

PÉPTIDO-C [I-125] IRMA KIT

RK-84CT. Estuche para 100 determinaciones

Ensayo inmunoradiométrico para la determinación cuantitativa *in vitro* del péptido-C en suero humano, en el rango de 0 – 30 ng/mL.

Introducción

El péptido-C (péptido conectivo) es un polipéptido de 3600 Da y 31 aminoácidos que se sintetiza en las células β 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 contrario de la insulina, el péptido-C no es extraído por el hígado, sino que pasa íntegramente a la circulación sanguínea. Por consecuencia, la medición del péptido-C es un método más exacto de estimar la secreción de insulina que la medición de la propia insulina.

Otra ventaja del péptido-C es que su determinación no se ve afectada por la presencia de autoanticuerpos anti-insulina, los cuales existen frecuentemente en los pacientes bajo tratamiento de insulina. Además es de gran utilidad para evaluar la actividad residual de las células de islotes para el diagnóstico y tratamiento de la diabetes mellitus.

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 radiyodo (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 3 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 péptido-C se prepara una curva de calibración a partir de la cual se determina por interpolación la concentración de péptido-C presente en las muestras.

Contenido del juego

1. TRAZADOR, 1 frasco con 21 mL, listo para usar, contiene < 740 kBq de anti-péptido-C marcado con ¹²⁵I y anti-péptido-C biotinilado en solución tampón con 0,1 % Na₂S₂O₃ y colorante rojo.
2. CALIBRADORES (S0-S5), 6 frascos con: 2,5 mL de suero bovino listo para usar (S0) y 0,5 mL de suero humano liofilizado (S1-S5) con 0,1% Na₂S₂O₃. Los calibradores contienen: 0, 0,25, 0,9, 3, 9 y 30 ng/mL, respectivamente y han sido calibrados contra el estándar de referencia WHO RP 84/510.
3. SUERO CONTROL, 1 frasco, contiene 0,5 mL de suero humano liofilizado con 0,1% Na₂S₂O₃.

La concentración del suero control está especificada 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 de solución concentrada. Diluir con 700 mL de agua destilada. Contiene 0,2 % Na₂S₂O₃.

Materiales y equipos necesarios

Gradilla para tubos de ensayo, pipetas de precisión con puntas desechables (20, 50, 200 y 1500 µL), agitador horizontal u orbital, lámina de polietileno, papel absorbente, contador gamma.

Materiales y equipos recomendados:

Pipetas de repetición (200 y 1500 µL). Jeringa automática (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 habrá de efectuarse dentro de las 24 horas siguientes, de lo contrario deben conservarse congeladas a una temperatura igual o menor que -20 °C. No conservar las muestras por más de 2 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

La solución concentrada de lavado debe diluirse con 700 mL de agua destilada. Así diluida esta solución se conserva entre 2 y 8 °C hasta la fecha de vencimiento del juego.

Los calibradores (S1-S5) y el suero control se reconstituyen con 0,5 mL 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 alicuotar y conservar por debajo de -20 °C hasta la fecha de vencimiento. No se debe exponer los calibradores y el control a más de 2 ciclos de congelación-descongelación!

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

PRECAUCIÓN!

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

Procedimiento para el ensayo

(Ver Tabla 1.)

1. Rotular los tubos recubiertos por duplicado para la actividad total (T), calibradores (S0-S5), suero control (C) y muestras (M).
2. Añadir por duplicado 50 µL de calibrador, suero control y muestras en los tubos apropiados.
3. Añadir 200 µL de trazador en cada tubo.

4. 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. Agitar 3 horas a temperatura ambiente..
5. Añadir 1,5 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.
6. Repetir dos veces el procedimiento de lavado según el punto 5.
7. Medir la radiactividad de cada tubo por 60 segundos en un contador gamma y calcular la concentración de péptido-C en las muestras como se describe a continuación.

Tabla 1. Protocolo del ensayo (volúmenes en microlitros)

	T	S0-S5	C	M
Calibrador		50		
Control			50	
Muestra				50
Trazador	200	200	200	200
Agitar 3 horas a temperatura ambiente				
Solución de lavado		1500	1500	1500
Decantar y secar en papel absorbente				
Solución de lavado		1500	1500	1500
Decantar y secar en papel absorbente				
Solución de lavado		1500	1500	1500
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:

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

Construir una curva estándar ploteando las medias de cpm o, alternativamente, los valores B/T% contra la concentración de péptido-C de cada calibrador en un papel log-log. Determinar la concentración de péptido-C 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. Resultados característicos del ensayo

Tubos	Conteos cpm	Media cpm	B/T%	ng/mL
T	273835 274213	274024		
S0	74 68	71	0,00	
S1	1363 1378	1370	0,47	
S2	4744 4815	4780	1,72	
S3	17158 18023	17591	6,39	
S4	50937 53632	52285	19,05	
S5	115771 118580	117176	42,74	
C	27956 26006	26981		4,5

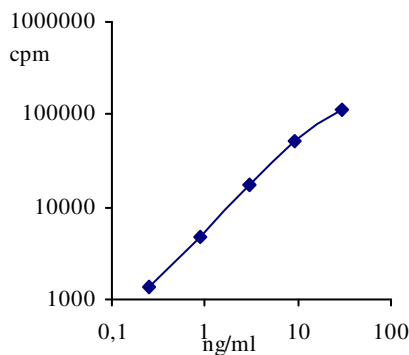


Figura 1.

Curva estándar típica (No utilizar para calcular concentraciones de las muestras!)

Características del ensayo

Las características del ensayo fueron determinadas bajo condiciones óptimas: trazador fresco y 3 lavados. Si se omite el tercer lavado solo se afecta la sensibilidad analítica del ensayo.

Parámetros típicos

NSB < 150 cpm
 B_{max}/T 31,7% - 38,7%

Sensibilidad

La sensibilidad analítica es de 0,0056 ng/mL (0,0186 con 2 lavados), calculada como la concentración correspondiente al valor de enlace medio más dos desviaciones estándar, para 20 réplicas del calibrador de concentración cero. La sensibilidad funcional es de 0,105 ng/mL, determinada por extrapolación del 20% del perfil de precisión inter-ensayo obtenido con la evaluación de muestras con baja concentración de péptido-C, en 10 series diferentes.

Especificidad

Los valores de reacción cruzada están estimados como el cociente de la masa de analito adicionado/péptido-C medido cuando ambas ocasionan igual desplazamiento.

Insulina humana	< 0,04 %
Proinsulina	27,1 %

Dado que la razón molar proinsulina/péptido-C en condiciones fisiológicas normales es del 5%, el error analítico que puede causar la reacción cruzada con la proinsulina es de 2 - 4%.

Precisión

La precisión intra-ensayo fue determinada a partir de 20 réplicas de 7 muestras, medidas en una serie. Para determinar la precisión inter-ensayo se midieron por duplicado 7 muestras, en 12 series independientes. Los valores obtenidos se muestran a continuación.

Intra-ensayo		Inter-ensayo	
Media (ng/mL)	CV %	Media (ng/mL)	CV %
0,52	4,87	0,52	3,31
1,55	2,12	1,41	4,65
2,33	5,03	3,03	4,07
3,81	3,56	3,10	5,88
5,64	2,09	4,36	2,28
7,57	5,09	6,57	3,25
23,46	4,04	11,96	3,96

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 péptido-C a 9 muestras de suero diferentes. La recuperación fue de $97,2\% \pm 8,5\%$ (media \pm SD).

Prueba de dilución (linealidad)

Se diluyeron serialmente 4 muestras con calibrador de concentración cero y se sometieron a ensayo. Se obtuvo la siguiente relación lineal entre los valores medidos (Y) y los valores esperados (X):

$$Y = 1,014X - 0,011 \quad R = 0,9973 \quad n = 16$$

Valores de referencia

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

	n	Media	SD	Mín	Max
Suero, ayunas	27	1,77	0,62	1,07	3,51
Suero, diario	71	4,88	2,6	1,37	11,8

(Valores en ng/mL)

Conversión de las unidades de medida

1 nmol/L = 3,617 ng/mL
 1 ng/mL = 0,276 nmol/L

Limitaciones del procedimiento

- Los reactivos provistos en este juego están optimizados para la medición del péptido-C en suero humano.
- Los resultados de este análisis deben ser utilizados conjuntamente a la información clínica pertinente.
- Las muestras hemolizadas, turbias o lipémicas pueden dar resultados falsos, evite su uso.
- No se observa efecto Hook con el uso del presente producto en concentraciones de péptido-C hasta 90 ng/mL. Para cualquier muestra con una concentración en el intervalo entre 30-90 ng/mL se obtendrán valores superiores a 30 ng/mL. Estas muestras deben ser diluidas con el calibrador de concentración cero y reanalizadas.

Notas acerca del procedimiento

1) **Fuente de error!** Los tubos recubiertos no están marcados individualmente. Se debe evitar la mezcla con tubos de ensayo comunes. Para minimizar este riesgo, no se deben sacar de la caja más tubos de los necesarios, de igual manera los tubos no utilizados en una serie deben ser guardados de nuevo en su caja. Se recomienda rotular los tubos con marcador permanente.

2) **Fuente de error!** 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.

3) **Dosificación de la solución de lavado.** Para la adición de la solución de lavado se recomienda una jeringa automática o dispensador, equipado con un recipiente de 1 litro y un tubo flexible para la dosificación. En su ausencia puede utilizarse una pipeta automática apropiada.

Atención! No mezclar los componentes de lotes diferentes o con productos de otro fabricante!

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*.

El suero bovino utilizado en este producto proviene de países donde no se ha reportado la encefalopatía esponjiforme. 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 preservante. 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 66 mg de azida sódica.

	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 <i>in vitro</i>		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
 E-mail comercial: commerce@izotop.hu

IZOTOP

INSTITUTE OF ISOTOPES Ltd.
 1535 Budapest. Pf.: 851.
 Tel.: (+36) 1-392-2577, Fax: (+36) 1-395-9247

Edición: Marzo/2020

