigkeit* der Standardkonzentrationen müssen die in der rechten Spalte der Tabelle gelisteten Konzentrationen nicht mit den Konzentrationen der Standards des ausgelieferten Testkits übereinstimmen. (Siehe Tabelle "Example Run – Basic Procedure".)

Auswertebeispiel (Alternativ 3-Stunden Verfahren):

Dieses Beispiel dient nur zur Veranschaulichung und ist nicht dazu geeignet, Werte aus einem anderen Testansatz damit zu ermitteln. Die Werte wurden anhand der alternativen 3-Stundeninkubation bei Raumtemperatur ermittelt. Aufgrund der *Chargenabhängigkeit* der Standardkonzentrationen müssen die in der rechten Spalte der Tabelle gelisteten Konzentrationen nicht mit den Konzentrationen in Ihrer Lieferung übereinstimmen.

(Siehe Tabelle "Example Run – Alternate Procedure".)

Qualitätskontrolle

Es wird empfohlen Kontrollen mit mindestens 2 Konzentrationen (niedrig und hoch) an Insulin routinemäßig als unbekannte Proben einzusetzen.

Patientenergebnisse dürfen nur dann freigegeben werden, wenn die laborspezifischen Akzeptanzkriterien erfüllt sind. Hierzu sind die jeweils gültigen Richtlinien zu berücksichtigen.

Es ist gute Laborpraxis die Chargennummern, sowie das Datum der ersten Öffnung bzw. Rekonstitution der verwendeten Komponenten zu protokollieren. Die wiederholte Messung von Proben kann bei der Beurteilung der Interassay Präzision hilfreich sein. Der Einsatz von Kontrollprobenpaaren an unterschiedlichen Positionen des Testansatzes ist hilfreich, um einen eventuellen Drift zu erkennen.

Referenzwerte

In einer Studie mit 103 Serumproben von freiwillig fastenden Erwachsenen mit Glukosespiegeln (fastend) von weniger als oder bis zu 110 mg/dl, ergab der Coat-A-Count Insulin Assay einen Median von 8,3 µU/ml, mit 95% der Ergebnisse 22 µU/ml oder darunter.

Im Labor sollten diese Ergebnisse *lediglich als Richtwerte betrachtet werden*. Jedes Labor sollte seine eigenen Referenzbereiche etablieren.

Leistungsdaten

Im folgenden Abschnitt sind Daten gezeigt, die für die Leistung des Insulin RIA repräsentativ sind. Die Insulin Ergebnisse in den unteren Abschnitten sind in µU/ml angegeben. Wenn nicht anders angegeben, wurden alle Ergebnisse anhand der über-Nacht-, Inkubation bei Raumtemperatur ermittelt.

Messbereich: 5 – 350 µU/ml (WHO 1st IRP 66/304). Die Standards sind *chargenspezifisch*.

Analytische Sensitivität:

Basis Über-Nacht Verfahren: 1,2 µU/ml, Alternativ 3-Stunden Inkubation: 4,6 µU/ml

Präzisionsprofil: Das vorliegende Präzisionsprofil repräsentiert den Intraassay Variationskoeffizienten (basierend auf 20 Freiheitsgraden) für Proben die in Doppelbestimmung mittels der Basismethode ermittelt wurde. (Siehe Grafik "Precision Profile".)

Intraassay-Präzision: (Within-Run): Statistische Berechnung der Ergebnisse von 5 Proben, die in 20 Röhrchenpaaren in einem Ansatz gemessen wurden. Die Studie wurde mittels des Alternativverfahrens durchgeführt. (Siehe Tabelle „Intraassay-Precision“.)

Interassay-Präzision: (Lauf-zu-Lauf): Statistische Berechnung der Ergebnisse von 4 Proben, die in 20 Ansätzen gemessen wurden. Die Studie wurde anhand des Basisverfahrens durchgeführt. (Siehe Tabelle „Interassay-Precision“.)

Spezifität: Das in diesem Testbesteck verwendete Antiserum ist hochspezifisch für Insulin mit besonders niedrigen Kreuzreaktivitäten zu anderen natürlich vorkommenden Substanzen (andere als Insulin und Pro-Insulin). (siehe Tabelle „Spezifität“.)

"End of Run" Effekt: Tritt bis ca. 250 Röhrchen nicht auf. (siehe Tabelle "End-of-Run Effect").

Linearität: Proben wurden in verschiedenen Verdünnungen getestet. (Repräsentative Daten entnehmen Sie bitte der Tabelle „Linearität“.)

Wiederfindung: Proben wurden 1:19 mit 3 Insulin Lösungen (329; 1 420 und 3 535 µIU/ml) versetzt und gemessen. (Repräsentative Daten entnehmen Sie bitte der Tabelle „Recovery“.)

Bilirubin: Stark ikterische Proben (Bilirubin bis zu 200mg/l) können zu einer Erhöhung der Werte führen (Siehe Tabelle "Bilirubin".)

Hämolyse: Erythrozytenkonzentrate in Konzentrationen bis 30 µl/mL können zu falsch erniedrigten Werten führen.^{22,23} (Siehe Tabelle "Hemolysis".)

Lipämie: Um unterschiedliche Grade von Lipämie zu simulieren, wurden Patientenproben mit einer Fettemulsion, aus einer Mischung von Lipiden versetzt. Die Stammlösung hatte eine Triglyceridkonzentration von 20 000 mg/dl. Die Ergebnisse zeigen, dass Lipämie

keinen klinisch signifikanten Effekt auf den Assay hat.

Alternativer Probentyp: Um die Auswirkungen von verschiedenen Probenarten zu untersuchen, wurde Blut von 20 Freiwilligen in Röhrchen ohne Additiva, in Heparin-, EDTA- und Becton Dickinson SST[®] Vacutainer-Röhrchen gesammelt. Alle Proben wurden mit dem Coat-A-Count Insulin Assay mit den nachfolgend aufgeführten Ergebnissen bestimmt.

(Heparin) = 0,863 (Serum) + 1,05 µIU/ml
r = 0,972

(EDTA) = 0,774 (Serum) + 0,54 µIU/ml
r = 0,952

(SST) = 0,97 (einfachen Röhrchen) + 1,51 µIU/ml
r = 0,986

Mittelwerte:
21,3 µIU/ml (Serum)
19,4 µIU/ml (Heparin)
17,0 µIU/ml (EDTA)
22,2 µIU/ml (SST)

Protein Einfluss: Um unterschiedliche Proteinkonzentrationen zu simulieren, wurden 2,0 ml Portionen eines Humanserum-Pools gefriergetrocknet und anschließend in unterschiedlichen Volumina an Wasser aufgelöst. Jede aufgelöste Portion wurde im Insulin Coat-A-Count RIA gemessen. In den mit der Hälfte des Originalvolumens aufgelösten Proben liegt eine extrem hohe Proteinkonzentration von 14 g/dl vor. (Der jeweilige Faktor, um das Auflösevolumen zu korrigieren, ist in der Tabelle aufgelistet.) Die Ergebnisse zeigen, dass selbst große breite Schwankungen bei der Proteinkonzentration keinen Einfluss auf den Insulin Coat-A-Count RIA haben. (Siehe Tabelle "Protein Effect").

Methodenvergleich: Der Coat-A-Count Assay wurde mit dem DPC IMMULITE Insulin Assay anhand von 172 Patientenproben, mit Insulin Konzentrationen von ca. 5,3 – 200 µIU/ml verglichen. (Siehe Grafik.) Durch lineare Regression:

(CAC) = 0,90 (IML) + 0,99 µIU/ml
r = 0,973

Mittelwerte:
36 µIU/ml (Coat-A-Count)
39 µIU/ml (IMMULITE)

Anwendungsberatung

Bei Rückfragen wenden Sie sich bitte an Ihre DPC Niederlassung.

Das Qualitätssystem der Diagnostic Products Corporation ist nach ISO 13485:2003 registriert.

Español

Coat-A-Count Insulina

Utilidad del análisis: El ensayo de Insulina Coat-A-Count es un radioinmunoensayo ¹²⁵I diseñado para la medición cuantitativa de la insulina en suero. Está diseñado estrictamente para uso diagnóstico *in vitro* como auxiliar en el diagnóstico clínico.

Referencia: **TKIN1** (100 tubos), **TKIN2** (200 tubos), **TKIN5** (500 tubos), **TKINX** (1000 tubos).



El kit de 100 tubos contiene menos de 3 microcurios (111 kilobecquerelios) de insulina marcada ¹²⁵I, el de 200 tubos contiene menos de 6 microcurios (222 kilobecquerelios); el de 500 tubos contiene menos de 15 microcurios (555 kilobecquerelios); y el kit de 1000 tubos contiene menos de 30 microcurios (1110 kilobecquerelios).

Resumen y Explicación del Test

La insulina humana es una hormona polipeptídica que se origina en las células β del páncreas sirviendo como principal regulador del almacenamiento y producción de carbohidratos. Su secreción normalmente es estimulada por aumentos en la cantidad de glucosa en circulación. Esto lleva a niveles de insulina más altos y a una asimilación de la glucosa en los tejidos más rápida, seguida de una disminución del nivel de insulina al descender el nivel de glucosa.

En ciertos casos, particularmente en el insulinoma y la diabetes, esta relación se deteriora. La insulina tiende a circular a niveles inapropiadamente altos en pacientes con tumores pancreáticos que secretan insulina; dichos tumores pueden, por lo tanto, ser una causa de hipoglucemia. Consecuentemente, los

inmunoensayos de insulina – utilizados algunas veces conjuntamente con dosis provocativas de tolbutamida o calcio – juegan un papel esencial en la identificación (y localización) de insulinomas. La presencia de hipoglucemia en ayuno, en asociación con una concentración de insulina en suero *inapropiadamente alta* se considera como diagnóstico.

Los niveles de insulina no aparecen en la subclasificación de la diabetes elaborada por el National Diabetes Data Group. Sin embargo, cuando se miden durante el curso de una prueba de tolerancia a la glucosa, parecen ser de valor pronóstico en la predicción de los beneficios de la terapia con insulina y de la posibilidad del progreso hacia la dependencia de insulina y tendencia a complicaciones (tales como retinopatía) características de la diabetes.

La utilización de este radioinmunoensayo con muestras de pacientes que ya están bajo terapia con insulina, se complica por el hecho de que dicha terapia típicamente conduce a la formación de anticuerpos anti-insulina capaces de interferir con el ensayo. Algunos investigadores han, por lo tanto, tratado de medir la insulina en la orina, o en muestras de suero mediante cromatografía en columna ó precipitación con PEG. Pero la medición de la insulina “libre” continua siendo de interés limitado como técnica para monitorizar la terapia con insulina en ausencia de una estadística que establezca rangos terapéuticos ó tóxicos. Hasta ahora parece que el control de la glucosa en la diabetes no puede, en general, lograrse normalizando el perfil de insulina. Ni tampoco se conoce a qué nivel se vuelven peligrosos los niveles de insulina anormalmente altos.

Principio del análisis

El procedimiento Insulina Coat-A-Count es un radioinmunoensayo de fase sólida, donde insulina marcada con ¹²⁵I compete durante un tiempo fijo con la insulina de la muestra del paciente por sitios de unión al anticuerpo específico para la insulina. Debido a que el anticuerpo está inmovilizado en la pared de un tubo de polipropileno, la simple decantación de sobrenadante es suficiente para terminar la competencia y aislar la fracción de anticuerpo unido de la insulina marcada

con el isótopo. La lectura del tubo en un contador gama, proporciona entonces, un número que se convierte por medio de una curva de calibración en una medida de la insulina presente en la muestra del paciente.

Reactivos a pipetear: 1

Tiempo total de incubación: Toda la noche (18–24 horas) o 3 horas (omitendo el Calibrador B).

Cuentas totales de la iodación: aproximadamente 40 000 cpm

Advertencias y precauciones

Para uso diagnóstico *in vitro*.

Reactivos: Almacenar de 2–8°C en una cámara preparada para almacenar material radioactivo. Desechar de acuerdo a la legislación en vigor.

No usar los reactivos después de su fecha de caducidad.

Algunos componentes suministrados en el kit pueden contener material de origen humano y/o otros componentes potencialmente peligrosos que necesiten ciertas precauciones.

Siga las precauciones universales y manipule todos los componentes como si fueran capaces de transmitir agentes infecciosos. Los materiales derivados de sangre humana han sido analizados y son negativos para sífilis; para anticuerpos frente al HIV 1 y 2; para el antígeno de superficie de hepatitis B y para los anticuerpos de hepatitis C.

Se ha usado Azida sódica, en concentraciones menores de 0,1 g/dl, como conservante. Para su eliminación, lavar con grandes cantidades de agua para evitar la constitución de residuos de azidas metálicas, potencialmente explosivos, en las cañerías de cobre y plomo.

Agua: Usar agua destilada o desionizada.

Radioactividad

Una copia de cualquier certificado de licencia de radioisótopos (específico o general) emitido a la aduana de los EEUU se registrará en los ficheros de Diagnostic Products Corporation antes de que se puedan enviar kits o componentes conteniendo material radioactivo. Estos materiales radioactivos pueden adquirirse

por cualquier cliente con la licencia específica apropiada. Con una licencia general, estos materiales radioactivos pueden adquirirse solo por médicos, veterinarios en la práctica de la medicina veterinaria, laboratorios clínicos y hospitales — y estrictamente para la clínica *in vitro* o test de laboratorio que no conlleven la administración interna o externa de material radioactivo o su radiación a humanos u otros animales. Su adquisición, recepción, almacenaje, uso, transferencia y desecho están regulados y se expenderá una licencia (general o específica) de la Comisión Nuclear de EEUU o de un Estado con el NRC para su consiguiente control.

Manejar los materiales radioactivos de acuerdo a los requerimientos de su licencia general o específica. Para minimizar la exposición a la radiación, el usuario debe adherirse al cuarto conjunto de guías publicadas por el National Bureau of Standards con el nombre *Safe Handling of Radioactive Materials* (Handbook No. 92, issued March 9, 1964) y en las consiguientes publicaciones de las autoridades Federales o Estatales.

Limpiar y descontaminar rápidamente las superficies afectadas. Evitar la generación de aerosoles. Eliminar los residuos sólidos radioactivos de acuerdo con los requerimientos de su licencia. Licencias generales (NRC Form 483) pueden eliminar sus residuos sólidos radioactivos como residuos no radioactivos, después de retirar las etiquetas. Licencias específicas (NRC Form 313) se deben referir al Título 10, Código de Regulaciones Federales, Parte 20. Las licencias en Estados Asociados deben referirse a las normativas de su correspondiente Estado. Licencias generales pueden eliminar sus residuos líquidos radioactivos contenidos en este tipo de productos como cualquier otro material líquido, quitando las etiquetas de los contenedores y procesándolos como residuos sólidos. Licencias específicas pueden eliminar pequeñas cantidades de residuos líquidos radioactivos contenidos en este tipo de productos como cualquier otro material líquido. Refiérase a la normativa aplicable a su laboratorio.

Materiales Suministrados: Preparación Inicial

Tubos Recubiertos de con Anticuerpos anti-Insulina (TIN1)

Tubos de polipropileno recubiertos con anticuerpos anti-insulina y empaquetados en bolsas con cierre. Almacenar refrigerados y protegidos de la humedad, cerrando las bolsas cuidadosamente después de abrirlas: estable a 2–8°C hasta la fecha de caducidad señalada en la bolsa. Color: verde limón.

TKIN1: 100 tubos. **TKIN2:** 200 tubos.
TKIN5: 500 tubos. **TKINX:** 1000 tubos.

¹²⁵I Insulina (TIN2)

Un vial de un *concentrado* de insulina iodada. Agregar a cada vial **100 ml** de agua destilada y mezclar por *inversión suave*. Almacenar refrigerado: estable a 2–8°C durante 30 días después de preparación ó hasta la fecha de caducidad señalada en el vial.

TKIN1: 1 vial. **TKIN2:** 2 viales.
TKIN5: 5 viales. **TKINX:** 10 viales.

Calibradores de Insulina (INC3–9)

Un juego de siete viales marcados de la A a G, de matriz de suero humano liofilizada. Reconstituir el calibrador cero A con **6,0 ml** de agua destilada, y cada uno de los calibradores del B al G restantes con **3,0 ml** de agua destilada. *Reconstituir al menos 30 minutos antes de usar.*

Utilizar pipetas volumétricas y mezclar agitando *suavemente*. *Almacenar refrigerado:* estable a –20°C durante 30 días después de reconstituir. Realice alicuotas si es necesario, para evitar repetidas congelaciones y descongelaciones.

TKIN1: 1 juego. **TKIN2:** 1 juego.
TKIN5: 2 juegos. **TKINX:** 3 juegos.

Los calibradores reconstituidos contienen aproximadamente, respectivamente 0, 5, 15, 50, 100, 200 y 350 micro-Unidades Internacionales de insulina por mililitro (µIU/ml, WHO1st IRP 66/304) en matriz de suero humano. Los puntos intermedios de calibración se pueden obtener mezclando los calibradores en proporciones apropiadas.

Materiales Requeridos pero no suministrados

Contador gama – compatible con tubos estándar de 12 x 75 mm

Vórtex

Preparación del Reactivo

Agua destilada o desionizada

Cilindro graduado: 100 ml

Pipetas volumétricas: 3,0 ml y 6,0 ml

Radioinmunoensayo

Tubos de ensayo de polipropileno de 12 x 75 mm – para usar como tubos de Contaje Totale y NSB, disponibles en DPC.

Micropipetas con puntas desechables: 200 µl y 1 000 µl.

Gradilla de decantación – disponible en DPC

Control del inmunoensayo con tres niveles en matriz de suero humano conteniendo insulina como uno de los más de 25 constituyentes sujetos a ensayo, que pueden obtenerse en DPC (Referencia: CON6).

Recogida de la muestra

No se necesitan preparativos especiales. Extraer sangre mediante venopunción²⁰ en tubos sin anticoagulante, anotando la hora de la extracción y separar el suero de las células.

Se recomienda el uso de una ultracentrífuga para aclarar las muestras lipémicas.

Las muestras hemolizadas, ictericas o ampliamente contaminadas pueden dar resultados erróneos.

Los tubos para recoger sangre de distintos fabricantes pueden producir valores diferentes, dependiendo del material del tubo y de los aditivos, incluyendo barreras de gel o barreras físicas, activadores de la coagulación y/o anticoagulantes. El Insulina Coat-A-Count no ha sido analizado con todos los distintos tipos de tubos. Para obtener detalles sobre los tipos tubos que se han analizado, consulte la sección de Tipos de Muestras Alternativos.

Volumen requerido: 200 µl de suero por tubo.

Es importante evitar la hemólisis al recoger las muestras para realizar determinaciones de insulina, ya que interfiere generando resultados falsamente bajos.^{22,23}

Almacenamiento: a 2–8°C durante 7 días, o hasta 3 meses congeladas a –20°C.²¹

Antes del ensayo, permita que las muestras alcancen temperatura ambiente (15–28°C) y mezcle agitando *suavemente* o por inversión. Si es necesario, realice alicuotas para evitar sucesivas congelaciones y descongelaciones. No intente descongelar las muestras congeladas calentándolas al baño María. No se deben usar muestras contaminadas por la administración de radioactividad al paciente.

Procedimiento del Radioinmunoanálisis

Todos los componentes deben llevarse a temperatura ambiente (15–28°C) antes de su uso. Para este ensayo *no* se recomienda dispensador automático.

- 1 Tubos de ensayo:** marque cuatro tubos de ensayo (no recubiertos) de polipropileno de 12 x 75 mm como tubos T (contajes totales) y NSB (unión no específica) por duplicado. Al ser característicamente baja la unión no específica en el ensayo Coat-A-Count, los tubos NSB pueden ser omitidos sin comprometer la precisión y control de calidad del ensayo.

Tubos Recubiertos: Marque con A catorce Tubos Recubiertos con Anticuerpos anti-Insulina (unión máxima) y de B a G, por duplicado. Marque tubos recubiertos adicionales, también por duplicado, para controles y muestras de pacientes.

Calibrador	Aproximadamente µIU/ml 1st IRP [66/304]
A (MB)	0
B*	5
C	15
D	50
E	100
F	200
G	350

Omita el calibrador B si la incubación alternativa de tres horas a 37°C se va a realizar en el paso 4.

- 2** Pipetear **200 µl** del calibrador cero A en los tubos NSB y A, y **200 µl** de los restantes calibradores, control y muestras de pacientes en los tubos preparados. **Pipetear directamente en el fondo.**

Diluir las muestras de pacientes que se espera que contengan concentraciones de insulina mayores al calibrador mas alto (400 µIU/ml), con en el calibrador cero.

Se aconseja utilizar una micropipetas de punta desechable, cambiando la punta entre muestras y muestra, para evitar contaminación por arrastre.

- 3** Agregar **1,0 ml** de ¹²⁵I Insulina a cada tubo. Agitar en vórtex. No deberán dejarse muestras en los tubos durante largos periodos de tiempo. Después del paso 2 (adición de la muestra), el paso 3 (adición del trazador) deberá completarse lo mas pronto posible, sin que pasen mas de 40 minutos entre la adición de la primera muestra y la terminación de la adición del trazador. Separe los tubos T para su lectura (en el paso 6); no requieren de mas procesamiento.
- 4** Incubar de **18–24 horas** a temperatura ambiente (15–28°C). Como alternativa se puede incubar durante 3 horas a temperatura ambiente (15–28°C), y omitiendo los 5 µIU/ml de calibrador (Calibrador B). Este enfoque permite resultados en el mismo día en detrimento de la sensibilidad en el punto bajo y de la precisión. (Ver la sección de Características analíticas)
- 5** Decantar completamente.

Al retirar toda la humedad visible se intensificará enormemente la precisión. Utilizando una gradilla de decantación, elimine el contenido de todos los tubos (excepto los tubos T) y déjelos escurrir durante 2 o 3 minutos. Después golpee los tubos con energía sobre papel absorbente para sacudir todas las gotas residuales.

- 6** Leer durante **1 minuto** en el contador gama.

Cálculo de resultados

Para calcular las concentraciones de insulina en una representación logarítmica de la curva de calibración, primero calcule para cada par de tubos la media de las cuentas de los tubos NSB corregidas por minuto:

Cuentas netas = (Media CPM) menos (Media **NSB** CPM)

Entonces, determinar la unión de cada pareja de tubos como un porcentaje de la unión máxima (MB), tomando las cuentas corregidas con el NSB de los tubos A como 100%:

Porcentaje de Unión = (Cuentas netas / Cuentas **MB** netas) × 100

(El cálculo puede simplificarse omitiendo la corrección de las uniones no específicas; las muestras dentro del rango de calibración van a dar virtualmente el mismo resultado cuando el porcentaje de unión es calculado directamente a partir de la media de las CPM).

Usando papel gráfico logit-log, representar el porcentaje de unión en el eje vertical frente a la concentración en el eje horizontal (logarítmico) para cada calibrador no cero y dibujar la línea que pase por esos puntos aproximadamente. Los resultados de las muestras pueden ser leídos en la curva por interpolación. (La curva de calibración para el procedimiento alternativo de 3 horas a 37°C deberá basarse en los calibradores del C al G únicamente).

Es una buena práctica inspeccionar los resultados para comprobar la concordancia entre los replicados, y realizar una gráfica de la curva de calibración (aunque los cálculos se realicen por ordenador) para ver la

transformación más apropiada a usar y las posibles desviaciones en los puntos de calibración. También, recomendamos mantener un registro de los siguientes parámetros de la reducción de datos:

T = Cuentas totales (como cuentas por minuto)

%NSB = $100 \times (\text{Media cuentas NSB} / \text{cuentas totales})$

%MB = $100 \times (\text{Cuentas netas} / \text{Cuentas totales})$

Y los cortes 20, 50 y 80 por ciento, donde

20% = Concentración al 20 por ciento de unión, etc.

Otras aproximaciones, por ejemplo, logística 4-parámetros, también son aceptables. Ver Dudley RA, et al. "Guidelines for immunoassay data reduction". Clin Chem 1985;31:1264-71.

Ejemplo (Procedimiento Básico): Los valores tabulados a continuación se obtuvieron con el procedimiento de toda la noche. Son sólo una ilustración y no deberán utilizarse para calcular resultados de otro ensayo. Al ser los valores de los calibradores *lote-específicos*, las concentraciones expresadas en la columna derecha no pueden coincidir con los valores de los calibradores suministrados en su envío. (Ver la tabla "Ejemplo del Ensayo – Procedimiento Básico").

Ejemplo (Procedimiento Alternativo de 3 horas): Los números tabulados abajo se obtuvieron con el procedimiento de 3 horas a temp. Son sólo una ilustración y no deberán utilizarse para calcular resultados de otro ensayo. Al ser los valores de los calibradores *lote-específicos*, las concentraciones expresadas en la columna derecha no pueden coincidir con los valores de los calibradores suministrados en su envío. (Ver tabla "Ejemplo del Ensayo – Procedimiento Alternativo").

Control de Calidad

Los controles o pools de suero con al menos dos niveles de concentración de insulina (bajo y alto) deberán ensayarse rutinariamente como incógnitos.

Informar de los resultados de los pacientes sólo si los resultados de los controles para este ensayo están dentro de los criterios de aceptabilidad establecidos por su laboratorio.

Es recomendable registrar para cada ensayo los números de lote de los componentes usados, así como las fechas en las que fueron abiertos por primera vez y reconstituidos. También recomendamos el uso de gráficos diarios de los controles — como se describe, por ejemplo, en Westgard JO, et al. A multi-rule chart for quality control. Clin Chem 1981;27:493-501. Las muestras repetidas pueden servir como una herramienta de valor adicional para monitorizar la precisión interensayo, y que las parejas de los tubos del control pueden espaciarse a lo largo de la tanda de ensayo para verificar la ausencia de deriva significativa.

Valores esperados

En un estudio de 103 sueros de voluntarios adultos con niveles de glucosa menores o iguales a 110 mg/dl, el ensayo de Insulina Coat-A-Count proporcionó una mediana de 8.3 μ U/ml, con un 95 por ciento de resultados comenzando por 22 μ U/ml ó menos.

Los laboratorios deben considerar estos resultados *sólo como una guía*. Cada laboratorio deberá establecer sus propios intervalos de referencia.

Características analíticas

Las siguientes secciones contienen datos *representativos* del rendimiento del kit de Insulina Coat-A-Count. Los resultados de insulina en las secciones, a continuación se expresan en Unidades micro-Internacionales de insulina por mililitro. Excepto cuando así se señala, todos los resultados se obtuvieron utilizando una incubación a temperatura ambiente desde la noche anterior.

Intervalo de calibración: 5 – 350 μ U/ml (WHO 1st IRP 66/304). Los calibradores son *lote-específicos*.

Sensibilidad analítica:

Procedimiento Básico toda la noche:
1,2 μ U/ml,
Incubación Alternativa de 3 horas:
4,6 μ U/ml

Perfiles de precisión: Los perfiles de precisión, basados en aproximadamente 20 grados de intervalo de confianza y representando los CV del intraensayo que se esperaban para muestras ensayadas

por duplicado, usando el Procedimiento Básico. (Ver gráfica "Perfil de Precisión").

Precisión intraensayo (dentro de una tanda): Se calcularon las estadísticas para cada una de cinco muestras a partir de los resultados de 20 pares de tubos en una tanda, usando el Procedimiento Alternativo. (Ver la tabla "Intraassay Precision".)

Precisión Interensayo (de un run a otro): Se calcularon las estadísticas para cada una de cuatro muestras a partir de los resultados de pares de tubos en 20 diferentes ensayos, usando el Procedimiento Básico. (Ver la tabla "Precisión entre ensayos".)

Especificidad: El antisuero de Insulina Coat-A-Count es altamente específico para insulina, con una reactividad cruzada particularmente baja con otros compuestos (que no sean insulina y pro-insulina) que puedan estar presentes naturalmente en las muestras de los pacientes. (Ver la tabla "Especificidad".)

Efecto deriva: Ninguno hasta aproximadamente 250 tubos. (Ver tabla "End-of-Run Effect").

Linealidad: Las muestras fueron analizadas con varias diluciones. (Ver la tabla "Linealidad" para resultados representativos.)

Recuperación: Se ensayaron muestras, de la 1 a la 19, sobrecargadas con tres soluciones de insulina (329, 1 420 y 3 535 μ U/ml). (Ver la tabla "Recuperación").

Bilirrubina: Una ictericia severa (hasta 200 mg/l) puede ser causa de incremento en los valores. (Ver tabla "Bilirrubina").

Hemólisis: La presencia de glóbulos rojos en concentraciones de hasta 30 μ l/ml puede generar resultados falsamente bajos.^{22,23} (Ver tabla "Hemólisis".)

Lipemia: La lipemia no interfiere con el ensayo. Para simular varios grados de lipemia, las muestras de los pacientes fueron sobrecargadas con un emulsión de grasa que consistía en una mezcla de lípidos. La solución de partida contenía una concentración de triglicéridos de 20 000 mg/dl. Los resultados mostraron que la lipemia no tiene clínicamente ningún efecto significativo sobre el ensayo.

Tipo de Muestra Alternativa: para evaluar el efecto de los diferentes tipos de muestras alternativos, se recogió sangre de 20 voluntarios en tubos normales, tubos con Heparina, tubos con EDTA y tubos vacutainer SST® de Becton Dickinson. Todas las muestras fueron analizadas con el procedimiento Insulina Coat-A-Count, con los siguientes resultados.

(Heparina) = 0,863 (Suero) + 1,05 µIU/ml
r = 0,972

(EDTA) = 0,774 (Suero) + 0,54 µIU/ml
r = 0,952

(SST) = 0,97 (tubos simples) + 1,51 µIU/ml
r = 0,986

Medias:

21,3 µIU/ml (Suero)
19,4 µIU/ml (Heparina)
17,0 µIU/ml (EDTA)
22,2 µIU/ml (SST)

Efecto de Proteína: Para simular varias concentraciones de proteínas, se efectuaron experimentos en los que alícuotas de 2,0 ml de un pool de suero humano normal se congelaron en seco y luego fueron reconstituidas con varios volúmenes de agua. Cada alícuota reconstituida fue entonces analizada con el ensayo de Insulina Coat-A-Count. Observe que las alícuotas reconstituidas con la mitad del volumen original representan una concentración de proteína extremadamente alta, del orden de 14 g/dl. Los resultados indican que aún amplias variaciones de la concentración protéica no tienen ningún efecto significativo sobre el ensayo. (Ver la tabla "Efecto Protéico".)

Comparación de los métodos: 172 muestras de suero de pacientes fueron ensayadas con el procedimiento Insulina Coat-A-Count y con el kit de Insulina IMMULITE de DPC, con concentraciones de insulina que van de aproximadamente 5,3 to 200 µIU/ml. (Ver la gráfica). Por regresión lineal:

(CAC) = 0,90 (IML) + 0,99 µIU/ml
r = 0,973

Medias:

36 µIU/ml (Coat-A-Count)
39 µIU/ml (IMMULITE)

Asistencia técnica

Póngase en contacto con el distribuidor nacional.

El Sistema de Calidad de Diagnostic Products Corporation está registrado para la ISO 13485:2003.

Français

Coat-A-Count Insulin

Domaine d'utilisation: La technique Coat-A-Count Insulin est un dosage radioimmunologique pour la mesure quantitative de l'insuline dans le sérum. Réservé à un usage diagnostique *in vitro*, comme aide à un diagnostic clinique.

Référence catalogue :

TKIN1 (100 tubes), **TKIN2** (200 tubes),
TKIN5 (500 tubes), **TKINX** (1000 tubes).



Le coffret de 100-tubes contient moins de 3 micro-curies (111 kilobecquerels) d'insuline marquée à l'iode 125. Le coffret de 200-tubes contient moins de 6 micro-curies (222 kilobecquerels) d'insuline marquée à l'iode 125. Le coffret de 500-tubes contient moins de 15 micro-curies (555 kilobecquerels) d'insuline marquée à l'iode 125 et le coffret de 1000-tubes contient moins de 30 micro-curies (1110 kilobecquerels) d'insuline marquée à l'iode.

Introduction

L'insuline humaine est une hormone polypeptidique provenant des cellules bêta du pancréas et jouant un rôle principalement régulateur dans le stockage et la production des glucides. Sa sécrétion est normalement stimulée par l'augmentation importante du taux circulant du glucose. Ce taux tend à élever la sécrétion d'insuline, et accélère l'assimilation du glucose par les tissus, conduisant à une rapide baisse de l'insuline, tout comme le taux de glucose.

Dans un certain nombre de conditions, notamment le diabète insulino-dépendant, ce rétrocontrôle est inhibé. L'insuline circulante a tendance à augmenter de façon anormale chez des patients présentant une tumeur pancréatique sécrétant de l'insuline. De telles tumeurs peuvent être ainsi la cause d'une hypoglycémie. Par conséquent, des immunodosages d'insuline (associant

parfois un test de stimulation à la tolbutamide ou au calcium), jouent un rôle essentiel dans l'identification et la localisation des tumeurs insulino-sécrétantes. La découverte d'une hypoglycémie à jeun, associée à une concentration sérique d'insuline anormalement élevée, fait envisager ce diagnostic.

Les taux d'insuline ne permettent pas de différencier les différents types de diabètes habituellement définis.

Néanmoins, au cours d'un test de tolérance au glucose, les taux obtenus ont une valeur prédictive et pronostique sur le bénéfice d'un traitement par l'insuline substitutive et le risque d'une évolution vers un diabète insulino-dépendant avec ses complications (telles que les rétinopathies) caractéristiques du diabète.

L'application des dosages RIA d'insuline chez les patients déjà soumis à une insulinothérapie est rendue difficile par l'existence d'anticorps anti-insuline qui apparaissent au cours de ce type de traitement et qui peuvent interférer avec le dosage. Quelques études ont cherché à doser l'insuline dans des échantillons sériques ou urinaires après passage sur des colonnes de chromatographie ou des précipitations au PEG. Mais la mesure du taux d'insuline libre reste d'un intérêt limité au niveau du suivi d'une insulino-thérapie en raison de l'absence de l'établissement statistique des zones thérapeutiques et des doses toxiques. Jusqu'à présent, il semble que le contrôle du taux de glucose dans le diabète ne peut pas être réalisé pour normaliser le profil insulinaire. De même, il n'est pas connu à partir de quel niveau de concentration un taux d'insuline élevé peut être dangereux.

Principe du test

Le dosage Coat-A-Count Insulin est un dosage radioimmunologique en phase solide. Au cours de l'incubation, il y a compétition entre l'insuline marquée à l'iode 125 et l'insuline contenue dans l'échantillon plasmatique, vis-à-vis des sites de l'anticorps. L'anticorps étant fixé sur la paroi des tubes en polypropylène, après incubation, il suffit d'éliminer le surnageant par décantation pour isoler facilement la fraction radioactive liée à l'anticorps. Le tube est ensuite compté sur un compteur gamma. Les cpm étant

inversement proportionnels à la concentration d'insuline présente dans l'échantillon qui sera déterminée à l'aide d'une courbe standard.

Réactifs à distribuer: 1

Temps d'incubation totale : une nuit (18–24 heures) ou 3 heures (sans le standard B).

Activité totale en début de marquage : environ 40 000 cpm

Précautions d'emploi

Réservé à un usage diagnostique *in vitro*.

Réactifs : Conserver à +2/+8°C dans un réfrigérateur autorisé à recevoir du matériel radioactif. Éliminer les déchets conformément aux lois en vigueur.

Ne pas utiliser les réactifs au delà de leur date d'expiration.

Certains composants fournis avec ce coffret peuvent contenir des agents humains et/ou d'autres éléments potentiellement infectieux qui nécessitent certaines précautions.

Respecter les précautions d'emploi et manipuler tous les composants du coffret comme des produits potentiellement infectieux. Les réactifs dérivés de produits humains et utilisés dans ce coffret ont subi un test sérologique pour la Syphilis et des tests de dépistage pour les anticorps anti-VIH1 et 2, anti-VHC et pour l'antigène de surface de l'hépatite B, qui se sont tous avérés négatifs.

De l'azide de sodium à des concentrations inférieures à 0,1 g/dl a été ajouté comme conservateur ; lors de l'élimination, l'évacuer avec de grandes quantités d'eau pour éviter une accumulation d'azides métalliques explosifs dans les canalisations.

Eau : utiliser de l'eau distillée ou désionisée.

Radioactivité

Ce coffret de réactif est réservé à l'usage *in vitro* (Autorisation DGSNR).

Règles de base de protection contre les rayonnements ionisants et précautions d'emploi.

Ce produit radioactif ne peut être reçu, acheté, détenu ou utilisé que par des personnes autorisées à cette fin et dans

des laboratoires dotés de cette autorisation. Cette solution ne peut en aucun cas être administrée à l'homme ou aux animaux. Respecter impérativement les dates de péremption indiquées sur l'emballage extérieur et sur les étiquettes des différents réactifs du coffret. Tous les réactifs, dont les tubes revêtus d'anticorps, doivent être conservés à + 4/+ 8° C dans leur conditionnement d'origine avant d'être utilisés. L'achat, la possession, l'utilisation et l'échange de matières radioactives sont soumis aux réglementations en vigueur dans le pays de l'utilisateur. Les règles de base de protection contre les rayonnements ionisants doivent être respectées selon des procédures en vigueur. Ne pas pipeter des solutions radioactives avec la bouche. Eviter le contact direct avec la peau ou les muqueuses de tout produit radioactif en utilisant des blouses et gants de protection. Toute manipulation de matières radioactives se fera dans un local ad hoc éloigné de tout passage. Les produits radioactifs seront stockés dans leur conditionnement d'origine dans un local approprié. Un cahier de réception et de stockage de produits radioactifs sera tenu à jour. Le matériel de laboratoire et la verrerie qui ont été contaminés doivent être éliminés au fur et à mesure afin d'éviter une contamination croisée de plusieurs isotopes. Chaque contamination ou perte de substance radioactive devra être réglée selon les procédures établies. Toute mise aux déchets de matière radioactive se fera en accord avec les réglementations en vigueur. Ne pas manger, ni boire, ni fumer, ni appliquer des cosmétiques dans les laboratoires où des produits radioactifs sont utilisés. Les réactifs radioactifs ne peuvent être vendus qu'à des personnes habilitées à manipuler des substances radioactives.

Matériel Fourni : Préparation Initiale

Tubes revêtus d'anticorps anti-Insuline (TIN1)

Tubes en polypropylène revêtus d'anticorps anti- Insuline dans des sachets à glissière. Les conserver réfrigérés et protégés de l'humidité, bien refermer les sachets après utilisation. Stable à +2/+8°C jusqu'à la date d'expiration notée sur le sachet. Couleur: Vert pâle.

TKIN1: 100 tubes. **TKIN2:** 200 tubes.
TKIN5: 500 tubes. **TKINX:** 1000 tubes.

Insuline marquée à l'iode¹²⁵ (TIN2)

Flacon d'insuline marquée, concentrée ; ajouter **100 ml** d'eau distillée ou désionisée et agiter doucement par retournement. Conserver à +2/+8° C, stables au moins 30 jours après préparation ou jusqu'à la date de péremption indiquée sur le flacon.
TKIN1: 1 flacon. **TKIN2:** 2 flacons.
TKIN5: 5 flacons. **TKINX:** 10 flacons.

Standards Insuline (INC3-9)

7 standards étiquetés de A à G, sous forme lyophilisée en matrice sérique non humaine, avec conservateur. Au moins 30 minutes avant utilisation, reconstituer le standard zéro (A) avec **6,0 ml** d'eau distillée, et les autres standards (B à G) avec **3,0 ml**. Utiliser des pipettes volumétriques. Agiter doucement par retournement. Stable à +2/+8°C pendant 30 jours après reconstitution. Aliquoter, afin d'éviter de répéter les cycles congélation / décongélation.
TKIN1: 1 jeu. **TKIN2:** 1 jeu.
TKIN5: 2 jeux. **TKINX:** 3 jeux.

Ces standards ont des valeurs spécifiques à chaque lot d'environ 0, 5, 15, 50, 100, 200 et 350 micro- Unités Internationales d'insuline par millilitre (µUI/ml, OMS 1st IRP 66/304) dans du sérum non humain prétraité. Des points intermédiaires peuvent être obtenus en mélangeant des standards dans des proportions compatibles.

Matériel requis mais non fourni

Compteur Gamma – permettant l'utilisation de tubes standards 12x75 mm
Agitateur de type Vortex

Préparation des réactifs

Eprouvette graduée : 100 ml
Pipettes Volumétriques : 3,0 ml et 6,0 ml
Eau distillée ou désionisée

Dosage radioimmunologique

Tubes secs en polypropylène 12x75 mm – à utiliser comme les tubes LNS, disponibles chez DPC
Micropipettes: 200 µl et 1 000 µl.

Un portoir de décantation – disponible chez DPC.

Papier graphe Logit-log– disponibles chez DPC (Référence catalogue : ZP797)

Un contrôle immunodosage, à base de sérum humain, à trois niveaux de concentration, contenant de l'insuline (parmi plus de 25 constituants dosables), est disponible chez DPC (Référence catalogue : CON6).

Recueil des échantillons

Le patient n'a pas besoin d'être à jeun et aucune préparation spéciale n'est requise. Prélever le sang par ponction veineuse²⁰ sur tubes secs (sans anticoagulant) et séparer le sérum des cellules. Noter l'heure de prélèvement.

Il est recommandé de clarifier les échantillons hyperlipémiques par ultracentrifugation.

Des échantillons hémolysés, ictériques ou fortement contaminés peuvent donner des résultats erronés.

Des tubes pour prélèvements sanguins provenant de fabricants différents peuvent donner des résultats différents, selon les matériaux et additifs utilisés, y compris gels ou barrières physiques, activateurs de la coagulation et/ou anticoagulants. Le coffret Insuline Coat-A-Count n'a pas été testé sur tous les types de tubes possibles. Veuillez consulter le chapitre intitulé Autres Types d'Échantillons pour plus de renseignements sur les tubes qui ont été évalués.

Volume nécessaire : 200 µl de sérum par tube.

Eviter l'hémolyse des prélèvements pouvant provoquer des résultats abaissés.^{22,23}

Conservation: 7 jours à +2/+8° C ou 3 mois à -20°C.²¹

Avant le dosage, laisser les échantillons revenir à température ambiante (15–28°C), mélanger doucement par rotations ou retournements. Aliquoter, si nécessaire, afin d'éviter de répéter les cycles congélation / décongélation. Ne pas tenter de décongeler les spécimens congelés à l'aide d'un bain marie.

Les échantillons contaminés par l'administration in vivo d'éléments radioactifs sont impropres à ce dosage.

Protocole de dosage

Tous les composants doivent être à température ambiante avant leur utilisation (15–28°C). Un pipeteur-diluteur n'est pas recommandé dans ce protocole.

1 Tubes secs : Etiqueter deux séries de tubes (non revêtus) en polypropylène 12x75 mm tubes T (activité totale) et LNB (Liaison non spécifique) en duplicate.

La valeur du LNS dans la technique Coat-A-Count étant très faible, elle peut être négligée sans que la précision ou le contrôle de qualité ne soient modifiés.

Tubes revêtus d'anticorps: Etiqueter 14 tubes revêtus d'anticorps anti-Insuline A (liaison maximale B0) et de B à G, en duplicate. Etiqueter les tubes revêtus d'anticorps anti-Insuline supplémentaires, également en duplicate, pour les contrôles et les échantillons patients.

Standards	Approx. µUI/ml 1st IRP [66/304]
A (B0)	0
B*	5
C	15
D	50
E	100
F	200
G	350

Ne pas utiliser le standard B avec la méthode rapide 3-heure à température ambiante (15–28°C).

2 Pipeter 200 µl du standard zéro A dans les tubes de LNS et les tubes A, pipeter **200 µl** de chacun des autres standards, contrôles et échantillons de patients dans les tubes correspondants préparés. **Pipeter directement au fond du tube.**

Les échantillons de patients suspectés de contenir des concentrations d'insuline supérieures au standard le plus élevé (350 µUI/ml) doivent être dilués avec le standard zéro avant le dosage.

Il est bon d'utiliser des embouts de micropipettes jetables, de changer

d'embout entre les échantillons de manière à éviter toute contamination.

- 3 Ajouter **1,0 ml** d'Insuline marquée à l'iode 125 dans chaque tube. Vortexer.
Pas plus de 40 minutes ne doivent s'écouler entre l'addition de sérum dans le premier tube et la fin de distribution du traceur. Les tubes T peuvent être mis de côté jusqu'au comptage (étape 6); ils n'ont pas d'autre traitement.
- 4 Incuber pendant **18–24 heures** à température ambiante (15–28°C).
Une alternative plus rapide (3 heures à température ambiante (15–28°C), sans le standard 5 µUI/ml permet d'obtenir des résultats le même jour avec des résultats comparables (voir le paragraphe » Performance Data »).
- 5 Décanter complètement.
Éliminer toute trace d'humidité pour améliorer la précision du dosage. À l'aide d'un portoir de décantation, décanter ou aspirer le contenu de tous les tubes (excepté les tubes T) et laisser les tubes retournés pendant 2 ou 3 minutes. Puis appliquer les fortement sur du papier absorbant afin d'éliminer les gouttelettes résiduelles.
- 6 Compter **1 minute** dans un compteur gamma.

Calcul des Résultats

Afin d'obtenir des résultats en concentrations d'insuline à partir d'une représentation logit-log de la courbe de calibration, calculer pour chaque doublet de tubes les coups corrigés:

CPM corrigés = (Moyenne cpm) moins (Moyenne cpm **LNS**)

Puis déterminer pour chaque doublet la capacité de liaison en pourcentage de liaison maximale (LM), corrigée des cpm dus au LNS des tubes A tubes considérés à 100%:

% liaison = (cpm corrigés / cpm corrigés **LM**) × 100

Les échantillons dans la gamme de calibration donnent des résultats pratiquement identiques quand la capacité de liaison est calculée directement à partir

de la moyenne des CPM. : sans correction de LNS.

En utilisant un papier logit-log, on porte en ordonnée les pourcentages de liaison en fonction des concentrations des standards qui ne sont pas à zéro, en abscisse. On trace une ligne droite passant approximativement par ces points. Les concentrations des échantillons inconnus sont déterminées par interpolation sur la courbe standard.

Il est bon de vérifier les doublets et de construire une représentation graphique de la courbe standard (même si celle-ci est faite par ordinateur) avec les différentes valeurs de façon à visualiser le meilleur tracé, c'est également une façon de détecter les points déviants. Nous recommandons aussi de suivre les paramètres suivants :

T = Activité totale (cpm)

%LNS = $100 \times (\text{Moyenne des cpm du LNS} / \text{cpm Totaux})$

%LM = $100 \times (\text{cpm corrigés} / \text{cpm totaux})$

Et les intercepts à 20, 50 et 80 % avec

20% = Concentration à 20% de liaison, etc.

Note: d'autres approches sont possibles comme l'intégration de paramètres 4-p logistique. Se rapporter à Dudley RA, et al. Guidelines for immunoassay data reduction. Clin Chem 1985;31:1264-71.

Exemple de série (protocole de base) :

A titre d'exemple uniquement, et non pour calculer des résultats provenant d'une autre série. Les valeurs ont été obtenues avec l'incubation de nuit. Comme les valeurs des calibrateurs sont *lot-dépendantes*, les concentrations indiquées peuvent être différentes de celles de vos livraisons. (Voir le tableau "Example Run – Basic Procedure".)

Exemple de série : (Protocole rapide 3-heures):

A titre d'exemple uniquement, et non pour calculer des résultats provenant d'une autre série. Comme les valeurs des standards sont *lot-dépendantes*, les concentrations indiquées peuvent être différentes de celles de vos livraisons. (Voir le tableau "Example Run – Alternate Procedure".)

Contrôle de Qualité

Les contrôles (ou pools de sérums) avec au moins deux taux de concentration d'insuline – haut et bas – doivent être dosés en routine comme des échantillons inconnus.

Les résultats de patient ne doivent être validés que si les résultats des contrôles correspondent aux critères d'acceptation établis par votre laboratoire.

Il est bon d'enregistrer pour chaque dosage les numéros de lots des composants utilisés ainsi que la date à laquelle ils ont été reconstitués ou ouverts. Nous recommandons également de noter jour après jour les résultats des contrôles – comme décrit par exemple dans Westgard JO, et al. A multi-rule chart for quality control. Clin Chem 1981;27:493-501. Noter qu'un redosage d'échantillon peut être précieux pour suivre la précision inter essai, et que les doublets de tubes contrôle peuvent être espacés de façon à vérifier l'absence de dérive significative.

Valeurs de référence

Dans une étude sur 103 sérums provenant d'adultes à jeun, avec un taux de glucose à jeun inférieur ou égal à 110 mg/dl, la technique Coat-A-Count Insulin donnait une médiane de 8,3 µUI/ml, avec 95% des résultats inférieurs ou égaux à 22 µUI/ml.

Ces valeurs sont données à *titre indicatif uniquement*. Chaque laboratoire devra établir ses propres valeurs de référence.

Performances du test

Consulter les tableaux et graphiques pour obtenir les données représentatives des performances de ce test. Les résultats sont exprimés en µUI/ml. Tous les résultats ont été obtenus avec l'incubation de nuit.

Intervalle de linéarité : 5 – 350 µUI/ml (OMS 1st IRP 66/304). Les calibrateurs sont *lot-dépendants*.

Sensibilité analytique :

Protocole de base 1,2 µUI/ml,
Protocole rapide: 4,6 µUI/ml

Profil de précision : Un profil de précision illustre les CV intra-dosage que l'on peut attendre sur des échantillons analysés en double avec le protocole de

base. (Voir le graphique "Precision Profile".)

Précision intra-dosage (au sein d'une même série) : 5 échantillons ont été analysés en 20 tubes en duplicate dans une même série, avec le Protocole rapide. (Voir le tableau « Intraassay Precision ».)

Précision inter-dosage (entre plusieurs séries) : Les résultats ont été calculés pour chacun des 4 échantillons à partir des résultats de 20 séries en duplicate, avec le protocole de base. (Voir le tableau "Interassay Precision".)

Spécificité : L'antisérum utilisé dans la technique Coat-A-Count Insulin est très spécifique de l'insuline. Il présente de très faibles réactions croisées avec les composés (autre que l'insuline ou la pro-insuline) pouvant se trouver dans les échantillons des patients. (Voir le tableau « Specificity ».)

Effet de la position des tubes : Aucun jusqu'à 250 tubes. (Voir le tableau « End-of-Run Effect ».)

Test de dilution : Des échantillons ont été dosés à différentes concentrations. (Voir le tableau « Linearity » pour des données représentatives.)

Test de récupération : Des échantillons chargés dans un rapport de 1 à 19 avec 3 solutions d'insuline (329, 1 420 et 3 535 µUI/ml) ont été dosés avec le coffret Coat-A-Count Insulin. (Voir le tableau « Recovery » pour des données représentatives.)

Bilirubine : Un ictère grave (bilirubine jusqu'à 200 mg/l) peut amener une augmentation des résultats. (Voir le tableau "Bilirubin".)

Hémolyse : La présence de globules rouges en concentration jusqu'à 30 µl/mL peut provoquer des résultats faussement abaissés.^{22,23} (Voir le tableau "Hemolysis".)

Lipémie : Pour simuler des différents degrés de lipémie, des échantillons patients ont été surchargés avec une émulsion contenant divers lipides, la solution de base avait une concentration de triglycérides de 20 000 mg/dl. Les résultats montrent que la lipémie n'a pas d'effet clinique significatif avec ce dosage.

Autres types d'échantillons: pour estimer l'effet de l'utilisation de différents

type d'échantillons, 20 volontaires ont été prélevés sur tubes secs, héparinés, EDTA et sur tubes vacutainer SST® Becton Dickinson. Tous les échantillons ont été dosés avec le protocole Coat-A-Count Insulin et ont donné les résultats suivants.

(Hépariné) = 0,863 (Sérum) + 1,05 µUI/ml
r = 0,972

(EDTA) = 0,774 (Sérum) + 0,54 µUI/ml
r = 0,952

(SST) = 0,97 (tubes ordinaires) + 1,51 µUI/ml
r = 0,986

Moyennes :

21,3 µUI/ml (Sérum)
19,4 µUI/ml (Hépariné)
17,0 µUI/ml (EDTA)
22,2 µUI/ml (SST)

Effet des protéines: Pour simuler différentes concentrations en protéines, des expériences ont été effectuées en reconstituant des aliquotes de 2 ml de sérums humains lyophilisés avec différents volumes d'eau. Chaque aliquote reconstitué a été dosé à l'aide de la méthode Coat-A-Count Insulin La reconstitution des aliquotes, avec seulement la moitié du volume original, a conduit à une concentration protéique extrêmement haute, de l'ordre de 14 g/dl. Les résultats montrent, que même de grandes variations de la concentration en protéines n'ont pas d'effet sur le dosage. (Voir le tableau "Protein Effect" pour les données représentatives.)

Comparaison de méthodes: La technique Coat-A-Count Insulin a été comparée sur 172 échantillons sériques avec un autre dosage DPC IMMULITE Insulin (IML), pour des concentrations allant de 5.3 to 200 µUI/ml. (Voir graphique). Par régression linéaire :

(CAC) = 0,90 (IML) + 0,99 µUI/ml
r = 0,973

Moyennes :

36 µUI/ml (Coat-A-Count)
39 µUI/ml (IMMULITE)

Assistance technique

Contactez votre distributeur national. En France distribué par DPC France 90 bd National 92257 La Garenne-Colombes.

Le système d'assurance qualité de DPC est certifié ISO 13485 (2003).

Italiano

Coat-A-Count Insulina

Uso: Il dosaggio Coat-A-Count Insulina è un radioimmunosaggio in fase solida marcato con I¹²⁵ per la determinazione quantitativa dell'insulina nel siero. E' a solo uso diagnostico *in vitro* quale ausilio nella diagnosi clinica.

Codice: **TKIN1** (100 provette),

TKIN2 (200 provette),

TKIN5 (500 provette),

TKINX (1000 provette).



Il kit da 100 determinazioni contiene meno di 3 microcurie (111 kilobecquerel) di Insulina marcata con I¹²⁵, il kit da 200 determinazioni contiene meno di 6 microcurie (222 kilobecquerel); il kit da 500 determinazioni contiene meno di 15 microcurie (555 kilobecquerel); il kit da 1000 determinazioni contiene meno di 30 microcurie (1110 kilobecquerel).

Riassunto e Spiegazione del Test

L'insulina umana è un ormone polipeptidico che ha origine nelle cellule beta del pancreas e che serve come regolatore principale della conservazione e produzione dei carboidrati. La sua secrezione è normalmente stimolata dall'aumento nel quantitativo di glucosio in circolo. Ciò porta a livelli più elevati di insulina e ad un'assimilazione più rapida del glucosio da parte dei tessuti – seguito da un declino nel livello di insulina con il declinare dei livelli di glucosio.

In molte patologie, ed in modo particolare nell'insulinoma e nel diabete, questo rapporto è sbilanciato. L'insulina tende a circolare a livelli elevati in pazienti con tumori pancreatici che secernono insulina; tali tumori possono conseguentemente essere causa di ipoglicemia. In maniera analoga, gli immunodosaggi dell'insulina – utilizzati a volte unitamente a dosi provocative di tolbutamide o calcio – giocano un ruolo essenziale nell'identificazione e (localizzazione) degli insulinomi. Il ritrovamento di ipoglicemia a digiuno con una concentrazione di insulina

nel siero *inadeguatamente elevata* viene considerato diagnostico.

I livelli di insulina non figurano nella sottoclassificazione del diabete redatta dal National Diabetes Data Group. Ciò nonostante, quando si verificano nel corso di un test di tolleranza al glucosio, hanno un qualche valore prognostico nel predire i benefici di una terapia a base di insulina e la probabilità che avvenga una progressione verso una dipendenza dall'insulina e complicazioni (quali retinopatia) caratteristiche del diabete.

L'applicazione dei radioimmunosaggi sull'insulina in pazienti già sottoposti a terapia con insulina è complicata dal fatto che tale terapia porta tipicamente alla formazione di anticorpi anti-insulina in grado di interferire con il dosaggio. Alcuni studiosi hanno cercato, quindi, di misurare l'insulina nei campioni di urina o di siero sottoposti a cromatografia a colonna e precipitazione con PEG. Ma, le misurazioni di insulina "libera" rimangono di interesse limitato come tecnica per il monitoraggio della terapia con insulina in assenza di statistiche che stabiliscano i range terapeutici e di tossicità. Sembra, quindi, che il controllo del glucosio nei diabetici non possa essere ottenuto normalizzando il profilo dell'insulina. Non si conosce a che punto livelli di insulina abnormalmente elevati possano diventare pericolosi.

Procedura del Dosaggio

Il dosaggio Coat-A-Count Insulina è un radioimmunosaggio in fase solida, dove l'insulina marcata con I¹²⁵ compete per un tempo prefissato con l'insulina presente nel campione del paziente per i siti anticorpali insulino specifici. Poiché l'anticorpo è adeso alle pareti della provetta di polipropilene, la semplice decantazione del supernatante è sufficiente per terminare la competizione e per isolare la frazione legata all'anticorpo dell'insulina radiomarcata. La conta della provetta in un gamma counter produce un numero, che convertito attraverso la curva di calibrazione misura l'insulina presente nel campione del paziente.

Reagenti da Dispensare: 1

Tempo Totale di Incubazione: Overnight (18–24 ore) o 3 ore (con il calibratore B omesso).

Conte Totali alla iodinazione:
circa 40 000 cpm

Avvertenze e Precauzioni

Ad uso diagnostico *in vitro*.

Reagenti: Conservare a 2–8°C in un frigorifero appositamente destinato al materiale radioattivo. Eliminare secondo le normative di legge vigenti.

Non utilizzare reagenti oltre la data di scadenza.

Alcuni componenti forniti in questo kit possono contenere materiale di origine umana e/o altri ingredienti potenzialmente pericolosi che necessitano di precauzioni di utilizzo.

Seguire le precauzioni universali, e manipolare tutti i componenti come se potessero trasmettere agenti infettivi. Sono stati analizzati materiali di origine umana e sono stati trovati non reattivi per la Sifilide; per gli Anticorpi Anti-HIV 1 e 2; per l'Antigene di Superficie dell'Epatite B; e per gli Anticorpi Anti-Epatite C.

E' stata aggiunta Sodio Azide a concentrazioni inferiori a 0,1 g/dL come conservante. Al momento dell'eliminazione, irrorare con molta acqua per evitare la formazione di azidi metalliche potenzialmente esplosive nelle tubature di piombo e di rame.

Acqua: Utilizzare solo acqua distillata o deionizzata.

Radioattività

Una copia di tutti i certificati di Autorizzazione per radioisotopi (Specifico o Generico) rilasciata ad un cliente americano deve essere conservata in file presso la Diagnostic Products Corporation prima che i kit o i componenti contenenti materiale radioattivo possano essere spediti. Questi materiali radioattivi possono essere acquisiti da qualsivoglia cliente in possesso dell'Autorizzazione Specifica. Con l'Autorizzazione Generica questi materiali radioattivi possono essere acquistati solo da medici, veterinari che esercitino la professione, laboratori clinici ed ospedalieri – e solo per l'esecuzione di test clinici o di laboratorio in vitro che non implicino somministrazione interna o esterna del materiale radioattivo o delle sue radiazioni alle persone o animali. La sua acquisizione, ricevimento,

conservazione, utilizzo, trasferimento ed eliminazione sono soggette a regolamentazioni e ad Autorizzazione (Generica o Specifica) della Commissione Statunitense per il Nucleare o dello Stato con il quale l'NRC abbia stipulato un accordo per l'esercizio del controllo regolatorio.

Manipolare i materiali radioattivi secondo quanto previsto dall'Autorizzazione Generica o Specifica. Per minimizzare l'esposizione alle radiazioni, l'utilizzatore deve attenersi alle linee guida stabilite dal National Bureau of Standards publication su "Safe Handling of Radioactive Materials" "Norme per una corretta manipolazione dei Materiali Radioattivi". (Guida N° 92, pubblicata il 9 Marzo 1964) e successive edizioni pubblicate dallo Stato e dalle Autorità Federali.

Assorbire immediatamente le fuoriuscite e decontaminare le superfici contaminate. Evitare la formazione di aerosol. Eliminare i rifiuti solidi radioattivi secondo quanto previsto dall'Autorizzazione. Le licenze generiche (possessori di NRC Form 483) possono eliminare i rifiuti radioattivi solidi come non radioattivi, dopo aver rimosso l'etichetta. I detentori di autorizzazioni specifiche (NRC Form 313) devono fare riferimento al Titolo 10, Codice delle Regolamentazioni Federali Parte 20. I detentori di Autorizzazioni negli Stati che hanno stipulato un accordo con l'NRC dovrebbero far riferimento alle regolamentazioni idonee dei loro stati. I detentori di Autorizzazioni Generali possono eliminare i rifiuti radioattivi liquidi del tipo contenuto in questo prodotto attraverso il lavello del laboratorio. I detentori di autorizzazione devono eliminare o rendere illeggibili le etichette dei contenitori vuoti di materiali radioattivi prima di eliminare i rifiuti solidi. I detentori di autorizzazioni specifiche possono eliminare piccoli quantitativi di rifiuti radioattivi liquidi del tipo utilizzato in questo prodotto attraverso il lavello del laboratorio. Fare riferimento alle regolamentazioni appropriate applicabili al Vostro laboratorio.

Materiali Forniti: Preparazione Iniziale

Provette Coattate con un Anticorpo Anti-Insulina (TIN1)

Provette di polipropilene coattate con anticorpi anti-insulina e confezionate in buste a cerniera. Conservare refrigerate al riparo dall'umidità, richiudendole dopo l'utilizzo. Stabili a 2–8°C fino alla data di scadenza indicata sulla confezione.

Colore: verde lime.

TKIN1: 100 Provette. **TKIN2:** 200 Provette

TKIN5: 500 Provette.

TKINX: 1000 Provette.

Insulina marcata con I^{125} (TIN2)

Un concentrato, composto da insulina iodinata. Aggiungere ad ogni provetta un quantitativo misurato di **100 mL** di acqua distillata o deionizzata, e mescolare capovolgendo dolcemente. Stabile a 2–8°C per 30 giorni dopo la preparazione o fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta.

TKIN1: 1 Flacone. **TKIN2:** 2 Flaconi.

TKIN5: 5 Flaconi. **TKINX:** 10 Flaconi.

Calibratori Insulina (INC3–9)

Sette flaconi, etichettati dalla A alla G, contenenti calibratori liofilici processati in siero non umano. Almeno 30 minuti prima dell'utilizzo, ricostituire il calibratore zero A con **6,0 mL** di acqua distillata o deionizzata e ciascuno dei calibratori rimanenti dalla B alla G con **3,0 mL** di acqua distillata o deionizzata. Utilizzare pipette volumetriche e mescolare capovolgendo la provetta. Stabile a –20°C per 30 giorni dopo la ricostituzione.

Aliquotare, se necessario, per evitare cicli ripetuti di congelamento e scongelamento.

TKIN1: 1 set. **TKIN2:** 1 set.

TKIN5: 2 set. **TKINX:** 3 set.

I calibratori ricostituiti hanno valori di insulina *lotto specifici* che rappresentano circa 0, 5, 15, 50, 100, 200 e 350 micro Unità Internazionali di insulina per millilitro (μ IU/mL, WHO 1st IRP 66/304) in siero non umano processato. I punti intermedi della calibrazione possono essere ottenuti mescolando i calibratori in proporzioni idonee.

Materiali Richiesti Ma Non Forniti

Gamma counter — compatibile con provette standard da 12x75 mm

Vortex mixer

Preparazione dei Reagenti

Acqua distillata o deionizzata.

Cilindro Graduato: 100 mL

Pipette Volumetriche: 3,0 mL e 6,0 mL

Radioimmunosaggio

Provette semplici di polipropilene 12x75 mm — da utilizzarsi come provette NSB, disponibili da DPC

Micropipette: da 200 μ L e da 1 000 μ L.

Foam per la decantazione — disponibili da DPC

Carta per grafici logit-log — disponibile da DPC (Codice: ZP797)

Un controllo su base sierica a tre livelli, contenente insulina tra gli altri 25 costituenti dosati, disponibile da DPC (Codice: CON6).

Prelievo dei Campioni

Non sono necessarie preparazioni particolari. Prelevare il sangue²⁰ in provette semplici (senza anticoagulante) annotando l'ora del prelievo e separare il siero dalle cellule.

Si consiglia l'utilizzo di un'ultracentrifuga per schiarire i campioni lipemici.

I campioni emolizzati, itterici o grossolanamente contaminati possono produrre risultati errati.

Provette per il prelievo di sangue di produttori diversi possono dare valori differenti, a seconda dei materiali e degli additivi usati, incluso gel o barriere fisiche, attivatori di coaguli e/o anticoagulanti. L'Coat-A-Count Insulina non è stato verificato con tutte le possibili variazioni di tipi di provette. Consultare la sezione riguardante Campioni Alternativi per dettagli sulle provette testate.

Volume Richiesto: 200 μ L di siero per provetta.

Prelevando i campioni per le determinazioni di insulina, è importante evitare l'emolisi che può comportare risultati bassi.^{22,23}

Conservazione: a 2–8°C per 7 giorni, o fino a 3 mesi congelato a –20°C.²¹

Prima del dosaggio, consentire ai campioni di raggiungere temperatura ambiente (15–28°C) e mescolare scuotendo leggermente o capovolgendo la provetta. Aliquotare, se necessario per evitare cicli ripetuti di congelamento e scongelamento. *Non tentare* di scongelare i campioni congelati riscaldandoli in un bagnetto termostato. Non utilizzare campioni contaminati dalla somministrazione di prodotti radioattivi ai pazienti.

Dosaggio Radioimmunologico

Tutti i componenti devono essere a temperatura ambiente (15–28°C) prima dell'utilizzo. Non utilizzare con questo dosaggio un pipettatore-diluitore automatico.

- 1 Provette Semplici:** Etichettare quattro provette di polipropilene semplici (non coattate) T 12x75 mm T (conte totali) ed NSB (legame non specifico) in duplicato.

Poiché il legame non specifico nel dosaggio Coat-A-Count è caratteristicamente basso, le provette NSB possono essere anche omesse senza compromettere l'accuratezza o il controllo di qualità.

Provette Coattate: Etichettare con A 14 Provette Coattate con Anticorpo Insulina (legame massimo) e dalla B alla G in duplicato. Etichettare altre provette coattate con anticorpo, anch'esse in duplicato, per i controlli ed i campioni dei pazienti.

Calibratore	Circa μ IU/mL 1°IRP [66/304]
A (MB)	0
B*	5
C	15
D	50
E	100
F	200
G	350

* Omettere il calibratore B se viene utilizzata al punto 4 la procedura alternativa, incubazione da 3 ore a temperatura ambiente (15–28°C).

- 2** Dispensare **200 μ L** del calibratore zero A nelle provette NSB ed A, e

200 µL di ciascuno dei calibratori, controlli e campioni rimanenti nelle provette preparate **Dispensare direttamente al fondo.**

Prima del dosaggio diluire i campioni di siero con concentrazioni attese di insulina superiori al calibratore più elevato con il calibratore zero.

E' buona pratica di laboratorio utilizzare una micropipetta con puntali monouso, cambiando i puntali tra un campione e l'altro per evitare la contaminazione da carryover.

- 3** Aggiungere **1,0 mL** di Insulina marcata con I^{125} ad ogni provetta. Vortexare.

I campioni non devono essere lasciati nelle provette per periodi lunghi. Dopo il punto 2 (aggiunta del campione), il punto 3 (aggiunta del tracciante) deve essere completato velocemente, con non più di 40 minuti tra l'aggiunta del primo campione ed il completamento dell'aggiunta del tracciante. Mettere da parte le provette T per la conta (al punto 6); non sono necessari ulteriori passaggi.

- 4** Incubare per **18–24 ore** a temperatura ambiente (15–28°C).

In alternativa, incubare per 3 ore a temperatura ambiente (15–28°C) omettendo i 5 µIU/mL del calibratore (Calibratore B). Questo approccio consente di ottenere risultati comparabili nello stesso giorno (vedi sezioni Dati sulle Prestazioni).

- 5** Decantare completamente.

Rimuovere tutta l'umidità visibile aumentando così la precisione. Utilizzando un foam per la decantazione, decantare il contenuto di tutte le provette (ad eccezione delle provette T) e fare in modo che si asciugano per 2 o 3 minuti. Tamponarle su carta assorbente per eliminare completamente i liquidi.

- 6** Contare per **1 minuto** in un gamma counter.

Calcolo dei Risultati

Per calcolare le concentrazioni di insulina da una rappresentazione logit-log della curva di calibrazione, calcolare inizialmente per ciascuna coppia di

provette la media delle conte al minuto corrette con NSB:

Conte Nette = (Media dei CPM) Meno (Media CPM **NSB**)

Quindi determinare il legame di ogni coppia di provette come percentuale del legame massimo (MB), con le conte corrette-NSB delle provette A prese al 100%:

Percentuale di Legato = (Conte Nette / Conte Nette **MB**) × 100

(Il calcolo può essere semplificato omettendo la correzione per il legame non specifico; i campioni entro il range dei calibratori danno virtualmente gli stessi risultati quando la Percentuale di Legato viene calcolata direttamente dai CPM Medi).

Utilizzando la carta logit-log, tracciare la Percentuale di Legato sull'asse verticale (probabilità) verso la Concentrazione sull'asse orizzontale (logaritmica) per ciascuno dei calibratori non zero e tracciare una linea retta approssimativamente lungo il tracciato di questi punti. I risultati per i campioni sconosciuti possono essere letti dalla retta attraverso interpolazione. (La curva di calibrazione per la procedura alternativa di 3 ore a temperatura ambiente (15–28°C) deve basarsi solo sui calibratori dalla C alla G.)

Si consiglia di visionare i risultati per stabilire la correlazione entro i replicati e tracciare un grafico della curva di calibrazione (anche se i calcoli vengono effettuati dal computer) per visualizzare l'appropriatezza della trasformazione utilizzata e per individuare i punti devianti all'interno della calibrazione. Consigliamo anche di mantenere una rintracciabilità dei parametri utilizzati per la riduzione dei dati:

T = Conte Totali (conte al minuto)

%NSB = $100 \times (\text{Conte NSB Medie} / \text{Conte Totali})$

%MB = $100 \times (\text{Conte Nette} / \text{Conte Totali})$

E le "intercette" al 20, 50 ed 80%, dove

20% = Concentrazione al 20% di Legato ecc.

Nota: sono accettabili anche altri tipi di approccio, quali: l'implementazione della logistica a 4 parametri. Vedi Dudley Ra et

al. Guidelines for immunoassay data Reduction. Clin Chem 1985;31:1264-71.

Seduta Esemplificativa (Procedura di Base): a solo scopo illustrativo e non per calcolare i risultati di un'altra seduta. I valori sono stati generati con la procedura overnight. I valori dei calibratori sono *lotto-specifici*, le concentrazioni elencate nella colonna più a destra possono non essere in linea con i valori dei calibratori forniti nel kit. (Vedi tabella "Example Run – Basic Procedure".)

Seduta Esemplificativa (Procedura Alternativa di 3 ore): a solo scopo illustrativo e non per calcolare i risultati di un'altra seduta. I valori sono stati generati con la procedura di 3 ore a temperatura ambiente. I valori dei calibratori sono *lotto-specifici*, le concentrazioni elencate nella colonna più a destra possono non essere in linea con i valori dei calibratori forniti nel kit. (Vedi tabella "Example Run – Alternate Procedure".)

Controllo di Qualità

Devono essere dosati come campioni sconosciuti nella routine controlli o pool di sieri con almeno due livelli di concentrazione di insulina (basso ed alto).

Riportare i risultati dei pazienti solo se i risultati dei controlli sono conformi ai criteri di accettabilità del Vostro laboratorio.

Si consiglia per ogni dosaggio di annotare i numeri di lotto dei componenti utilizzati, quali le date di ricostituzione o di apertura. Si consiglia anche di tracciare i grafici dei risultati dei controlli giorno dopo giorno – come descritto, ad esempio, in Westgard JO, et al. A multi-rule chart for quality control. Clin Chem 1981;27:493-501. Campioni ripetuti possono servire come ulteriore strumento per monitorare la precisione inter-dosaggio; coppie di campioni intervallate lungo tutto il dosaggio possono essere d'aiuto nel verificare l'assenza di deviazioni significative.

Valori Attesi

In uno studio effettuato su 103 campioni di siero prelevati da volontari a digiuno con livelli di glucosio inferiori o uguali a 110 mg/dL, il dosaggio Coat-A-Count Insulina ha prodotto un valore mediano di

8.3 $\mu\text{IU/mL}$, con il 95% dei risultati di 22 $\mu\text{IU/mL}$ o valori inferiori.

I laboratori devono considerare questi risultati *soltanto come linee guida*. Ogni laboratorio dovrebbe stabilire i propri range di riferimento.

Prestazioni del Dosaggio

Vedi Tabelle e Grafici per dati rappresentativi del dosaggio Coat-A-Count Insulina. I risultati di insulina nelle sezioni di cui di seguito sono espressi come $\mu\text{IU/mL}$. Ad eccezione di quanto specificato, tutti i risultati sono stati ottenuti utilizzando un'incubazione overnight a temperatura ambiente.

Range di calibrazione: 5 – 350 $\mu\text{IU/mL}$ (WHO 1st IRP 66/304). Questi calibratori sono *lotto-specifici*.

Sensibilità analitica:

Procedura di Base Overnight: 1,2 $\mu\text{IU/mL}$,
Procedura Alternativa di 3 ore: 4,6 $\mu\text{IU/mL}$

Profilo di precisione: E' stato presentato un profilo di precisione sulla base di circa 20 gradi di libertà che rappresentano i CV intra dosaggio attesi per campioni dosati in duplicato utilizzando la Procedura di Base. (vedi grafico "Precision Profile").

Intra-Dosaggio (All'interno della stessa seduta): Sono state calcolate statistiche per ciascuno dei cinque campioni dai risultati di 20 coppie di provette in un unico dosaggio. Lo studio è stato effettuato usando la Procedura Alternativa. (Vedi tabella "Intraassay precision".)

Inter-Dosaggio (Da una seduta

all'altra): Sono state calcolate statistiche per ciascuno dei quattro campioni dai risultati di coppie di provette in 20 dosaggi diversi. Lo studio è stato effettuato utilizzando la Procedura di Base. (Vedi tabella "Interassay Precision".)

Specificità: L'antisiero Coat-A-Count Insulina è altamente specifico per l'insulina con una crossreattività particolarmente bassa verso i composti (diversi dall'insulina e dalla pro-insulina) che possano essere presenti nei campioni dei pazienti) (Vedi tabella "Specificity".)

Effetto Fine-Seduta: Nessuno fino a circa 250 provette. (vedi tabella "End-of-Run Effect").

Linearità: I campioni sono stati dosati a varie diluizioni. (Vedi tabella "Linearity" per dati rappresentativi.)

Recupero: Sono stati dosati campioni diluiti 1:19 con tre soluzioni di insulina (329, 1 420 e 3 535 µIU/mL). (Vedi tabella "Recovery").

Bilirubina: Un ittero grave (bilirubina fino a 200 mg/L) può provocare un aumento dei valori. (Vedi tabella "Bilirubin".)

Emolisi: La presenza di globuli rossi impaccati a concentrazioni fino a 30 µL/mL può provocare risultati bassi.^{22,23} (Vedi tabella "Hemolysis".)

Lipemia: Per simulare vari gradi di lipemia, i campioni dei pazienti sono stati diluiti con un'emulsione grassa formata da una miscela di lipidi. La soluzione in stock aveva una concentrazione di trigliceridi di 20 000 mg/dL. I risultati mostrano che la lipemia non ha effetti clinicamente significativi sul dosaggio.

Tipo di Campione Alternativo: Per determinare l'effetto di campioni alternativi, è stato prelevato del sangue da 20 volontari in provette semplici, eparinizzate, EDTA e Becton Dickinson vacutainer SST®. Tutti i campioni si sono analizzati mediante il procedimento di Insulina dell'Coat-A-Count, con i risultati seguenti.

(Eparina) = 0,863 (Siero) + 1,05 µIU/mL
r = 0,972

(EDTA) = 0,774 (Siero) + 0,54 µIU/mL
r = 0,952

(SST) = 0,97 (tubi semplici) + 1,51 µIU/mL
r = 0,986

Valore medio:
21,3 µIU/mL (Siero)
19,4 µIU/mL (Eparina)
17,0 µIU/mL (EDTA)
22,2 µIU/mL (SST)

Effetto delle Proteine: Per simulare le concentrazioni delle varie proteine, sono stati effettuati esperimenti nei quali aliquote da 2,0 mL di un pool di siero umano sono state congelate e quindi ricostituite con vari volumi d'acqua. Ciascuna aliquota ricostituita è stata quindi dosata con il dosaggio Coat-A-Count Insulina. Le aliquote ricostituite con metà del volume originario rappresentano una concentrazione di proteine estremamente elevata nell'ordine dei 14 g/dL. (Il fattore per correggere il

volume di ricostituzione è tabulato di seguito). Questi risultati indicano che anche ampie variazioni nelle proteine non hanno virtualmente nessun effetto sul dosaggio Coat-A-Count Insulina (Vedi tabella "Protein Effect".)

Comparazione di metodi: Il dosaggio Coat-A-Count è stato comparato al dosaggio DPC IMMULITE Insulina su 172 campioni, con concentrazioni di insulina che vanno da circa 5,3 a 200 µIU/mL. (Vedere la grafica.) Mediante regressione lineare:

(CAC) = 0,90 (IML) + 0,99 µIU/mL
r = 0,973

Valore medio:
36 µIU/mL (Coat-A-Count)
39 µIU/mL (IMMULITE)

Assistenza Tecnica

All'Estero: Contattare il Proprio Distributore Nazionale.

Il Sistema Qualità della Diagnostic Products Corporation è certificato secondo le norme ISO 13485:2003.

Português

Insulina Coat-A-Count

Utilização: A Insulina Coat-A-Count é radioimunoensaio fase-sólida marcado com ¹²⁵I designado para a mensuração quantitativa da Insulina em soro. É estritamente para uso diagnóstico in vitro e como um auxiliar no diagnóstico clínico.

Números de catálogo: **TKIN1** (100 tubos), **TKIN2** (200 tubos), **TKIN5** (500 tubos), **TKINX** (1000 tubos).



O kit de 100 tubos contém menos que 3 microcuries (111 kilobecquerels) de Insulina ¹²⁵I radioativa; o kit de 200 tubos contém menos que 6 microcuries (222 kilobecquerels); o kit de 500 tubos contém menos que 15 microcuries (555 kilobecquerels); e o de 1000 tubos contém menos que 30 microcuries (1110 kilobecquerels).

Sumário e explicação do teste

A Insulina humana é um hormona polipeptídeo originário das células beta do

pâncreas, sendo como um dos principais reguladores da armazenagem e produção de carboidratos. Sua secreção é normalmente estimulada pelo aumento da quantidade de glicose em circulação. Isto leva a níveis altos de insulina e uma mais rápida assimilação tecidual da glicose – seguido por um declínio no nível de insulina enquanto que o nível de glicose se mantém.

Em várias condições, notadamente no insulínoma e diabetes, esta relação está impariada. A insulina tende a circular à níveis inadequadamente altos em pacientes com tumores pancreáticos secretores de insulina; tais tumores podem ser a causa de hipoglicemia. Desta maneira, imunoenaios de insulina – usados algumas vezes em conjunto com doses provocativas de tolbutamida ou cálcio – desempenhou um papel essencial na identificação (e localização) dos insulínomas. O achado da hipoglicemia de jejum em associação com níveis séricos de concentração inadequadamente alta de insulina é considerado como diagnóstico.

Os níveis de insulina não figuram em sub-classificação de diabetes desenvolvido pelo “Grupo de Dados Nacional dos Diabéticos”. No entanto, quando obtido em conjunto com o teste de tolerância da glicose, eles parecem ser de algum valor prognóstico para pré dizer os benefícios da terapia de insulina e as situações de progressão à dependência de insulina e as complicações (como retinopatia) características do diabetes.

A aplicação de radioimunoensaio de insulina a pacientes sob terapia de insulina é complicada pelo fato de que tal terapia tipicamente conduz a formação de anticorpos anti-insulina capaz de interferirem com o ensaio.

Alguns investigadores tem também mensurado a insulina na urina, ou nas amostras de soro submetidas a cromatografia de coluna ou por precipitação por PEG. Mas, a mensuração da insulina “livre” permanece com interesses limitados, como uma técnica para monitorização da terapia de insulina na ausência de estatísticas estabilizadoras de faixas terapêuticas ou tóxicas. Daí parece que o controle da glicose nas diabetes não podem ser

geralmente concluída por um perfil normalizante de insulina. Também não é conhecido qual o ponto de níveis de insulina anormalmente altos que se tornam perigosos.

Princípio do Procedimento

A Insulina Coat-A-Count é um procedimento de radioimunoensaio em fase sólida onde a Insulina marcada com iodo ¹²⁵I compete, por um período fixo de tempo, com a Insulina da amostra do paciente para os sítios específicos do anticorpo anti-Insulina. Em razão do anticorpo estar imobilizado na parede de tubo de polipropileno, uma simples decantação do sobrenadante é suficiente para terminar a competição e isolar a fracção de insulina radiomarcada ligada ao anticorpo. Contando-se o tubo em um contador GAMMA, o mesmo irá gerar um número, o qual ao ser convertido pela curva de calibração na medida de insulina presente na amostra do paciente.

Reagentes para Pipetar: 1

Tempo de Incubação: Overnight (18–24 horas) ou 3 horas com o Calibrador B obtido).

Contagens Totais na Marcação com o Iodo: aproximadamente 40 000 cpm

Precauções

Para uso de diagnóstico *in vitro*.

Reagentes: Conservar a 2–8°C num frigorífico destinado para materiais radioactivos. Eliminar de acordo com as leis aplicáveis.

Não utilize reagentes com prazo de validade expirado.

Alguns componentes fornecidos com este dispositivo podem conter matéria de origem humana e/ou outros ingredientes potencialmente perigosos que necessitem de algumas precauções.

Manipule com as devidas precauções todos os materiais capazes de transmitir doenças infecciosas. As matérias primas, obtidas de soro humano, foram testadas, revelando resultados negativos para a sífilis, para os anticorpos do vírus da imunodeficiência humana (HIV) 1 e 2; para o antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg) e para os anticorpos do vírus da hepatite C.

Azida de sódio foi adicionada como conservante; para evitar acumulações de azidas metálicas explosivas em canalizações de cobre e alumínio, os reagentes devem ser rejeitados no esgoto apenas se estiverem diluídos e forem lavados com grandes volumes de água.

Água: Utilize água destilada ou deionizada.

Radioatividade

Uma cópia da licença de uso de produtos radioactivos (específico ou geral) enviada pelo cliente, deve estar em poder da DPC antes do envio dos kits ou componentes contendo material radioactivo. Estes materiais radioactivos podem ser adquiridos por qualquer cliente que possua a necessária licença específica. Com uma licença generalista estes produtos radioactivos só podem ser adquiridos por médicos, veterinários na prática de medicina veterinária, laboratórios clínicos e hospitais. E somente para uso clínico *in vitro* ou testes laboratoriais não envolvendo administração externa ou interna do material radioactivo ou da sua radiação para o ser humano ou outros animais. A sua aquisição, receita, armazenamento uso, transporte e eliminação estão sujeitas aos regulamentos e à licenciada Comissão de Regulação Nuclear ou do Estado respectivo de acordo com a lei em vigor.

Tratar os materiais radioactivos de acordo com a regulamentação da sua licença, específica ou generalista. De modo a minimizar a exposição à radiação deve o utilizador seguir as instruções da publicação do Departamento Nacional de Padrões (*Utilização segura de materiais radioactivos*-Livro No. 92, publicado em Março de 1964) e publicações seguintes do Estado e Autoridades Federais.

Limpar os derrames prontamente e descontamine as superfícies afectadas. Evitar os aerossóis. Elimine os lixos radioactivos de acordo com a regulamentação da licença. As licenças generalistas (portadores da licença NRC 483) podem eliminar os lixos sólidos radioactivos como lixo não radioactivo depois de remover os rótulos. Licenças Específicas (Licença NRC 313) devem ter em conta o Capítulo 10 do artigo 20, do Código de Regulamentações Federais.

Cada Estado deve referir a legislação em vigor aprovada para o seu território. As licenças generalistas podem eliminar os lixos radioactivos líquidos do tipo deste produto para um esgoto de laboratório. Os licenciados devem remover os rótulos dos frascos vazios de materiais radioactivos antes de os colocar no esgoto sólido. As licenças específicas podem eliminar pequenas quantidades de lixo radioactivo deste tipo de produto para o esgoto normal do laboratório. Ter em atenção as regulamentações em vigor para o seu laboratório.

Materiais fornecidos: Preparação inicial

Tubos de Insulina Ab (TIN1)

Tubos de polipropileno revestidos com anticorpo de Insulina em pacotes com fecho de segurança. Conservar refrigerado e protegido da humidade, selar os sacos cuidadosamente após cada abertura. Estável a 2–8°C até à data de validade inscrita na embalagem. Cor: Verde limão.

TKIN1: 100 tubos. **TKIN2:** 200 tubos.

TKIN5: 500 tubos. **TKINX:** 1000 tubos.

Insulina ¹²⁵I (TIN2)

Um concentrado, consistindo de Insulina iodada. Para cada frasco adicione **100 mL** de água destilada ou deionizada, e misture gentilmente por inversão. Estável de 2–8°C por 30 dias após preparação, ou até a data de validade marcada no rótulo.

TKIN1: 1 frasco. **TKIN2:** 2 frascos.

TKIN5: 5 frascos. **TKINX:** 10 frascos.

Insulina Calibradores (INC3–9)

Sete frascos, rotulados de A a G, de liofilizado processado em soro não humano. Pelo menos 30 minutos antes do uso, reconstituir o calibrador zero A com **6,0 mL** de água destilada ou deionizada, e a cada um dos calibradores remanescentes de B a G com **3,0 mL**. Usar pipetas volumétricas e misturar gentilmente por rotação. Estável a –20°C por 30 dias após reconstituição. Aliquotar, se necessário, para evitar ciclos repetitivos de congelamento e descongelamento.

TKIN1: 1 conjunto. **TKIN2:** 1 conjunto.

TKIN5: 2 conjuntos. **TKINX:** 3 conjuntos.

Os calibradores reconstituídos possuem valores de Insulina lote específico, representando aproximadamente 0, 5, 15, 50, 100, 200 e 350 micro-unidade Internacional de Insulina por mililitro ($\mu\text{IU/mL}$, WHO 1st IRP 66/304) em soro não humano processado. Pontos de calibração intermediários podem ser obtidos pela mistura de calibradores em proporções adequadas.

Materiais necessários mas não fornecidos

Contador Gamma – compatível com tubos standard 12x75 mm

Agitador Vórtex

Preparação do Reagente

Água destilada ou deionizada

Cilindro graduado: 100 mL

Pipetas volumétricas: 3,0 mL e 6,0 mL

Radioimunoensaio

Tubos lisos de polipropileno 12x75 mm — para serem usados com tubos T e NSB, disponíveis na DPC.

Micropipetas: 200 μL e 1 000 μL .

Estante de espuma para decantação — disponível na DPC.

Papel gráfico Logit-log — disponível na DPC (Números de catálogo: ZP797)

Um controle de imunoensaio baseado em soro humano, com três níveis contendo Insulina como um dos 25 constituintes ensaiados, disponível na DPC (Número de catálogo: CON6).

Colheita

Nenhuma preparação inicial é necessária. Colher o sangue por punção venosa²⁰ em tubos comuns (sem anticoagulante), anotando-se a hora da colheita e separar o soro das células.

Recomenda-se o uso de uma ultra centrífuga para clarear amostras lipémicas.

Amostras hemolisadas, ictéricas ou totalmente contaminadas podem causar resultados errados.

Os tubos para colheita sanguínea de diferentes fabricantes, podem originar diferentes valores, dependendo dos

materiais e aditivos, incluindo gel ou barreiras físicas, ativadores do coágulo e/ou anti coagulantes. Coat-A-Count Insulina não foram ainda testados com todas as possíveis variações originadas pelos tipos de tubos. Consultar a secção Tipos de Amostras Alternativas para obter detalhes sobre os tubos que foram testados.

Volume de Amostra: 200 μL de soro por tubo.

Ao colectar as amostras para as determinações de Insulina, é importante evitar a hemólise, a qual pode levar a resultados inadequadamente baixos.^{22,23}

Armazenagem: 2–8°C por 7 dias, ou por até 3 meses congelados a –20°C.²¹

Deixar as amostras atingir a temperatura ambiente (15–28°C) e agitar suavemente ou por inversão. Aliquotar se necessário para evitar repetidos congelamentos/descongelamentos. Não descongelar as amostras por aquecimento em banho-maria. Amostras contaminadas pela administração de radioactividade ao paciente são inadequadas para o uso.

Técnica de Radioimunoensaio

Todos os componentes devem estar à temperatura ambiente (15–28°C) antes de usar. Pipetador-diluidor automático não é recomendado para o ensaio deste kit.

1 Tubos lisos: Rotular quatro tubos (não revestidos) de polipropileno 12x75 mm em tubos T (contagem total) e NSB (ligação não específica) em duplicata.

Devido ao facto das ligações não específicas no método de Coat-A-Count serem geralmente baixas os valores de NSB podem ser omitidos sem comprometer a precisão ou controle de qualidade.

Tubos revestidos: Rotular quatorze tubos revestidos de Insulina Ab em A (ligação máxima) e de B a G em duplicata. Rotular tubos recobertos adicionais, também em duplicata, para controle e amostras de pacientes.

Calibrador	Aproximadamente $\mu\text{IU/mL}$ 1st IRP [66/304]
A (MB)	0
B*	5
C	15
D	50
E	100
F	200
G	350

* Omitir o calibrador B se a incubação alternativa de 3 horas à temperatura ambiente (15–28°C) for usada no item 4.

- Pipetar **200 μL** do calibrador zero A nos tubos NSB e A, e **200 μL** de cada calibrador remanescente, controle e amostra de paciente nos tubos pré-preparados **Pipetar directamente para a base dos tubos.**

Diluir amostras de soro dos pacientes das quais se esperam conter concentrações de insulina superiores ao calibrador mais alto com o calibrador zero antes do ensaio.

É uma boa prática laboratorial o uso de micropipetas com ponteira descartável, trocando-a entre as amostras de maneira a evitar a contaminação por arraste.

- Adicionar **1,0 mL** de Insulina ^{125}I a todos os tubos. Agitar em Vórtex.
As amostras não devem ser deixadas nos tubos por longos períodos. O item 2 (adição da amostra), e o item 3 (adição do traçador) devem ser completados o mais rápido possível, não mais que 40 minutos deve transcorrer entre a adição da primeira amostra à finalização da adição do traçador. Deixar os tubos T para as contagens (nº 6); não necessitam mais processamento.
- Incubar por **18–24 horas** na temperatura ambiente (15–28°C).
Alternativamente, incubar por 3 horas à temperatura ambiente (15–28°C), omitindo-se o calibrador 5 $\mu\text{IU/mL}$ (Calibrador B). Esta aproximação permite resultados comparáveis no mesmo dia (Ver secções Dados da Performance).
- Decantar vigorosamente.

Removendo todo o líquido remanescente melhora-se bastante a precisão. Usando-se uma estante de espuma para decantação, decantar o conteúdo de todos os tubos (excepto os tubos T) e deixe-os escorrer por 2 ou 3 minutos. Eliminar todas as gotas residuais com papel absorvente.

- Contar **1 minuto** em contador gama.

Cálculo dos Resultados

Para calcular as concentrações de Insulina de uma representação logit-log da curva de calibração, inicialmente calcular para cada par de tubos a média corrigida para NSB em contagens por minuto:

Contagens reais = (Média CPM) minutos (Média NSB CPM)

Determine a ligação de cada par de tubos como percentagem do máximo de ligação (MB), com o NSB-contagens por minuto corrigidas dos tubos A tidas como 100%:

Percentagem de Ligação = (Contagens reais / Contagens MB reais) $\times$ 100

(O cálculo pode ser simplificado omitindo a correcção para a ligação não específica; amostras dentro da gama de calibração originam virtualmente os mesmos resultados quando a Percentagem de Ligação é calculada directamente da Média de CPM.)

Usando um papel milimétrico logit-log, represente a Percentagem de Ligação no eixo vertical (probabilidade) contra a Concentração no eixo horizontal (logarítmico) para cada um dos calibradores diferentes de zero, e representar uma linha recta em função da trajectória destes pontos. Resultados de amostras desconhecidas podem então ser lidas nessa recta por interpolação. (A curva de calibração para o procedimento alternativo com 3 horas à temperatura ambiente (15–28°C) deve ser baseada somente nos calibradores de C a G.)

É boa prática verificar os resultados pela concordância entre as réplicas, e construir um gráfico da curva de calibração (mesmo que os cálculos sejam efectuados por computador) para verificação visual da aplicabilidade da transformação usada e como forma para detectar pontos de

calibração que se afastem. Também se recomenda guardar estas curvas

$T = \text{Contagens Totais (como contagens por minuto)}$

$\%NSB = 100 \times (\text{Média Contagens NSB} / \text{Contagens Totais})$

$\%MB = 100 \times (\text{Contagens reais} / \text{Contagens Totais})$

E os 20, 50 e 80 por cento "intercepta," onde

20% = Concentração a 20 por cento de Ligação, etc.

Note que para outras perspectivas, como a implementação de uma logística de 4 parâmetros, também é aceitável. Ver Dudley RA, et al. Guidelines for immunoassay data reduction. Clin Chem 1985;31:1264-71.

Exemplo de Ensaio (Procedimento Básico): Apenas para ilustração, não para calcular resultados de outro ensaio. Os valores são gerados com o procedimento overnight. Porque os valores dos calibradores são *lote-específico*, as concentrações listadas na coluna mais à direita podem não corresponder aos valores dos calibradores fornecidos com o dispositivo fornecido na sua encomenda. (Ver tabela "Exemplo de Ensaio – Procedimento básico".)

Exemplo de Ensaio (Procedimento Alternativo de 3 horas): Apenas para ilustração, não para calcular resultados de outro ensaio. Os valores foram gerados com o procedimento de 3 horas em temperatura ambiente. Porque os valores dos calibradores são *lote-específico*, as concentrações listadas na coluna mais à direita podem não corresponder aos valores dos calibradores fornecidos com o dispositivo fornecido na sua encomenda. (Ver tabela "Exemplo de Ensaio – Procedimento Alternativo".)

Controlo de Qualidade

Controles ou pools de soro com pelo menos dois níveis (baixo e alto) de concentração de Insulina devem ser rotineiramente ensaiados como desconhecidos.

Os resultados dos pacientes devem apenas ser reportados se os resultados dos controlos para este ensaio estiverem

dentro dos critérios de aceitação estabelecidos pelo laboratório.

É boa prática laboratorial registar para cada ensaio o número do lote dos componentes usados, bem como as datas de quando foram primeiro reconstituídas ou abertas. Recomenda-se registar os valores diários em gráfico – como descrito, por exemplo, in Westgard JO, et al. A multi-rule chart for quality control. Clin Chem 1981;27:493-501. Note que amostras repetidas podem servir como ferramenta adicional para monitorar a precisão inter-ensaio, e que pares de controlos podem ser colocados ao longo do ensaio para ajudar a verificar a ausência de variação significativa.

Valores de Referência

Um estudo com 103 amostras de soro de adultos voluntários em jejum, com os níveis de glicose em jejum igual ou inferiores a 110 mg/dL, o ensaio de Insulina Coat-A-Count gerou uma mediana de 8,3 µIU/mL, com 95% dos resultados inferiores a 22 µIU/mL ou menos.

Laboratórios devem considerar estes resultados *como directrizes apenas*. Cada laboratório deve estabelecer os seus próprios valores de referência.

Características do Ensaio

Ver tabelas e gráficos para dados representativos da Insulina Coat-A-Count. Os resultados de Insulina na secção abaixo estão expressos como µIU/mL. A não especificado em contrário, todos os resultados foram obtidos usando-se a incubação tipo overnight em temperatura ambiente.

Calibração: 5 – 350 µIU/mL (WHO 1st IRP 66/304). Os calibradores são *lote-específico*.

Sensibilidade Analítica:

Procedimento Básico Overnight:

1,2 µIU/mL,

Incubação Alternativa de 3 horas:

4,6 µIU/mL

Perfil de Precisão: Um perfil de precisão é mostrado, baseado em aproximadamente 20°C de liberdade e representando os CVs intraensaios do qual se espera para amostras ensaiadas

em duplicatas usando-se o procedimento básico. (Ver gráfico "Perfil de Precisão").

Intraensaio (Dentro do Ensaio):

Estatísticas foram calculadas para cada 5 amostras dos resultados dos 20 pares de tubos em um único ensaio. O estudo foi realizado usando-se o procedimento alternativo. (Consulte a tabela "Precisão Intra-ensaio".)

Interensaio (Ensaio a Ensaio):

Estatísticas foram calculadas para cada 4 amostras dos resultados dos pares de tubos em 20 ensaios diferentes. O estudo foi realizado usando-se o procedimento básico (Consulte a tabela "Precisão Interensaio".)

Especificidade: O anti-soro da Insulina Coat-A-Count é altamente específico para a Insulina, com uma reação cruzada particularmente baixa à compostos (além de Insulina e pró-Insulina) que possam estar presentes nas amostras dos pacientes. (Ver tabela de "Especificidade".)

Efeito fim-de-série: Nenhum até aproximadamente 250 tubos. (Ver tabela "Efeito fim-de-série".)

Linearidade: As amostras foram doseadas sob várias diluições. (Consulte a tabela "Linearidade" para dados representativos.)

Recuperação: As amostras foram misturadas em 1 para 19 com três soluções de Insulina (329, 1 420 e 3 535 µIU/mL) foram ensaiadas. (Ver tabela de "Recuperação" para dados representativos.)

Bilirrubina: Uma icterícia severa bilirrubina de até 200 mg/L podem causar um aumento dos valores. (Ver tabela "Bilirrubina".)

Hemólise: A presença de células de glóbulos vermelhos compactadas em concentrações de até 30 µL/mL podem conduzir à resultados inadequadamente baixos.^{22,23} (Ver tabela "Hemólise".)

Lipemia: Para simular vários graus de lipemia, amostras de pacientes foram misturadas com uma emulsão de gordura consistindo de uma mistura de lipídeos. A solução estoque possui uma concentração de triglicerídeos de 20 000 mg/dL. Os resultados mostraram que a lipemia não possui efeito clinicamente significativo no ensaio.

Tipo de amostra alternativa: Para determinar o efeito de amostras alternativas, foi colhido sangue de 20 voluntários em tubos secos, com EDTA, heparinizados e tubos de vácuo SST[®] da Becton Dickinson. Todas as amostras foram ensaiadas pelo método Insulina Coat-A-Count, com os seguintes resultados.

(Heparina) = 0,863 (Soro) + 1,05 µIU/mL
r = 0,972

(EDTA) = 0,774 (Soro) + 0,54 µIU/mL
r = 0,952

(SST) = 0,97 (tubos simples) + 1,51 µIU/mL
r = 0,986

Médias:
21,3 µIU/mL (Soro)
19,4 µIU/mL (Heparina)
17,0 µIU/mL (EDTA)
22,2 µIU/mL (SST)

Efeito da Proteína: Para simular várias concentrações de proteína, foram realizados experimentos nos quais alíquotas de 2,0 mL de pool de soro humano foram liofilizadas e reconstituídas com vários volumes de água. Cada alíquota reconstituída foi então ensaiada pelo procedimento Insulina Coat-A-Count. Nota-se que as alíquotas foram reconstituídas com a metade do volume original representando uma concentração de proteína extremamente alta na ordem de 14 g/dL. (O fator de correção para o volume de reconstituição está tabulado abaixo). Estes resultados indicam que uma grande variação na proteína não possui virtualmente efeito no ensaio de Insulina Coat-A-Count. (Ver tabela "Efeito da Proteína".)

Comparação de Métodos: O ensaio Coat-A-Count foi comparado ao ensaio Insulina IMMULITE da DPC em 172 amostras de pacientes, com concentrações na faixa de aproximadamente 5,3 a 200 µIU/mL. (Consulte o gráfico.) Regressão linear:

(CAC) = 0,90 (IML) + 0,99 µIU/mL
r = 0,973

Médias:
36 µIU/mL (Coat-A-Count)
39 µIU/mL (IMMULITE)

Assistência Técnica

Por favor contacte o seu Distribuidor Nacional.

O Sistema de Qualidade da Diagnostic Products Corporation está registado sob ISO 13485:2003.



Diagnostic Products Corporation
Corporate Offices
5210 Pacific Concourse Drive
Los Angeles, CA 90045-6900
USA

2005-03-18

PITKIN – 4



EC REP DPC Biermann GmbH
61231 Bad Nauheim
Germany
+49 -6032-994-00