



# INSULINE

**pour analyses de routine**

**Détermination immunoenzymatique directe du niveau d'insuline dans le sérum ou le plasma.**

IVD



LOT

Voir étiquette externe



$\Sigma = 96$  déterminations

REF 39818

## UTILISATION PREVUE

Le kit Insuline est un dosage immunoenzymatique direct en phase solide pour la détermination quantitative de l'insuline dans le sérum ou le plasma humain.

## 1. SIGNIFICATION CLINIQUE

L'insuline humaine est une hormone polypeptidique qui régule le métabolisme des hydrates de carbone. En plus d'avoir comme rôle principal l'homéostasie des hydrates de carbone, elle a des effets sur le métabolisme des lipides et régule le relâchement des dépôts lipidiques du foie.

L'insuline est impliquée dans l'absorption du glucose dans le muscle et le tissu adipeux, dans l'augmentation de la réplication de l'ADN et dans la synthèse protéique, elle modifie l'activité de nombreuses enzymes (effet allostérique), favorise la synthèse du glycogène, des acides gras, l'absorption des aminoacides, inhibe la protéolyse, la lipolyse et la gluconéogenèse. Les cellules bêta relâchent l'insuline en fonction du glucose.

Les niveaux de glucose dans le sang varient d'environ 70 mg/dL à 110 mg/dL (3,9 - 6,1 mmol/L), sauf juste après un repas, quand le niveau de glucose dans le sang augmente temporairement. Cet effet homéostatique est le résultat de nombreux facteurs, dont la régulation de l'hormone est le plus important.

Il y a plusieurs pathologies dans lesquelles l'insuline est impliquée : diabète mellitus, insulinémie, syndrome métabolique et syndrome d'ovaires polycystiques. Il y a deux types de diabète mellitus : type 1 (dégradation auto-immunitaire de l'insuline produite par les cellules bêta du pancréas avec absence absolue d'insuline) et type 2 (syndrome multifactoriel dû à une prédisposition génétique et l'influence des facteurs environnementaux, par exemple obésité, âge et inactivité physique, avec en conséquence une résistance à l'insuline des cellules qui ont besoin d'insuline pour l'absorption du glucose).

Cette forme de diabète a une composante fortement héréditaire. Dans les deux cas, la production d'insuline doit être supportée par de l'insuline par voie pharmacologique administrée en intraveineuse.

La détermination quantitative des niveaux d'insuline dans le sang peut aider à déterminer les doses.

## 2. PRINCIPE DU TEST

Le TEST ELISA INSULINE est basé sur la capture simultanée de l'insuline humaine de la part de deux anticorps monoclonaux, un immobilisé dans la microplaque, l'autre conjugué avec la peroxydase (HRP).

Après une période d'incubation déterminée, la séparation libre-lié s'obtient à travers un simple lavage de la phase solide.

L'enzyme présente dans la partie liée catalyse la réaction entre le substrat ( $H_2O_2$ ) et le substrat TMB (TMB), en développant une coloration bleue qui vire au jaune après ajout de la Solution d'Arrêt ( $H_2SO_4$ ).

La concentration de l'insuline dans l'échantillon est calculée sur base d'une série standard.

L'intensité de la couleur développée est proportionnelle à la concentration d'insuline présente dans l'échantillon.

## 3. REACTIFS, MATERIELS ET EQUIPEMENT

### 3.1 Réactifs et matériaux fournis dans le kit

#### 1. Standards d'insuline 6x (1 flacon = 2 mL)

STD <sub>0</sub>	REF DCE002/7606-0
STD <sub>1</sub>	REF DCE002/7607-0
STD <sub>2</sub>	REF DCE002/7608-0
STD <sub>3</sub>	REF DCE002/7609-0
STD <sub>4</sub>	REF DCE002/7610-0
STD <sub>5</sub>	REF DCE002/7611-0

#### 2. Conjugué (1 flacon) 13 mL

Conjugué anti-monoclonal insuline-HRP

REF DCE002/7602-0

#### 3. Microplaque Recouverte (1 microl. fractionnable)

Anti-monoclonal insuline adsorbé sur la microplaque

REF DCE002/7603-0

#### 4. Substrat TMB

(1 flacon) 12 mL

REF DCE004-0

$H_2O_2$ -TMB 0,25gr/L (éviter le contact avec la peau)

#### 5. Solution d'Arrêt (1 flacon) 12 mL

REF DCE005-0

Acide sulfurique 0,15 mol/L (éviter le contact avec la peau).

#### 6. Solution de lavage conc. 50 x

(1 bouteille) 20 mL

NaCl 45g/L; Tween-20 55g/L REF DCE006-0

### 3.2 Réactifs nécessaires non fournis dans le kit

Eau distillée

### 3.3 Matériel et équipement auxiliaire

Distributeurs automatiques

Lecteurs pour microplaques (450 nm)

**Remarque :**

Conserver tous les réactifs entre +2 et +8°C à l'abri de la lumière.

Ouvrir le sachet du réactif 3 (Microplaque recouverte) uniquement après l'avoir porté à température ambiante et le refermer immédiatement après le prélèvement des bandes à utiliser.

#### 4. PRECAUTIONS

- Les composants du kit doivent être conservés entre 2 et 8°C et ne doivent pas être utilisés après la date de péremption.
- Éviter l'exposition du réactif TMB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à la lumière solaire directe, aux métaux ou aux oxydants.
- Les réactifs ouverts sont stables pendant 60 jours si conservés entre 2 et 8°C.
- Cette méthode permet la détermination quantitative d'insuline de 5 à 300 µIU/mL.

#### 5. PROCEDURE

##### 5.1 Préparation des Standard (S<sub>0</sub>, S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, S<sub>3</sub>, S<sub>4</sub>, S<sub>5</sub>)

Les standards ont approximativement les concentrations suivantes:

	S <sub>0</sub>	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>4</sub>	S <sub>5</sub>
µIU/ml	0	5	25	50	100	300

Une fois ouverts, les standards sont stables pendant au moins 60 jours à 2-8°C. Ils contiennent un conservant.

##### 5.2 Préparation de la Solution de Lavage

Diluer le contenu de la solution de lavage concentrée 50x dans 1000 mL d'eau distillée ou déionisée dans un récipient adapté à la conservation.

##### 5.3 Préparation de l'échantillon

Suivre les bonnes pratiques de laboratoire lors de l'utilisation de produits à base de sang.

Pour faire une comparaison soignée afin de déterminer les valeurs normales, il faudrait prélever des échantillons de sérum le matin à jeun.

Le sang devrait être recueilli dans un tube pour prélèvements sans additifs ou anti-coagulants.

Laisser le sang se coaguler. Centrifuger l'échantillon pour séparer le sérum de cellules.

Les échantillons devraient être réfrigérés à 2-8°C pendant un maximum de 5 jours. S'ils ne peuvent être dosés dans cette période, ils doivent être conservés à -20°C pendant maximum 30 jours. Éviter les cycles de congélation et décongélations répétées.

Les échantillons de patients avec des concentrations d'insuline au-dessus de 300 µIU/mL peuvent être dilués (par exemple 1/10 ou plus) avec le standard 0 et testés à nouveau. La concentration des échantillons s'obtient en multipliant le résultat par le facteur de dilution.

##### 5.4 Procédure

Porter tous les réactifs à température ambiante 22-28°C. Préparer les puits de la microplaque en double pour chacun des standards, contrôles et échantillon à tester.

Distribuer :

Réactifs	Standard	Echantillon	Blanc
Echantillon	---	50 µL	---

Standard S <sub>0</sub> -S <sub>5</sub>	50 µL	---	---
Conjugué	100 µL	100 µL	---
Incuber à température ambiante (22-28°C) durant 2 heures. Enlever le contenu de chaque puit et laver avec 300 µL de solution de lavage diluée. Répéter la procédure de lavage deux fois en éliminant complètement la solution de lavage.			
Substrat TMB	100 µL	100 µL	100 µL
Incuber à température ambiante (22-28°C) pendant 15 minutes à l'abri de la lumière.			
Solution d'Arrêt	100 µL	100 µL	100 µL
Lire l'absorbance (E) à 450 nm en mettant à zéro avec le blanc			

#### 6. CONTROLE QUALITE

Chaque laboratoire devrait tester les contrôles à valeurs basses, moyennes et hautes de la courbe de réponse standard pour suivre les performances du kit. Ces contrôles devraient être traités comme inconnus et les valeurs déterminées dans chaque procédure analytique effectuée. Des tableaux de contrôle de la qualité devraient être réalisés pour suivre les prestations des réactifs fournis. Des méthodes statistiques pertinentes devraient être utilisées pour en certifier les tendances. Des déviations significatives des prestations établies peuvent indiquer un changement non notifié des conditions expérimentales ou la péremption des réactifs du kit. Il faudrait utiliser des réactifs frais pour déterminer la cause des variations.

#### 7. LIMITATIONS DE LA PROCEDURE

##### 7.1 Performances de l'analyse

Ne pas utiliser d'échantillons microbiologiquement contaminés, ainsi que des échantillons fortement lipémiques ou hémolysés. Il est important que le temps de réaction de chaque micro-puit soit le même pour la reproductibilité des résultats. Le temps de distribution des micro-puits ne devrait pas être supérieur à 10 minutes. S'il se prolonge au-delà de 10 minutes, il est recommandé de suivre l'ordre de distribution. L'addition du substrat TMB fait démarrer une réaction cinétique, qui se termine avec l'ajout du substrat et de la solution d'arrêt. L'addition du substrat et de la solution d'arrêt doit avoir lieu dans la même séquence pour éliminer les différents temps de réaction. Les lecteurs de plaques mesurent la DO verticalement. Ne pas toucher le fond des micro-puits. L'aspiration non complète de la solution de lavage des micro-puits peut donner lieu à de mauvaises répliquations et à de faux résultats.

##### 7.2 Interprétation des résultats

Si on a utilisé l'ordinateur pour calculer les résultats, il est impératif que les valeurs des étalons tombent dans les 10 % des concentrations assignées.

## 8. RESULTATS

### 8.1 Remarques

La densité optique (D.O.) du standard 5 devrait être  $\geq 1,0$ . Les densités optiques (D.O.) de quelques étalons ou échantillons pourraient résulter supérieures à 3,0, dans ce cas, elles pourraient être hors du gamme de mesure du lecteur de microplaque. Il est donc nécessaire, pour des D.O. supérieures à 3,0, d'effectuer une lecture à 405 nm en plus de 450 nm et 620nm (filtre de référence pour la soustraction des interférences dues au plastique).

Pour lecteurs de microplaques non conçus pour lire la plaque à trois longueurs d'onde en même temps, il est conseillé de procéder de la façon suivante:

- Lire la microplaque à 450 nm et à 620 nm.
- Lire à nouveau la microplaque à 405 nm et à 620 nm.
- Trouver les puits dont les DO à 450 nm sont supérieures à 2,0
- Sélectionner les DO correspondantes lues à 405 nm et multiplier ces valeurs à 405 nm par le facteur de conversion 3,0 (où  $DO_{450}/DO_{405} = 3,0$ ), qui est:  $DO_{450\text{ nm}} = DO_{405\text{ nm}} \times 3,0$ .

Attention: Le facteur de conversion 3,0 est seulement suggéré. Pour une meilleure précision, l'utilisateur est invité à calculer le facteur de conversion spécifique pour son propre lecteur.

### 8.2. Extinction moyenne

Calculer l'extinction moyenne ( $E_m$ ) de chaque point de la courbe standard ( $S_0 - S_5$ ) et de chaque échantillon.

### 8.3 Courbe standard - Méthode automatique

Utiliser la smoothed cubic spline (suggérée) ou bien la fonction 4 paramètres logistic comme algorithme de calcul.

### 8.4 Courbe standard - Méthode manuelle

Une courbe de réponse est utilisée pour déterminer la concentration en insuline dans un échantillon inconnu.

Enregistrer les DO obtenues dans le tableau du lecteur de la microplaque conformément à l'exemple 1.

Faire le graphique des DO pour chaque standard dupliqué par rapport aux concentrations correspondantes d'insuline en  $\mu\text{IU/ml}$  sur papier ligné

Tracer la meilleure courbe qui s'approche des valeurs à travers les points dessinés.

Pour déterminer la concentration d'insuline pour un échantillon inconnu, localiser la DO moyenne des duplications des échantillons inconnus correspondants sur l'axe vertical du graphique, trouver le point d'intersection sur la courbe et lire la concentration (en  $\mu\text{IU/ml}$ ) sur l'axe horizontal du graphique (on peut trouver la moyenne des duplications de l'échantillon inconnu comme indiqué).

## 9. VALEURS DE REFERENCE

Les niveaux d'insuline sont beaucoup plus élevés dans le plasma que dans le sérum; il est donc préférable d'utiliser du sérum.

Les gammes assignés par le fabricant sont en accord avec les travaux publiés dans la littérature.

Ces gammes devraient être utilisés uniquement comme indication:

Enfants < 12 ans	< 10 $\mu\text{IU/mL}$
Adultes (Normaux)	0,7 – 9,0 $\mu\text{IU/mL}$
Diabétiques (Type II)	0,7 – 25 $\mu\text{IU/mL}$

## 10. PARAMETRES CARACTERISTIQUES

### 10.1 Précision

#### 10.1.1 Intra-test

La variabilité à l'intérieur du même kit a été déterminée en répliquant (16x) trois niveaux différents de sérum de contrôle. La variabilité intra-test est de 2%.

#### 1.1.2 Inter-Tests

La variabilité entre kits différents a été déterminée en répliquant trois niveaux différents de sérum de contrôle avec deux kits appartenant à des lots différents. La variabilité inter-tests est de 6%.

### 10.2 Spécificité

L'anticorps utilisé présente les réactions croisées suivantes, évaluées en ajoutant les substances interférentes. La réactivité croisée a été calculée en dérivant le rapport entre doses de substances interférentes sur dose d'insuline nécessaire pour obtenir la même absorbance :

Insuline	100%
Proinsuline	N.D.
C-Peptide	N.D.

### 10.3 Sensibilité

La concentration minimale d'insuline mesurable est 2  $\mu\text{IU/ml}$  avec une limite de confiance de 95%.

### 10.4 Corrélation

Le kit Insuline (Zenit) a été comparé avec un kit disponible dans le commerce. 9 échantillons de sérum ont été testés.

La courbe de régression obtenue est :

$$y = 1,1045x - 2,9851$$

$$r = 0,98 \quad (r^2 = 0,96)$$

## 11. DISPOSITIONS POUR L'ELIMINATION

Les réactifs doivent être éliminés en accord avec les lois locales.

## BIBLIOGRAPHIE

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

## SUGGESTIONS POUR LA RESOLUTION DES PROBLEMES /TROUBLESHOOTING

### ERREURS CAUSES POSSIBLES/SUGGESTIONS

#### Aucune réaction colorimétrique de l'échantillon

- absence distribution du conjugué
- contamination du conjugué et/ou du substrat
- erreurs dans l'exécution de l'échantillon (ex. Distribution accidentelle des réactifs en séquence erronée ou provenant de flacons erronés, etc.)

#### Réaction trop faible (DO trop basses)

- conjugué non adéquat (ex. ne provenant pas du kit original)
- temps d'incubation trop bref, température d'incubation trop basse

#### Réaction trop intense (DO trop hautes)

- conjugué non adéquat (ex. ne provenant pas du kit original)
- temps d'incubation trop long, température d'incubation trop élevée
- mauvaise qualité de l'eau utilisée pour la solution de lavage (faible degré de déionisation)
- lavages insuffisants (conjugué non complètement enlevé)

**Valeurs inexplicables hors échelle**

- contamination de pipette, embouts ou récipients- lavages insuffisants (conjugué pas complètement enlevé)
- CV% intra-test élevé

- réactifs et/ou strip non portés à température ambiante avant l'utilisation
  - le laveur pour microplaques ne lave pas correctement (suggestion: nettoyer la tête du laveur)
- CV% inter-test élevé
- conditions d'incubation non constantes (durée ou température)
  - contrôles et échantillons non distribués en même temps (avec les mêmes intervalles) (contrôler la séquence de distribution)
  - variabilité intrinsèque des opérateurs

Ed. 10/2009

**DE***Verwendete Symbole***EL***Επεξήγηση συμβόλων***EN***Explanation of symbols***ES***Explicación de los símbolos***FR***Explication des symboles***IT***Spiegazione dei simboli***PT***Significado dos símbolos*

	DE In-vitro-Diagnostikum EL In vitro διαγνωστική ιατρική συσκευή EN In vitro diagnostic medical device ES Para diagnóstico in vitro FR Dispositif médical de diagnostic in vitro IT Dispositivo di diagnostica in vitro PT Dispositivos médicos para diagnóstico in vitro		DE Hergestellt von EL Κατασκευαστής EN Manufacturer ES Fabricado por FR Fabriqué par IT Fabbrikante PT Produzido por
<b>REF</b>	DE Bestellnummer EL Αριθμός καταλόγου EN Catalogue number ES Número de catálogo FR Références du catalogue IT Numero di catalogo PT Número do catálogo	 yyyy-mm	DE Herstellungsdatum EL Ημερομηνία κατασκευής EN Date of manufacture ES Fecha de producción FR Date de fabrication IT Data di produzione PT Data de produção
 yyyy-mm-dd	DE Verwendbar bis (letzter Tag des Monats) EL Χρήση έως (η τελευταία ημέρα του μήνα) EN Use by (last day of the month) ES Fecha de caducidad (usar antes del último día del mes) FR Utiliser avant (dernier jour du mois indiqué) IT Utilizzare prima del (ultimo giorno del mese) PT Utilizar até (antes do último dia do mês)		DE Biogefährdung EL Βιολογικός κίνδυνος EN Biological risk ES Riesgo biológico FR Risque biologique IT Rischio biologico PT Risco biológico
	DE Gebrauchsanweisung beachten EL Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης EN Read instructions for use ES Consultar las instrucciones de uso FR Consulter le mode d'emploi IT Consultare le istruzioni per l'uso PT Consultar instruções para uso		DE Chargenbezeichnung EL Αριθμός παρτίδας EN Batch code ES Código de lote FR Numéro de lot IT Codice del lotto PT Lote
 Σ = xx	DE Ausreichend für "n" Tests EL Το περιεχόμενο επαρκεί για "n" δοκιμασίες EN Contents for "n" tests ES Contenido suficiente para "n" ensayos FR Contenu suffisant pour "n" tests IT Contenuto sufficiente per "n" saggi PT Conteúdo suficiente para "n" testes		DE Inhalt EL Περιεχόμενο του κιτ EN Contents of kit ES Contenido del kit FR Contenu du coffret IT Contenuto del kit PT Conteúdo do kit
 Max Min	DE Temperaturbereich EL Όρια θερμοκρασίας EN Temperature interval ES Temperatura de conservación FR Limites de température de conservation IT Limiti di temperatura PT Intervalo de temperatura		



**Manufacturer:**  
**DiaMetra S.r.l. Headquarter:**  
Via Garibaldi, 18  
20090 SEGRATE (MI)  
Tel. 0039-02-2139184 - 02-26921595  
Fax 0039-02-2133354.

**Manufacturing site:**  
Via Giustozzi 35/35a  
Z.I Paciana  
06034 FOLIGNO (PG) ITALY.  
Tel. 0039-0762-24864  
Fax 0039-0762-316197  
E-mail: info@diametra.com

**UK**  
**UNITED KINGDOM**  
*Distributed by*  
A. Menarini Diagnostics Ltd  
405 Wharfedale Road  
Winnersh - Wokingham  
Berkshire RG41 5RA

**DE**  
**DEUTSCHLAND**  
*Vertrieb durch*  
A. Menarini Diagnostics  
Eine Division der  
Berlin-Chemie AG  
Glienicke Weg 125  
12489 Berlin

**EL**  
**Διανέμεται στην**  
**ΕΛΛΑΔΑ από την**  
A. Menarini Diagnostics S.A.  
575, Vouliagmenis Ave.  
16451 Argroupolis  
Attiki

**ES**  
**ESPAÑA**  
*Distribuido por*  
A. Menarini Diagnostics S.A.  
Avenida del Maresme, 120  
08918 Badalona  
Barcelona

**FR**  
**FRANCE**  
*Distribué par*  
A. Menarini Diagnostics  
France S.A.R.L.  
3-5, Rue du Jura  
BP 70511  
94633 Rungis Cedex

**IT**  
**ITALIA**  
*Distribuito da*  
A. Menarini Diagnostics  
Via Lungo l'Enza, 7  
50012 Bagno a Ripoli  
Firenze

**PT**  
**PORTUGAL**  
*Distribuido por*  
A. Menarini Diagnósticos, Lda  
Quinta da Fonte  
Edifício D.Manuel I, 2ºB  
2770-203 Paço de Arcos