

## INSULINA [I-125] IRMA kit

RK-400CT. Estuche para 100 determinaciones

Juego de reactivos para la determinación cuantitativa *in vitro* de Insulina en suero humano, en el rango de 1,8 - 500  $\mu$ IU/mL.

### Introducción

La Insulina es una hormona polipeptídica ligera de 6 kDa y 51 aminoácidos que se sintetiza en las células  $\beta$  de los islotes pancreáticos a partir del precursor proinsulina. La proinsulina se divide enzimáticamente para formar insulina y péptido-C, los cuales se almacenan en el páncreas y son secretados en cantidades equimolares al torrente sanguíneo. La insulina está compuesta por dos cadenas polipeptídicas: A (21 aminoácidos) y B (30 aminoácidos), unidas por dos puentes disulfuro. Las diferencias entre las secuencias de aminoácidos de la insulina proveniente de diferentes mamíferos son insignificantes, no siendo así en el caso del péptido-C.

La insulina es una importante hormona metabólica que ejerce varios efectos directos e indirectos sobre el organismo. Su acción general consiste en estimular la síntesis y acumulación de las macromoléculas que juegan un papel en la regulación del metabolismo y el equilibrio energético. La insulina aumenta la velocidad del transporte de la glucosa a través de las membranas celulares y facilita la penetración de otros monosacáridos, aminoácidos, iones de potasio y magnesio en las células. La insulina promueve la utilización y oxidación de la glucosa, la glicogénesis, lipogénesis, así como la formación de ATP, ADN y ARN.

La determinación de la concentración de insulina es útil en la evaluación diagnóstica de varias situaciones patológicas como el hiperinsulinismo patológico (ej. nesidioblastosis y tumores de células de islotes), la diabetes mellitus insulino-dependiente o tipo I y la diabetes mellitus tipo II o resistente a la insulina.

### Principio del ensayo

Este ensayo utiliza el principio del análisis inmunoradiométrico (IRMA) en fase sólida. Para ello emplea dos anticuerpos monoclonales que reconocen dos epítopes diferentes de la molécula. Uno de ellos está marcado con radioyodo (anticuerpo "señal") y el otro, conjugado a biotina, funciona como anticuerpo "captura".

El inmunocomplejo formado por el antígeno con los dos anticuerpos ("sándwich") se inmoviliza en la superficie de los tubos de ensayo recubiertos con estreptavidina (reacción estreptavidina-biotina) durante un período de incubación de 2 horas bajo agitación constante. Después se decantan los tubos y se mide la radiactividad enlazada en un contador gamma. La radiactividad presente en los tubos es directamente proporcional a la concentración de la hormona presente en el sistema. Utilizando calibradores de concentración conocida de insulina se prepara una curva de calibración a partir de la cual se determina por interpolación la concentración de insulina presente en las muestras.

### Contenido del juego

1. TRAZADOR, 1 frasco con 21 mL, listo para usar, contiene < 980 kBq de anticuerpo monoclonal de ratón anti-insulina marcado con  $^{125}$ I y anticuerpo monoclonal de ratón anti-insulina biotinilado en solución tampón con 0,1 %  $\text{NaN}_3$  y colorante rojo.

2. CALIBRADORES (S0-S5), 6 frascos con 1 mL de suero equino liofilizado y 0,1%  $\text{NaN}_3$ . Los calibradores contienen aproximadamente 0; 5; 15; 50; 150; 500  $\mu$ IU/mL de insulina y han sido calibrados contra el 2<sup>do</sup> estándar de referencia internacional NIBSC 11/212. La concentración exacta se especifica en las etiquetas y el certificado de calidad incluido.

3. SUERO CONTROL, 1 frasco, contiene 1 mL de suero humano liofilizado con 0,1%  $\text{NaN}_3$ . Su concentración se especifica en el certificado de calidad incluido.

4. TUBOS RECUBIERTOS: 2x50 tubos de 12x75 mm, empaquetados en cajas plásticas, listos para usar.

5. SOLUCIÓN DE LAVADO, 1 frasco, contiene 20 mL. Diluir con 1000 mL de agua destilada. Contiene 0,2 %  $\text{NaN}_3$ .

### Materiales y equipos necesarios

Gradilla para tubos de ensayo, pipetas de precisión con puntas desechables (100, 200 y 2000  $\mu$ L), agitador horizontal u orbital, lámina de polietileno, papel absorbente, contador gamma

#### Materiales y equipos recomendados:

Pipetas de repetición (200 y 2000  $\mu$ L). Jeringa automática o dispensador para el lavado.

### Recolección y almacenamiento de las muestras

Las muestras de suero deben colectarse de acuerdo a los procedimientos habituales que se practican en los laboratorios clínicos. Las muestras pueden conservarse entre 2 y 8 °C si el análisis se efectuará dentro de las 24 horas siguientes a su recolección, de lo contrario deben conservarse congeladas a una temperatura igual o menor que -20 °C, por un tiempo máximo de 5 meses. Las muestras congeladas deben descongelarse y mezclarse completamente antes de su uso. Evitar la congelación y descongelación repetida de las muestras.

### Preparación y conservación de los reactivos

Conservar los reactivos entre 2 y 8 °C después de abiertos. A esta temperatura cada componente es estable hasta la fecha de vencimiento del juego. La fecha de caducidad exacta se especifica en la etiqueta del estuche y en el certificado de calidad.

La solución concentrada de lavado debe diluirse con 1000 mL de agua destilada. Así diluida esta solución se conserva entre 2 y 8 °C hasta la fecha de vencimiento del juego.

Los calibradores y el suero control se reconstituyen con 1000  $\mu$ l de agua destilada. Para ello se debe mezclar suavemente evitando la formación de espuma. Permitir que la solución alcance la temperatura ambiente (20 a 30 °C) antes de su uso. Para usos posteriores, conservar congelados por debajo de -20 °C hasta la fecha de vencimiento.

#### ¡PRECAUCIÓN!

Permitir que todos los reactivos y muestras alcancen la temperatura ambiente (mín. 1 hora). Homogenizar completamente los reactivos y muestras antes de su uso, evitando la formación de espuma.

### Procedimiento para el ensayo

(Ver Tabla 1.)

- Rotular los tubos por duplicado para los totales (T), calibradores (S0-S5), suero control (C) y muestras (M).
- Añadir por duplicado 100  $\mu$ L de calibrador, suero control y muestras en los tubos apropiados.
- Añadir 200  $\mu$ L de trazador en cada tubo.
- Fijar la gradilla con los tubos de ensayo firmemente en el agitador horizontal. Cubrir los tubos con una lámina de polietileno. Encender el agitador y ajustar la velocidad de manera tal que el líquido en los tubos esté rotando o agitándose constantemente. Incubar los tubos 2 horas en el agitador a temperatura ambiente.
- Añadir 2 mL de solución de lavado a cada tubo. Aspirar o decantar el líquido de todos los tubos (excepto T) mediante la inversión de la gradilla. Colocar la gradilla sobre un papel absorbente por 2 minutos manteniendo la posición invertida.
- Repetir dos veces el procedimiento de lavado según el punto 5.
- Medir la radiactividad de cada tubo por 60 segundos en un contador gamma y calcular la concentración de insulina en las muestras como se describe a continuación.

Tabla 1. Protocolo del ensayo (volúmenes en microlitros)

	T	S0-S5	C	M
Calibrador		100		
Control			100	
Muestra				100
Trazador	200	200	200	200
Agitar 2 horas a temperatura ambiente				
Solución de lavado		2000	2000	2000
Decantar y secar en papel absorbente				
Solución de lavado		2000	2000	2000

Decantar y secar en papel absorbente				
Solución de lavado		2000	2000	2000
Decantar y secar en papel absorbente				
Medir la radiactividad (60 s/tubo)				
Procesar los datos				

### Cálculo de los resultados

En la Tabla 2 y la figura 1 se muestran a manera de ejemplo los cálculos y una curva estándar típica de un ensayo.

Para los cálculos:

Hallar la media de los conteos por minuto (cpm) para cada par de tubos. Restar de cada media el promedio de cpm obtenido para el calibrador de concentración cero (S0 = enlace no específico, NSB). Los valores así corregidos se dividen por la actividad total (T) como se muestra a continuación:

$$B/T (\%) = \frac{S1-5/Mx/(\text{cpm}) - S0(\text{cpm})}{T(\text{cpm})} \times 100$$

Construir una curva estándar plotando las medias de cpm o, alternativamente, los valores B/T% contra la concentración de insulina de cada calibrador en un papel log-log. Determinar la concentración de insulina en las muestras basándose en las respectivas medias de cpm o en los valores B/T%, por interpolación de la curva estándar. No extrapolar valores fuera del rango de la curva.

Para el procesamiento automatizado de los datos, recomendamos el uso del programa de ajuste tipo spline, desarrollado especialmente para el análisis inmunoradiométrico. Existen programas que interpolan los valores que se encuentran entre el calibrador de concentración cero y el primer calibrador. Entre las concentraciones así calculadas, solo aquellas mayores que el límite de detección del ensayo pueden considerarse como reales (ver sensibilidad).

Tabla 2. Datos típicos del ensayo

Tubos	Media cpm	B/T%	µIU/mL
T	381475		
S0	124	0	
S1	484	0,1	
S2	1650	0,4	
S3	8988	2,4	
S4	44294	11,6	
S5	169191	44,4	
C	6678		40,1

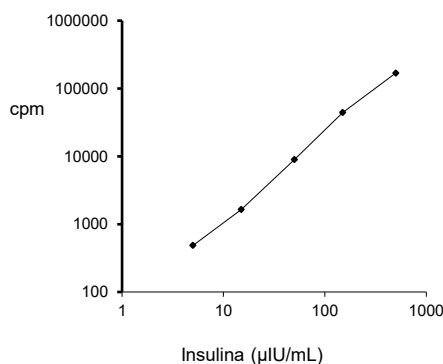


Figura 1.  
Ejemplo de curva estándar  
(¡No utilizar para calcular valores de las muestras!)

### Características del ensayo

#### Sensibilidad

Los Límites del Blanco (LoB), de Detección (LoD) y de Cuantificación (LoQ) fueron determinados según la guía del CLSI, documento EP17-A2.

LoB: 0,82 µIU/mL

LoD: 1,4 µIU/mL

LoQ: 1,8 µIU/mL

### Especificidad

La reacción cruzada con Proinsulina humana es menor que el 0,5% y no se observa reacción cruzada con Péptido-C hasta una concentración de 986 ng/mL.

Entre los fármacos análogos de la Insulina, no se observa reacción cruzada detectable con Degludec, Lispro, Glulisine, Aspart y Detemir. La reacción cruzada con Glargine es de 9,9%.

### Precisión

La precisión de un solo sitio se calculó utilizando cinco muestras a diferentes concentraciones de Insulina, de acuerdo con el documento EP05-A3 del CLSI. Las muestras se midieron en veinte días, con dos ensayos por día y utilizando dos réplicas por muestra.

Muestra	Media (µIU/mL)	Repetibilidad		Precisión intra-laboratorio	
		SD	CV%	SD	CV%
Pool 1	6,79	0,31	4,51	0,42	6,25
Pool 2	12,45	0,24	1,90	0,35	2,80
Pool 3	48,77	0,57	1,18	0,86	1,76
Pool 4	101,02	0,74	0,74	1,52	1,50
Pool 5	144,69	1,09	0,75	2,23	1,54

La precisión multi-sitio se calculó utilizando 5 muestras a diferentes concentraciones de Insulina, de acuerdo con el documento EP05-A3 del CLSI. Las muestras se midieron en tres sitios diferentes, en cada sitio se realizaron cinco corridas, una corrida por día y utilizando cinco réplicas por corrida.

Muestra	Media (µIU/mL)	Repetibilidad		Precisión intra-laboratorio		Reproducibilidad	
		SD	CV%	SD	CV%	SD	CV%
Pool 1	4,13	0,17	4,15	0,22	5,41	0,32	7,64
Pool 2	16,17	0,42	2,57	0,52	3,24	0,68	4,21
Pool 3	50,33	1,63	3,24	1,67	3,33	1,84	3,66
Pool 4	105,59	1,72	1,63	2,85	2,70	3,89	3,68
Pool 5	164,02	2,62	1,60	3,98	2,42	4,92	3,00

### Prueba de Recuperación

La recuperación se determinó como la diferencia porcentual entre el incremento observado y el incremento esperado, luego de añadir concentraciones conocidas a 3 niveles de insulina a 6 muestras de suero diferentes. La recuperación obtenida fue 95,1% ± 6,4% (media ± SD).

### Linealidad

La linealidad se evaluó de acuerdo con el documento EP06-A del CLSI, utilizando el método polinomial. El método resultó lineal desde 0,82 µIU/mL hasta 568,7 µIU/mL, con un margen de error del 10 % en este intervalo.

### Interferencias

No se observa interferencia hasta las siguientes concentraciones:

Bilirrubina	262 µmol/L
Triglicéridos	32,1 mmol/L
Hemoglobina	4,7 g/L
Factor Reumatoide	200 IU/mL
Biotina	100 ng/mL
Metformina	156 mg/dL
Ácido acetilsalicílico	3,0 mg/dL
Acido ascórbico	5,25 mg/dL
Diclofenaco	2,4 mg/dL
Ibuprofeno	21,9 mg/dL
Paracetamol	15,6 mg/dL

## Valores de referencia

Los valores presentados a continuación deben considerarse como informativos. Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios intervalos de referencia.

Se evaluaron 100 adultos en ayunas con valores normales de glucosa en sangre y 120 donantes de sangre presumiblemente saludables.

	Muestras	Mediana (μIU/mL)	Rango central 95% (μIU/mL)
Ayuna	100	5,15	1 – 30
Postprandial	120	14,15	3 - 67

## Conversión de las unidades de medida

1 ng/mL = 28,8 μIU/mL

1 μIU/mL = 6,0 pmol/L

## Limitaciones del procedimiento

- Los reactivos provistos en este juego están optimizados para la medición de insulina en suero.
- Las muestras hemolizadas, turbias o lipémicas pueden dar resultados falsos, evite su uso.
- Los resultados solo deben ser interpretados dentro del contexto clínico apropiado y nunca como prueba única e infalible de anomalía o enfermedad.
- No se observa efecto Hook con el uso del presente producto en concentraciones de insulina hasta 2500 μIU/mL. Para cualquier muestra con una concentración en el intervalo entre 500 - 2500 μIU/mL se obtendrán valores superiores a 500 μIU/mL.

## Notas acerca del procedimiento

- El no respeto de las instrucciones del presente inserto puede afectar los resultados significativamente.
- No se deben mezclar los componentes de lotes diferentes o con productos de otro fabricante.
- Para asegurar la agitación eficiente de los tubos se debe utilizar una gradilla que los ajuste firmemente. Una agitación inadecuada puede provocar un rendimiento deficiente del ensayo y falsos resultados.

## Precauciones

### Material radiactivo

Este producto contiene material radiactivo. Es responsabilidad de cada laboratorio cumplir con las regulaciones locales referentes a la manipulación, conservación y desecho de materiales radiactivos.

### Material potencialmente infeccioso

El suero humano utilizado en este producto ha sido analizado con métodos aprobados y no ha presentado positividad para anticuerpos frente a los virus de Inmunodeficiencia Humana (Anti-HIV-1/2) y Hepatitis-C (HCV), anticuerpos anti-Treponema y el antígeno de superficie de la Hepatitis-B (HBsAg). Ninguno de los métodos analíticos disponibles actualmente puede garantizar por completo la eliminación de posibles riesgos biológicos. Se deben manipular todos los reactivos y muestras de sangre como *material potencialmente infeccioso*.

Todos los productos y derivados de origen animal provienen de animales saludables. No obstante, los componentes que contienen suero animal deben considerarse como *material potencialmente infeccioso*.

### Peligro químico

Algunos componentes de este juego contienen azida sódica como preservativo. Al verter los desechos no radiactivos al sistema de desagüe se debe diluir con grandes cantidades de agua, para evitar la acumulación de azidas metálicas explosivas en las tuberías de plomo y cobre. Este producto contiene en total 68 mg de azida sódica.

**MSDS:** La hoja de datos de seguridad está disponible públicamente en el sitio web [www.izotop.hu/immunoassay](http://www.izotop.hu/immunoassay).

## Literatura

1: Sacks DB, Arnold M, Bakris GL, Bruns DE, Horvath AR, Lernmark Å, Metzger BE, Nathan DM, Kirkman MS. Guidelines and Recommendations for Laboratory Analysis in the Diagnosis and Management of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. 2023 Oct 1;46(10):e151-e199.

2: Carobene A, Lao EG, Simon M, Locatelli M, Coşkun A, Díaz-Garzón J, Fernandez-Calle P, Sandberg S, Aarsand AK. Biological variation of serum insulin: updated estimates from the European Biological Variation Study (EuBIVAS) and meta-analysis. *Clin Chem Lab Med*. 2022 Nov 25;60(4):518-522.

3: Nkuna DX, Khoza SP, George JA, Maphayi MR. The stability of C-peptide and insulin in plasma and serum samples under different storage conditions. *Clin Chem Lab Med*. 2023 Jul 7;61(12):2150-2158.

4: Knopp JL, Holder-Pearson L, Chase JG. Insulin Units and Conversion Factors: A Story of Truth, Boots, and Faster Half-Truths. *J Diabetes Sci Technol*. 2019 May;13(3):597-600.

5: William E. Owen, William L. Roberts. Cross-Reactivity of Three Recombinant Insulin Analogs with Five Commercial Insulin Immunoassays. *Clinical Chemistry* 50(1), 2004: 257-259.

6: Shen Y, Prinyawiwatkul W, Xu Z. Insulin: a review of analytical methods. *Analyst*. 2019 Jul 21;144(14):4139-4148.

7: Tohidi M, Arbab P, Ghasemi A. Assay-dependent variability of serum insulin concentrations: a comparison of eight assays. *Scand J Clin Lab Invest*. 2017 Apr;77(2):122-129.

8: Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline—Second Edition. CLSI document EP17-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.

9: Evaluation of Precision of Quantitative Measurement Procedures; Approved Guideline—Third Edition. CLSI document EP05-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2014.

10: Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach; Approved Guideline. CLSI document EP6-A. Wayne, PA; 2003.

11: Clinical and Laboratory Standards Institute. Interference Testing in Clinical Chemistry; Approved Guideline—Second Edition. CLSI document EP7-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA; 2005.



Fecha de vencimiento



Número de lote



Almacenar entre 2 y 8 °C



Suero Control



Precaución



Calibrador



Peligro biológico



Tubos recubiertos



Consulte las instrucciones



Trazador



Dispositivo para diagnóstico *in vitro*



Tampón de lavado



Fabricante



Material radiactivo

REF

Número de referencia



Número de determinaciones



Sitio WEB: <http://www.izotop.hu>

E-mail técnico: [immuno@izotop.hu](mailto:immuno@izotop.hu)

E-mail comercial: [commerce@izotop.hu](mailto:commerce@izotop.hu)

**IZOTOP**

INSTITUTE OF ISOTOPES Ltd.

1535 Budapest. Pf.: 851.

Tel.: (+36) 1-392-2577, Fax: (+36) 1-395-9247