UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

**FACULTADES DE CIENCIAS QUÍMICAS,
INGENIERÍA Y MEDICINA**

PROGRAMA MULTIDISCIPLINARIO DE POSGRADO
EN CIENCIAS AMBIENTALES

EFECTO HIPOGLUCIMIANTE DE *OPUNTIA JOCONOSTLE* WEB. EN RATAS DIABÉTICAS

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS AMBIENTALES

PRESENTA:

BIÓL. RÚBIA CASSIANA PAIZ

DIRECTOR DE TESIS:
DRA. BERTHA IRENE JUÁREZ FLORES

COMITÉ TUTELAR:
DR. JUAN ANTONIO REYES AGÜERO
DRA. ERIKA GARCÍA CHÁVEZ

San Luís Potosí, S.L.P., México JULIO DE 2007

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

**FACULTADES DE CIENCIAS QUÍMICAS,
INGENIERÍA Y MEDICINA**

PROGRAMA MULTIDISCIPLINARIO DE POSGRADO
EN CIENCIAS AMBIENTALES

EFECTO HIPOGLUCIMIANTE DE *OPUNTIA JOCONOSTLE* WEB. EN RATAS DIABÉTICAS

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS AMBIENTALES

PRESENTA:

BIÓL. RÚBIA CASSIANA PAIZ

SINODALES:

PRESIDENTE:
DRA. BERTHA IRENE JUÁREZ FLORES _____
SECRETARIO:
DRA. ERIKA GARCÍA CHAVEZ _____
VOCAL:
DRA. LETICIA YÁÑEZ ESTRADA _____

San Luis Potosí, S.L.P., México

JULIO DE 2007

Proyecto realizado en:

Instituto de Investigación de Zonas Desérticas y Laboratorio de Medicina Nuclear de la Facultad de Medicina, ambos de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

Con financiamiento de:

FAI – Fondo de apoyo a la investigación (C07-FAI-04-8.10).

La maestría en Ciencias Ambientales recibe apoyo a través del Programa de Fortalecimiento al Posgrado Nacional (PIFOP-SEP).

Este trabajo elaborado con amplio sentido de responsabilidad y gran cariño, llega en este momento a tus manos, representando un paso adelante en mi vida. Simboliza un gran triunfo con nuevos ideales, nuevos deseos y nuevos esfuerzos.

Con gratitud y todo mi amor a mis padres

Ivo Paiz y Salete Colla Paiz por brindarme siempre su apoyo y cariño, mismo de lejos.

A mí querido novio

Alexandre Santos Sanches por estar a mi lado, por su gran ayuda, cariño y sobre todo por la oportunidad de llegar hasta aquí y por hacer de mí la mujer que soy.

Obrigada meu amor, por tudo.

A mí directora de tesis

Dra. Bertha Irene Juárez Flores por su atención, valiosa enseñaza, motivación, consejos que han repercutido firmemente en mí vida y sobre todo por su amistad. Muchas gracias Doctora por todo, su tiempo, su atención, su compañía.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por darme fuerzas necesarias para salir adelante.

A la Universidad de San Luis Potosí, especialmente al Programa Multidisciplinario en Ciencias Ambientales por brindarme la oportunidad de desarrollarme profesionalmente.

Al Dr. Juan Rogelio Aguirre Rivera, por apoyarme incondicionalmente a pesar de las circunstancias, por creer en mí y por sus aportaciones que hizo posible llegar a la culminación de éste trabajo.

A la Dra. Erika García Chávez por su amabilidad, disposición y por fomentar la investigación en mí persona.

Al Dr. Juan Antonio Reyes Agüero por su valiosa colaboración y atención que hicieron posible la realización de este trabajo.

A M. en C. Lucia Gabriela García Pedraza por enseñarme y por su disponibilidad en facilitarme su material.

A Dra. Norma Cárdenas y a la Q. F. B. Flor Alejandra del Laboratorio Altaír por su gran ayuda con los análisis bioquímicos. Gracias.

Al Dr. Ramón Fernando García de la Cruz del laboratorio de Bioquímica de la UASLP por el préstamo del liofilizador.

Al Dr. Gregorio Álvarez Fuentes por ayudarme con la estadística.

A Dra. Yolanda Jasso por su gran ayuda técnica y por escucharme siempre...gracias.

A todos los profesores del Instituto de Investigación de Zonas Desérticas que amablemente me apoyaron.

Al personal administrativo del Instituto de Investigación de Zonas Desérticas por todo el apoyo y la atención otorgada durante mi estancia.

A todos mis amigos y compañeros de cubículo Haideé, Margarita, Don Guillermo, Juan Antonio, Juan Magdaleno, Christian, Jessica por los momentos inolvidables que hemos compartido, gracias por su ayuda, por las risas, por las bromas.

A M. Guadalupe Barcenas gracias por su ayuda y disponibilidad.

A la comunidad brasileña que vive y trabaja en San Luis Potosí, que de una forma o de otra me ayudaron a continuar en este posgrado y salir adelante.

A todas aquellas personas que fueron parte de esta gran aventura científica.

Índice de contenido

Página

Índice de cuadros..... vi

Índice de figuras..... vii

Resumen..... 1

1. Introducción..... 2

1.1. Antecedentes..... 4

1.1.1. Tratamiento de la DM..... 6

1.1.2. Tratamiento alternativos..... 7

1.1.3. Especies de Opuntia usadas como tratamiento de la DM..... 9

1.1.3.1. *O. ficus- indica* Mill..... 10

1.1.3.2. *O. fuliginosa* Griffiths..... 10

1.1.3.3. *O. lindheimeri* Englem..... 10

1.1.3.4. *O. megacantha* However..... 11

1.1.3.5. *O. robusta* H.L. Wendland..... 11

1.1.3.6 *O. streptacantha* Lemaire..... 12

1.1.3.7. O. joconostle Web..... 13

1.2. Justificación..... 15

1.3. Hipótesis..... 17

1.4. Objetivos..... 17

1.4.1. Objetivo General..... 17

1.4.2. Objetivos específicos..... 17

2. Materiales y métodos..... 18

2.1. Material vegetal..... 18

2.2. Preparación de los extractos..... 18

2.3. Animales..... 18

2.4. Inducción experimental de la diabetes..... 19

2.5. Elección de la dosis..... 20

2.6. Diseño experimental, evaluación de tratamientos y análisis

estadístico..... 21
2.7. Parámetros bioquímicos..... 22
2.7.1. Glucosa..... 22
2.7.2. Colesterol total..... 23
2.7.3. Lipoproteínas de alta densidad (HDL)..... 23
2.7.4. Triglicéridos..... 24
2.7.5. Hemoglobina glucosilada A1c..... 24
2.7.6. Péptido C..... 24
3. Resultados y Discusión..... 26
4. Conclusiones..... 40
5. Bibliografía..... 41
Anexo 1..... 52

Índice de cuadros

Página

Cuadro 1. Concentración media de glucosa en la sangre (mg/dL) en ratas sanas suplementadas con agua (A), fruto (F), cladodio (C) y mezcla equitativa de fruto y cladodio (M) de *O. joconostle*.....27

Cuadro 2. Concentración media de glucosa en sangre (mg/dL) en ratas diabéticas suplementadas con agua (A), fruto (F), cladodio (C) y mezcla equitativa de fruto y cladodio (M) de *O. joconostle*.....27

Cuadro 3. Cuadrados medios y resultados de su prueba de F para la concentración (mg/mL) de compuestos en sangre de ratas diabéticas y sanas suplementadas con agua y con fruto, cladodio y mezcla de fruto y cladodio de *O. joconostle*.....28

Índice de figuras

Página

Figura 1. Efecto de la suplementación con agua (A) y con fruto (F), cladodio (C) y mezcla equitativa de fruto y cladodio (M) de *O. joconostle* sobre la concentración de glucosa sérica de ratas diabéticas y de sanas……..30

Figura 2. Efecto de la suplementación con agua (A) y con fruto (F), cladodio (C) y mezcla equitativa de fruto y cladodio (M) de *O. joconostle* en la concentración sérica de triglicéridos de ratas diabéticas y de sanas……32

Figura 3. Efecto de la suplementación con agua (A) y con fruto (F), cladodio (C) y mezcla equitativa de fruto y cladodio (M) de *O. joconostle* sobre la concentración de colesterol total sérico de ratas diabéticas y de sanas……33

Figura 4. Efecto de la suplementación con agua (A) y con fruto (F), cladodio (C) y mezcla equitativa de fruto y cladodio (M) de *O. joconostle* en la concentración de HDL sérico de ratas diabéticas y de sanas……34

Figura 5. Efecto de la suplementación con agua (A), y con fruto (F), cladodio(C) y mezcla equitativa de fruto y cladodio (M) de *O. joconostle* sobre la concentración de hemoglobina glucosilada (HbA1c) de ratas diabéticas y de sanas……36

Figura 6. Efecto de las suplementación con agua (A) y con fruto (F), cladodio (C) y mezcla equitativa de fruto y cladodio (M) de *O. joconostle* en la concentración de péptido-C en sangre de ratas diabéticas y en sanas……37

Figura 7. Ganancia relativa de peso corporal ([peso final - peso inicial]*100/peso inicial) de ratas diabéticas y sanas suplementadas durante 12 semanas con (100 mg /kg) fruto (F), cladodio(C) y mezcla equitativa de fruto y cladodio (M) de *O. joconostle*……39

Resumen

El efecto antidiabético atribuido tradicionalmente al fruto, cladodio y mezcla de fruto y cladodio de *O. joconostle* Web., fue evaluado experimentalmente en ratas macho (Wistar) con diabetes inducida por administración ip de estreptozotocina (40 mg/kg peso corporal). Cuatros suplementos fueron proporcionados a seis unidades experimentales diabéticas y seis sanas: agua fruto, cladodio y mezcla equitativa de fruto y cladodio. La dosis definida a través de un experimento preliminar (relación dosis reacción) fue de 100 mg/kg de peso corporal del extracto acuoso liofilizado, administrada a las ratas por vía oral con cánula esofágica al inicio del periodo de oscuridad, durante 12 semanas. La concentración de colesterol y HDL en el suero fue estadísticamente igual en los animales diabéticos y los sanos. Se produjo una reducción en la concentración de glucosa en la sangre ($p<0.001$) en las ratas sanas y diabéticas que recibieron los tres suplementos de *O. joconostle*, aunque fue más notable con el fruto (72%). Los triglicéridos solo disminuyeron ($p<0.001$) en las ratas sanas. La hemoglobina glucosilada A1c disminuyó en las ratas diabéticas suplementadas con fruto y con fruto y cladodio ($p<0.05$) y en las sanas con fruto, cladodio y mezcla de ambos ($p<0.01$); con el fruto, el péptido-C se redujo en las ratas diabéticas ($p<0.01$), con la mezcla de fruto y cladodio en las diabéticas y con fruto y cladodio en las sanas ($p<0.05$). Los resultados muestran que *O. joconostle* posee efecto hipoglucemiante e hipolipidémico en ratas sanas y con diabetes inducida, por lo que su consumo a largo plazo, podría en los humanos ayudar a prevenir y controlar las complicaciones características de la DM2.

Palabras clave: *Opuntia joconostle* Web., diabetes, hipoglucemiante, xoconostle.

1. Introducción

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad relacionada con anormalidades en la homeostasis de la glucosa, y se caracteriza por alteraciones visuales, renales y cardiacas, así como circulatorias y digestivas que llevan al individuo a presentar incapacidades de manera permanente e incluso la muerte (Starr y Mcmillan, 2007). De acuerdo con la diversidad patológica que puede provocar esta enfermedad, se ha considerado como uno de los principales problemas de salud pública mundial. En 2000 se registraron alrededor de 171 millones de personas diabéticas, y se estima que este número se incrementará a 366 millones para 2030 (Wild *et al.,* 2004). En México, la DM es la segunda causa de muerte y la primera de las enfermedades crónico degenerativas (Zárate y Ramírez, 2007). De acuerdo a la Norma Oficial Mexicana (Anónimo, 1994), se han caracterizado varios tipos de DM, pero los más comunes son la DM tipo 1 (DM1) y la DM tipo 2 (DM2), de ambas, el segundo es el más frecuente (90%), y se le asocia regularmente con la obesidad (Martínez-Valls y Sanahuja-Santafé, 2002).

Existe una amplia variedad de estrategias terapéuticas para controlar adecuadamente esta enfermedad en etapas tempranas, por ejemplo, las modificaciones en alimentación, el ejercicio y la ingestión de hipoglucemiantes orales son las más empleadas. Sin embargo, el escenario es diferente cuando la enfermedad está en su fase degenerativa, pues los tratamientos son costosos y por lo tanto fuera del alcance de la mayoría de la población. Por ello, se ha incrementado el uso de la medicina tradicional, particularmente en países poco desarrollados pero con fuerte cultura. La Organización Mundial de la Salud reconoce la utilización de productos naturales como tratamientos efectivos y económicos contra la DM (Castillo, 2002). Sin embargo, el mal uso de esta alternativa terapéutica, puede generar alteraciones aun más graves y por ello, es urgente evaluar experimentalmente los beneficios y los riesgos de estas terapias.

Es muy común en México el uso de cactáceas como remedio alternativo contra la diabetes; así, se suele consumir en ayunas un licuado de nopal (*Opuntia* spp.) preparado con el fruto, el cladodio o con la mezcla de ambos (Ibáñez-Camacho y Merckes-Lozoya, 1979; Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991). Entre las especies más utilizadas al respecto destacan los nopales silvestres *O. leucotricha* y *O. streptacantha*, *O. ficus-indica* y *O. matudae* comercialmente cultivados en el estado de México. Las propiedades medicinales de *Opuntia* para el tratamiento de la DM han motivado diversas investigaciones con el propósito de valorar su uso tradicional. En este género destaca O. *joconostle,* que a pesar de ser una de las más utilizadas por sus propiedades antidiabéticas, los estudios clínicos y preclínicos que comprueben tal efecto son escasos, así el objetivo general de esta investigación fue verificar el efecto hipoglucemiante atribuido tradicionalmente a los frutos, cladodios y mezcla de fruto y cladodios de *O. joconostle* Web, para lo cual se administró el extracto acuoso liofilizado a ratas machos de la cepa Wistar con diabetes inducida experimentalmente con estreptozotocina (STZ).

1.1. Antecedentes

La DM es una enfermedad sistémica, crónica degenerativa, de carácter heterogéneo, con grados variables de predisposición hereditaria, y relacionada con diversos factores ambientales, la cual se caracteriza por hiperglucemia crónica, debida a la deficiencia en la producción o acción de la insulina, y alteración del metabolismo intermedio de los carbohidratos, proteínas y lípidos (Anónimo, 1994).

En el metabolismo de carbohidratos, la insulina es la responsable de activar mecanismos celulares que permiten el ingreso de la glucosa circulante, la cual, es considerada como la principal fuente de energía en la célula. Por ello la deficiencia en la secreción, en la cantidad o en la efectividad de la insulina puede generar alteraciones metabólicas graves. Estas características fundamentan la distinción de la DM en dos clases principales: la DM 1 y la DM 2.

La DM1 se caracteriza por una ausencia total de la secreción de insulina, como consecuencia de la destrucción de las células β o células de Langerhans de los islotes pancreáticos. Los enfermos que padecen DM1 son insulinadependientes; es decir, necesitan de la administración exógena de insulina para preservar la vida. La ausencia o deficiencia del tratamiento, aunada a la deficiencia de esta hormona y el exceso de glucagon, favorece la cetogénesis caracterizada por la síntesis de cuerpos cetónicos responsables de generar cetonemia y acidosis (Martínez-Valls y Sanahuja-Santafé, 2002).

La causa de la DM2 es la resistencia periférica a los efectos biológicos de la insulina sobre los receptores celulares (efecto conocido como insulinoresistencia), o la falta de reacción secretoria de las células β al estímulo de la glucosa sanguínea, lo cual provoca una reducción del número de receptores insulínicos en la membrana celular. Estas deficiencias conducen a una excesiva producción de glucosa en el hígado y a dificultades de su captación por el músculo y por los adipositos (Martínez-Valls y

Sanahuja-Santafé, 2002). La DM2 es considerada la más común e importante, con una frecuencia del 90% de los casos de DM diagnosticados y se desarrolla usualmente en edad adulta. La incidencia de la DM2 ha aumentado progresivamente en los últimos años; este incremento se debe al envejecimiento de las poblaciones y a la falta de detección temprana de la enfermedad. La evolución de la DM2 es lenta y se relaciona con la obesidad (90%), con depósito de grasa abdominal (Martínez-Valls y Sanahuja-Santafé, 2002), con las enfermedades cardiovasculares (Varela-Moreira y Silvestre-Castelló, 2002), así como con alteraciones en la funcionalidad del páncreas. Cuando el páncreas produce poca insulina o la célula no es capaz de reconocerla, se genera un exceso de glucosa en la sangre que provoca daño a las venas y ciertos órganos. Como consecuencia de los trastornos metabólicos, el paciente diabético suele presentar polifagia, poliuria, polidipsia, somnolencia, cansancio, visión borrosa, mareos e insomnio; y en casos crónicos sufre pérdida de peso, insuficiencia renal, pérdida de la visión, arterosclerosis, problemas circulatorios, gangrena y pérdida de miembros inferiores, lo cual conduce al paciente a un estado incapacitante, estado de coma e incluso la muerte (Pérez-Vargas *et al.*, 2006).

La DM está asociada a diversos factores de riesgo, como alimentación con alto contenido energético y de grasas saturadas, alcoholismo, hipertensión, sedentarismo, estrés y tabaquismo. La prevalencia de tales factores ocurre en el estilo de vida de la sociedad actual, pero también contribuye al escaso apoyo institucional, la atención médica tardía y sin calidad, la inadecuada nutrición, el elevado costo de los medicamentos y las deficiencias de los programas de medicina preventiva. El incremento de la población con DM es un problema de salud pública, pero también representa un problema que repercute en todas las esferas sociales y económicas de la población.

De acuerdo con la investigación de Hernández-Ávila y Olaíz-Fernández (2002), el mismo número de muertes debidas a DM aumentó más de treinta veces en los últimos 50 años. Se desconocen los costos exactos

relacionados con el tratamiento de esta enfermedad, así como por la incapacidad que ocasiona, se puede suponer que el tratamiento de esta enfermedad en México, proporcionado por los servicios de salud pública, es insuficiente por ser muy costoso.

1.1.1. Tratamiento de la DM

El tratamiento farmacológico intensivo y adecuado de este síndrome metabólico pretende controlar sus manifestaciones clínicas y prevenir sus complicaciones crónicas, por lo que incluye las recomendaciones de que el paciente lleve una alimentación balanceada, realice ejercicio cuando menos por 30 minutos diariamente y controle su peso corporal (Hernández-Ávila y Olaíz Fernández, 2002). El ejercicio aumenta el transporte de glucosa a los músculos sin que intervenga la insulina, con lo cual se mejora el cuadro diabético.

Desafortunadamente, muchos pacientes no logran alcanzar las metas de las recomendaciones complementarias, por lo que se requiere la administración de medicamentos como sulfonilureas, biguanidinas (hipoglucemiantes orales), insulina o combinaciones de ellos (Anónimo, 1994). En ocasiones los antidiabéticos orales sólo logran revertir parcialmente la hiperglucemia, son costosos e inducen efectos indeseables (ganancia adicional de peso); por ello el paciente diabético llega a considerar la utilización de insulina exógena. Sin embargo, el tratamiento con esta hormona anabólica puede incrementar la ganancia de peso y gradualmente provoca resistencia a sus efectos y aumento en sus requerimientos exógenos (Strowski, *et al*. 2004).

La insulina reduce la hiperglucemia al actuar sobre el receptor de la misma, una proteína que se expresa en las membranas plasmáticas de los hepatocitos, adipositos y células musculares. La unión ligamento-receptor en las subunidades α induce la transducción de señales, estimula la fosforilación y la actividad de la tirosina-cinasa en las subunidades β del

receptor, lo cual es indispensable para que la insulina provoque reacción en sus tejidos blanco y se lleve acabo la incorporación de la glucosa sanguínea a las células. La resistencia a la insulina observada en la DM2 se debe a que por fallas en este sistema, la glucosa no puede difundir hacia el interior de las células, lo cual provoca que se acumule en el plasma. La insensibilidad de los tejidos a la presencia de la insulina es acompañada de hiperinsulinemia (hipersecreción compensadora de insulina). Estos estados favorecen la hipertensión diastólica, la actividad simpática, la obesidad, y la arteriosclerosis, y alteran la concentración de los lípidos plasmáticos (reducción de HDL e incremento de LDL y triglicéridos) y la coagulación (Campillo, 2001); por ello se les denomina "síndrome de resistencia a la insulina".

Aunque la prevalencia de la DM2 se ha incrementado considerablemente, aún se carece de tratamientos efectivos contra esta enfermedad. La alta incidencia de este síndrome ha provocado un gran número de estudios relacionados con su prevención y la búsqueda de tratamientos alternativos.

1.1.2. Tratamiento alternativos

A pesar de que existe una importante investigación de plantas con actividad hipoglucemiante, así como la caracterización de compuestos posiblemente responsables del efecto como alcaloides, glucósidos, terpenos, flavonóides, etc. (Marles y Farnsworth, 1995); no se cuenta con elementos suficientes para llegar del conocimiento tradicional a la clínica. En este contexto es importante recordar que fármacos modernos como la metformina (una biguanidina) es derivado de un producto natural (galegina), una guanidina aislada de *Galega officinalis* L. (Andrade-Cetto y Heinrich, 2005). Los compuestos naturales empleados en el tratamiento de la DM son, de mayor a menor importancia, polisacáridos, péptidos, aminas y esteroides, además de los ya citados; pero para utilizarlos como coadyuvante en el

control de la DM hay que tener en cuenta las premisas de que sean útiles principalmente en pacientes con DM2 con concentraciones de glucosa sanguínea estables y que deben ser utilizados bajo estricto control médico (Castillo, 2002).

Sin embargo, desde una perspectiva etnofarmacológica, en el control de la DM se puede utilizar el tratamiento médico convencional simultáneo con la medicina tradicional. En efecto, en México existen pocos datos disponibles, pero prácticamente la mayoría de los pacientes diabéticos podrían estar usando plantas como alternativa terapéutica, además del tratamiento farmacológico convencional.

Las limitaciones señaladas para el tratamiento farmacológico, explican por que el uso de productos naturales es cada vez más frecuente, particularmente de aquellos que se ha demostrado que logran reducir las concentraciones de glucosa en la sangre de pacientes con DM. Los productos naturales de uso general en México tienen a menudo una historia larga de uso tradicional; en particular se estima que aproximadamente 500 especies vegetales son utilizadas en México para el tratamiento de la DM2. De estas especies las familias mejor representadas son las asteráceas (47), fabáceas (27), cactáceas (16), solanáceas y euforbiáceas (10) y lamináceas (9) (Andrade-Cetto y Heinrich, 2005).

Dentro de las cactáceas, los géneros *Opuntia* y *Lophocereus* son los que cuentan con mayor número de estudios publicados que respaldan su uso tradicional como antidiabético, para ello se consumen en sus jugos extraídos de tallos machacados crudos en agua, extractos acuosos, infusiones o licuados de cladodios tiernos (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991).

El género *Opuntia* es una de las cactáceas con más amplia distribución; se desarrollan principalmente en zonas con temperaturas extremas y periodos secos prolongados (González *et al.*, 2001). Las especies de este género pueden presentar tres tipos de frutos: la tuna, con pulpa abundante, dulce y con cáscara delgada, característica de *O. ficus-*

indica; el xoconostle, con pulpa escasa y cáscara gruesa, suculenta, sabor ácido y agradable, característico de *O. joconostle*; y los frutos secos, que no producen pulpa ni cáscara suculenta, característicos de *O. basilares* (Garcia *et al*, 2005).

Los códices de de la Cruz-Badiano, Florentino y Mendocino muestran la importancia de las cactáceas en la vida de los indígenas mexicanos, como alimento y medicina. Actualmente, el aprovechamiento de las diversas especies de esta familia es variado, ya que se usan como medicinales, alimento, forraje o como ornato por sus extrañas formas y hermosas flores. Su aprovechamiento se inició con los grupos que luego crearon las grandes civilizaciones mesoamericanas, quienes recolectaban partes reproductivas y vegetativas (Arias, 1997). Se ha demostrado que el nopal, aparte de sus cualidades nutricionales e hipoglucemiantes, también posee propiedades medicinales que ayudan a controlar diferentes desórdenes fisiológicos, como la obesidad, hipercolesterolemia, arteriosclerosis, úlceras gástricas, problemas digestivos y limpieza del colon. También es usado en forma de cataplasmas para golpes, contusiones, hinchazones, quemaduras; analgésico, diurético y antiespasmódico (Bravo-Hollis, 1978). Así, el género *Opuntia* se ha convertido en un recurso inagotable de productos y usos, inicialmente como planta silvestre, y después, como cultivo de subsistencia y comercial; contribuyendo a la seguridad alimenticia de poblaciones en áreas agrícolas marginadas (Reynolds y Arias, 2001).

1.1.3. Especies de *Opuntia* usadas como tratamiento de la DM

Las especies de *Opuntia* comúnmente usadas en México para el tratamiento de la DM2, con estudios clínicos o farmacológicos, que respaldan este uso, son: *O. ficus-indica, O. lindheimeri*, *O. megacantha*, *O. robusta*, *O. streptacantha* y *O. fuliginosa* (Hernández-Ávila y Olaíz-

Fernández, 2002). En dichos estudios se utilizaron diferentes dosis y preparados de frutos o cladodios en modelos animales y en pacientes.

1.1.3.1. *O. ficus- indica Mill.*

Frati-Munari *et al.* (1989 y 1992) a través de un estudio clínico en pacientes diabéticos y en sanos, administraron por vía oral cápsulas comerciales del fruto seco diariamente, durante una semana; los resultados mostraron una discreta disminución en los niveles de glucosa sérica, triglicéridos y colesterol. En un estudio pre-clínico en ratones con diabetes inducida experimentalmente con aloxana, se administró polisacáridos (sin caracterización química) aislados de los cladodios de *O. ficus-indica* (POLOF) y O. *streptacantha* (POLOS), a una dosis de 500 mg/kg; los resultados demostraron una reducción significativa en la concentración de glucosa en sangre a los 180 min de su administración (Alarcón-Aguilar *et al.*, 2003).

1.1.3.2. *O. fuliginosa* Griffiths

La actividad hipoglucemiante del extracto purificado del fruto de esta especie fue evaluada en ratas con diabetes inducida experimentalmente con STZ. El extracto se les administró en una dosis de 1 mg/kg durante siete semanas y se observó que las concentraciones de glucosa sérica y de hemoglobina glucosilada disminuyeron a la amplitud normal. Estos resultados demuestran la importancia de incluir fibra alimentaria para prevenir la DM (Trejo-González *et al.*, 1996).

1.1.3.3. *O. lindheimeri* Englem.

La actividad hipoglucemiante de este nopal fue evaluada en cerdos sanos y con diabetes inducida con STZ. Se les administró por vía oral (0,

250 y 500 mg de extracto/kg peso corporal del extracto). En los cerdos normales las concentraciones de glucosa sanguínea se mantuvieron alrededor de los valores basales, mientras que los cerdos diabéticos presentaron una disminución significativa ($p < 0.001$) con ambas dosis, con un efecto máximo a las cuatro horas después de su administración (Laurenz *et al.,*2003).

1.1.3.4. *O. megacantha* However

En los estudios realizados por Bwititi *et al*. (2000 y 2001) con ratas macho sanas y con diabetes inducida por STZ (60 mg/kg), se administró durante cinco semanas un extracto etanólico preparado con cladodios de esta especie (20 mg/100g de peso corporal), los resultados mostraron un importante efecto hipoglucemiante. Además, estos autores observaron un efecto protector de la función renal, ya que se observó un incremento de la concentración de creatinina y urea en el plasma de las ratas diabéticas y sanas, y una disminución en la concentración de sodio (Na+) en la orina después de 24 h, de la última administración.

1.1.3.5. *O. robusta* H.L. Wendland

La costumbre de incorporar regularmente nopales de esta especie en la alimentación de la población, probablemente reduce significativamente el daño oxidativo *in vivo;* esto se demostró en pacientes con antecedentes familiares de hipercolesterolemia, en quienes también se registraron beneficios cardiovasculares (Budinsky *et al*., 2001).

La pulpa fresca del fruto de *O. robusta* se administró durante 8 semanas por vía oral a 24 varones sin diabetes ni obesidad, 12 de ellos con hiperlipedemia, y los otros 12 con hipercolesterolemia, disminuyó en ambos grupos la concentración en sangre de LDL (15%), colesterol total (12%),

triglicéridos (12%), glucosa (11%), insulina (11%), fibrinógeno (11%), ácido úrico (10%) y apoliproteína B (9%) (Wolfran *et al.*, 2002).

1.1.3.6 *O. streptacantha* Lemaire

El efecto de *O. streptacantha* (nopal cardón) como tratamiento alternativo para la DM fue comprobado mediante estudios en conejos normales con hiperglucemia inducida farmacológicamente y/o pancreaectomizados. Se les administró por vía oral, diferentes suplementos derivados de cladodios (nopal licuado, jugo de nopal licuado, mucilago fresca de nopal, mucilago de nopal dializada y liofilizada, y fracción semipurificada del jugo) (Ibáñez-Camacho y Román-Ramos, 1979; Ibáñez-Camacho y Meckes-Lozoya, 1983; Meckes-Lozoya e Ibáñez-Camacho, 1989).

En otra valoración de la actividad hipoglucemiante de *O. streptacantha* se administró en una dosis única, por vía oral cladodios asados a pacientes con DM2 en diferentes dosis (0, 300 y 500 g). Las cuantificaciones de las concentraciones de glucosa e insulina en suero fueron realizadas cada hora durante 6 horas. Estos tratamientos produjeron una disminución máxima en las concentraciones de glucosa sanguínea a las 4 h después de su administración, y se mantuvo sin cambios hasta las 6 h. Cuando estos autores compararon el nopal asado con un licuado de cladodio fresco, observaron la mayor disminución de las concentraciones de glucosa sérica en los pacientes con DM suplementados con el nopal asado (Frati-Munari *et al.*, 1988; Frati-Munari *et al.*, 1989a; Frati-Munari *et al.*, 1989b; Frati-Munari *et al.*, 1989c; Frati-Munari *et al.*, 1991).

Preparados tradicionales de las doce plantas más usadas en México para controlar la DM, fueron administradas a conejos y se compararon con un tratamiento control (agua y tolbutamida). En la curva de tolerancia de la glucosa realizada semanalmente se observó una disminución del 21.4% en las concentraciones de glucosa sérica en los animales suplementados con nopal cardón (Roman-Ramos *et al.,* 1991) por lo que se recomienda el uso

de esta especie de plantas para el control y prevención de la DM (Roman-Ramos *et al.,* 1995).

Usando una extracto etanólico de cladodios adultos desarrollados y nopalitos (760 mg/kg de peso), Navarro *et al*. (2001) demostraron que la administración durante 3 semanas provoca una disminución de las concentraciones de glucosa sérica; a la vez, se observó que fue más eficiente el tratamiento del extracto de los nopalitos.

1.1.3.7. *O. joconostle* Web.

O. joconostle Web. (Cactaceae) es una especie característica de lugares con clima semiárido, en los estados del altiplano central de México, donde se le encuentra tanto en nopaleras silvestres como en huertos familiares o solares y en plantaciones comerciales (Garcia *et al*., 2005).

El fruto de estas especies es conocido popularmente como "tuna blanca", "tempranilla", "joconoxtle" o "xoconostle". La palabra xoconostle proviene del náhuatl clásico *xococ*, agrio y *nochtli*, nopal o tuna, y es aplicado a los frutos ácidos de varias especies del género *Opuntia* (Bravo-Hollis, 1978; Santamaría, 1992). Es una planta arbustiva de hasta 2.0 m de altura, ramificaciones abundantes y tronco grisáceo bien definido; florece de abril a mayo y fructifica de septiembre a octubre (García, 2004). Presenta flores amarillas y frutos globosos, subglobosos o cilíndricos, con cicatriz floral (ombligo) hundida, y color verde-amarillo a rojo; los frutos presentan cáscara gruesa y de consistencia y sabor ácido agradable; su pulpa es escasa, ácida y rosada y ligeramente perfumada (Bravo-Hollis, 1978; Sánchez y Figueroa, 1994; Anderson, 2001; Durán *et al*., 2001; González *et al*., 2001). El fruto se conserva varios meses en la planta sin sufrir deterioro, e incluso se conserva sin perder sus propiedades de sabor, color y humedad durante varias semanas (Zavaleta-Beckler *et al*., 2001), esto se debe a su bajo pH (3.7 y 4.5), lo cual favorece también su comercialización. El

xoconostle es considerado como un recurso alimentario valioso, sobre todo en la época seca (Bautista, 1982; Sánchez y Figueroa, 1994).

El efecto, por la acidez y riqueza en fibra soluble de sus frutos, *O. joconostle* es utilizado como condimento en la cocina mexicana y en la fabricación de dulces cristalizados, mermeladas y bebidas; y por sus propiedades medicinales (control de la diabetes, colesterol y peso corporal), es recomendado frecuentemente por médicos naturistas (Scheinvar, 1999).

Los frutos y el nopalito del xoconostle son los órganos de esta planta más empleados en medicina tradicional como hipoglucemiantes. Habitantes de regiones semiáridas de México central usan el fruto de O. *joconestle* para el tratamiento de afecciones arteriales, gripe, DM, inflamaciones y anginas (Pimienta *et al.*, 1994). En contraste, el uso de esta especie como tratamiento alternativo para la DM y su potencial antidiabético, dista mucho de estar experimentalmente comprobado, ya que sus compuestos aún están por ser caracterizados.

Al evaluarse el efecto de la ingestión de 200 g de fruto de *O. joconostle* en 14 pacientes sanos, de quienes se tomaron muestras de sangre cada 20 minutos hasta los 200 minutos, se observó un incremento en las concentraciones de glucosa e insulina sérica a los 20 y 40 minutos después del consumo del suplemento, más una disminución en las concentraciones de colesterol, pero no en los de triglicéridos. El incremento de insulina y glucosa en sangre puede estar relacionado con la cantidad de polisacáridos, de calcio y mucílago presente en los frutos (Pimienta *et al.*, 1994).

Aunque para las especies de nopal arriba citadas se ha demostrado efectos favorables sobre la regulación de las concentraciones de colesterol, triglicéridos y glucosa en la sangre, aún se carece de evidencias de que el consumo de *Opuntia* mejore la calidad de vida de personas diabéticas. Por ello estos antecedentes en conjunto, justifican la realización, la hipótesis y los objetivos del presente estudio.

1.2. Justificación

En México, la DM es considerada como un problema de salud pública, la diversidad de su patología conduce al paciente diabético a llevar un programa de prevención y de control costoso y muchas veces deficiente. De acuerdo con esto, la búsqueda de alternativas terapéuticas como la utilización de plantas medicinales es considerada como una de las primeras líneas de tratamiento y prevención para esta enfermedad. De acuerdo con Andrade-Cetto y Heinrich (2005), están documentadas 306 especies de plantas que se emplean como hipoglicemiantes en México. El potencial antidiabético de algunas de estas plantas ha sido evaluado en modelos animales o mediante estudios epidemiológicos limitados; sin embargo, el análisis y discusión de los resultados obtenidos son a menudo desconcertantes, confusos, y complicados. Ninguna publicación compila la información etnobotánica ni la información farmacológica de los estudios experimentales y clínicos con las plantas mexicanas consideradas antidiabéticas. Los principios activos de todas ellas, así como sus mecanismos de acción, son aún desconocidos, por lo que persiste la necesidad de realizar más estudios con las plantas hipoglucemiantes para evaluar sus efectos en modelos animales (Hernández-Galicia *et al.*, 2002), y posteriormente realizar ensayos clínicos e incluso epidemiológicos. La gravedad y complicaciones de la DM, el incremento creciente en nivel mundial de las personas afectadas, la carencia de apoyo experimental y la importancia de encontrar nuevas alternativas para su tratamiento, justifica la investigación y búsqueda de nuevos fármacos para su control.

Con base en lo precedente y en que *O. joconostle* es de las especies de *Opuntia* más usadas tradicionalmente como hipoglucemiante, es importante verificar su efecto en modelos experimentales para diabetes mediante los parámetros usados para evaluar el estado metabólico de pacientes con DM, como son la concentración de glucosa, colesterol total,

lípidos de alta densidad (HDL), triglicéridos, hemoglobina glucosilada y el péptido C en la sangre.

1.3. Hipótesis

El consumo de extracto acuoso de fruto, cladodio y mezcla de fruto-cladodio de *O. joconostle* podría producir efecto hipoglucemiante, hipolipidémico y hipocolesterolemico en modelos animales con DM2.

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo General

Verificar experimentalmente el efecto antidiabético atribuido tradicionalmente a los frutos, cladodio y mezcla de fruto y cladodio de *O. joconostle*, en ratas con diabetes inducida por STZ.

1.4.2. Objetivos específicos

1) Reproducir el modelo animal experimental de DM2.

2) Determinar la variación en las concentraciones séricas de glucosa, colesterol total, HDL, triglicéridos, hemoglobina glucosilada A1c y péptido C de animales experimentales suplementados con xoconostle.

2. Materiales y métodos

2.1. Material vegetal

Los frutos y cladodios de *O. joconostle* utilizados procedieron de la plantación experimental del Instituto de Investigación de Zonas Desérticas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí (22 º 43' de Latitud Norte, 100 º 57' de Longitud Oeste y 1860 m.s.n.m.). Todos los frutos y cladodios se obtuvieron de una misma planta, con grado de madurez semejante y fueron recolectados en forma simultánea. Los frutos se recolectaron cuando estaban maduros y los cladodios tenían aproximadamente nueve meses de edad. El material vegetal se partió en rebanadas delgadas, se colocó en un recipiente de malla y se deshidrató en un horno de aire forzado (Shel Lab, Modelo FX14, USA), a una temperatura media de 35 ± 2 ºC, hasta peso constante.

2.2. Preparación de los extractos

En la preparación de los extractos acuosos se utilizaron los frutos y cladodios pulverizados; para ello, 100 gramos del material vegetal desecado y pulverizado se extrajeron mediante el método de reflujo con agua (1:10 w/v) por dos horas. Posteriormente, estos extractos acuosos se filtraron a través de papel filtro Whatman Núm. 1, y se liofilizaron a – 50º C (Lobconco Corporation, Modelo 117, England). El rendimiento después de la liofilización fue de 42.4 g/100 g de material seco de fruto y 30.4 g/100g de material seco de cladodio.

2.3. Animales

Se utilizaron 48 ratas adultas machos de la cepa Wistar, con peso de 250 a 300 g, adquiridas del bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Cada animal constituyó una unidad experimental, y se mantuvo en cajas de polipropileno individuales, en un cuarto con condiciones de temperatura y humedad controladas, y con ciclo

de luz-oscuridad invertido de 12/12 horas. Los animales se sometieron previamente durante una semana al ambiente del cuarto y a las condiciones experimentales de confinamiento y alimentación. Todos los animales tuvieron agua disponible y diariamente se les suministró a cada rata 20 g de alimento comercial para roedores (Rodent Laboratory Chow 5001, Agribands Purina, México). Los animales se mantuvieron de acuerdo con las recomendaciones éticas de la Norma Oficial Mexicana de especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio (NOM-062-ZOOO-1999).

2.4. Inducción experimental de la diabetes

El estado hiperglucémico en las ratas se indujo con STZ (Sigma SO130, St. Louis, MO, USA) disuelta en solución amortiguadora de citrato de sodio 0.01 M (pH 4.5). La STZ es un antibiótico frecuentemente utilizado para producir un estado diabético en animales de experimentación (Toporek, 1984); ya que induce la expresión de citocinas en los islotes pancreáticos y la muerte de las células β por apoptosis a través de la formación de radicales libres y óxido nítrico (Turk *et al.*, 1993; Huang *et al.*, 1994; O'Brien et al., 1996); para ello se administró después de 12 h de ayuno una dosis única de 40 mg/kg de peso corporal por vía intraperitoneal. Tres días después, se colectaron muestras de sangre de la vena caudal, y se evaluó su estado de glucemia con un glucómetro portátil (Ascencia Elite, Bayer, Francia). Se consideró que las unidades experimentales presentaban diabetes cuando sus concentraciones de glucosa sanguínea fueron mayores a 250 mg/dL después de 12 h de ayuno. Diariamente, cada 12 horas, durante todo el periodo experimental (12 semanas), se administró insulina de acción lenta (Eli Lilly HI-310 NPH, México) (una a tres unidades) por vía subcutánea, para mantener la glucosa sanguínea entre 250 y 350 mg/dL, y simular así el estado metabólico de un enfermo de DM2 sin control terapéutico.

2.5. Elección de la dosis

Con el objeto de establecer la dosis óptima de suplemento (fruto, cladodio y mezcla de ambos), en términos de la reacción biológica de animales diabéticos y de animales sanos, se realizó el siguiente ensayo exploratorio: se utilizaron 24 ratas con las características descritas previamente, 12 con diabetes inducida con STZ y 12 ratas sanas. A tres ratas sanas y a tres diabéticas se les administró un tipo de suplemento resultante de combinar materiales y dosis: materiales, fruto, cladodio y combinación equitativa de fruto y cladodio; dosis, 100.0, 200.0 y 300.0 mg de extracto liofilizado por kilogramo de peso corporal, además de agua que fue utilizada como vehículo. Posteriormente, se les midió la concentración de glucosa sanguínea cada 30 minutos durante tres horas. Los resultados obtenidos en esta parte experimental, se ajustaron de acuerdo a las siguientes fórmulas para calcular el porcentaje de disminución de la concentración de glucosa sérica atribuida a los tratamientos, y así eliminar el efecto de la insulina exógena administrada.

$$\text{Porcentaje de } \downarrow GS_{agua} = 100 - \left(\frac{([GS_{agua}]\, T_f * 100)}{([GS_{agua}]\, T_o)} \right)$$

$$\text{Porcentaje de } \downarrow Gs_{suplem.} = 100 - \left(\frac{([Gs_{suplem.}]\, T_f * 100)}{([Gs_{suplem.}] T_o)} \right)$$

$$\text{Porcentaje de } \downarrow Gs_{NETO} = \text{Porcentaje de } Gs_{suplem._--} \text{ Porcentaje de } Gs_{agua}$$

Donde:

GS_{agua} = concentración de glucosa sérica en las ratas suplementadas con agua.

$GS_{suplem.}$ = concentración de glucosa sérica en las ratas suplementadas con fruto, cladodio y mezcla de fruto y cladodio.

T_o = tiempo inicial.

T_f = tiempo final.

De esta manera, se estableció que la mejor dosis de fruto, cladodio y mezcla de fruto y cladodio fue la de 100 mg de extracto liofilizado/kg de peso seco.

2.6. Diseño experimental, evaluación de tratamientos y análisis estadístico

El experimento se condujo de acuerdo con un diseño completamente aleatorio, con arreglo factorial de tratamientos (2 x 4). Los factores y niveles fueron: a) estado de salud de las ratas (diabéticas y sanas) y b) suplemento (fruto, cladodio, mezcla de fruto y cladodio y agua).

Los cuatros suplementos proporcionados cada uno, a seis unidades experimentales sanas o diabéticas (repeticiones) fueron los siguientes:

1) Animales diabéticos suplementados con agua (A).

2) Animales diabéticos suplementados con frutos (F).

3) Animales diabéticos suplementados con cladodio (C).

4) Animales diabéticos suplementados con mezcla equitativa de fruto y cladodio (FC).

5) Animales sanos suplementados con agua (A).

6) Animales sanos suplementados con fruto (F).

7) Animales sanos suplementados con cladodio (C).

8) Animales sanos suplementados con mezcla equitativa de fruto y cladodio (FC).

El periodo experimental fue de 12 semanas durante los cuales los suplementos se suministraron por vía oral con cánula esofágica, una vez al día al iniciarse el periodo de oscuridad aplicado a los animales. Cada semana, alrededor de dos horas después de suministrar los suplementos, se extrajo una muestra de sangre de la vena caudal. Estas muestras fueron

procesadas para la evaluación del efecto de los tratamientos sobre parámetros bioquímicos que se alteran normalmente durante un estado de hiperglucemia: concentración de glucosa, colesterol total, HDL, triglicéridos, HbA1c y péptido C. Además, semanalmente se registró el peso corporal de cada animal

La concentración de glucosa, colesterol total, HDL y triglicéridos se determinaron con kits comerciales Sera Pack® Plus (Bayer, Argentina), de acuerdo con las indicaciones del fabricante (Anexo 1). Las mediciones se realizaron en un espectrofotómetro (Bayer, RA-50 Chemistry Analyzer, Ireland) a una longitud de onda desde 500 hasta 600 nm. La HbA1c y el péptido C fueron evaluadas sólo al inicio y término del período experimental; para ello, se utilizaron kits comerciales Tina-quant® Hemoglobin A1c II, Roche, Ref. 11867539001V9, Germany) e IMMULITE®/IMMULITE 1000 C-Peptide (CE, PILKPE-10, USA), respectivamente conforme indicaciones del fabricante (Anexo 1), las mediciones se realizaron en analizadores Roche/Hitachi (Roche Diagnostics/Hitachi, modelo 902, Germany) e IMMULITE (CE, IMMULITE® 1000, USA). La proporción de cambio de peso se calculó semanalmente con los datos de peso inicial y peso final: % ganancia de peso corporal = (peso final – peso inicial)*100/peso inicial.

Los datos obtenidos de las mediciones de los parámetros bioquímicos fueron sometidos a un análisis de varianza (SAS, versión 8.0; SAS Institute, Cary, North Carolina). Los resultados son presentados como medias ± error estándar.

2.7. Parámetros bioquímicos

2.7.1. Glucosa

La determinación de la glucosa sérica se basó en el método de la glucosa oxidasa; por la acción de la glucosa oxidasa, la glucosa se convierte en ácido glucónico y peróxido de hidrógeno, el cual en presencia de peroxidasa oxida el cromógeno (4-aminoantipirina/fenol), formando un compuesto de

color rojo el cual se mide espectrofotométricamente a una longitud de onda de 593 nm (Trinder, 1969; Burrin y Price, 1985).

2.7.2. Colesterol total

La cuantificación del colesterol total se basó en el método del colesterol éster hidrolasa; los ésteres de colesterol se hidrolizan por acción del colesterol éster hidrolasa para liberar colesterol y ácidos grasos. El colesterol libre existente junto con el producido por esta reacción se oxida por la acción de colesterol oxidasa en Δ4-colestenona y peróxido de hidrógeno. Este último, en presencia de peroxidasa, oxida el cromógeno (4-aminoantipirina/fenol), formando un compuesto de color rojo y se mide mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 593 nm (Allain *et al.*, 1974).

2.7.3. Lipoproteínas de alta densidad (HDL)

Para determinar las lipoproteínas de alta densidad se utilizó el método de inmunoinhibicion directo, donde el anticuerpo antiβ-lipoproteína humana se une a las lipoproteínas (LDL, VLDL y quilomicrones) distintas de las HDL. Al añadir el reactivo enzimático (colesterol esterasa y colesterol oxidasa), los complejos antígeno-anticuerpo formados bloquean las reacciones enzimáticas con colesterol HDL y dan como resultado un complejo de color azul tras la condensación oxidativa de F-DAOS [(N-etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropilo)-3,5-dimetoxi-4-fruroanilina], sal de sodio y 4-aminoantipirina (4-AA) en presencia de peroxidasa. Cuando se mide la absorción del complejo de color azul producido a la longitud de onda de 593 nm, la concentración de colesterol HDL de la muestra se puede calcular si se compara con la absorción del calibrador de colesterol HDL (Burtis y Ashwood, 1994; Gordon *et al.*, 1977; Grundy, 1993; Rifai y Warnick, 1994).

2.7.4. Triglicéridos

La determinación de los triglicéridos se basó en el método de la lipoproteína lipasa, donde el glicerol liberado en la hidrólisis de triglicéridos por la acción de la lipoproteína lipasa se convierte, por la acción del glicerol quinasa en glicerol-3-fosfato, el cual se oxida por la acción de glicerolfosfato oxidasa en fosfato de dihidroxiacetona y peróxido de hidrógeno. En presencia de peroxidasa, el peróxido de hidrógeno oxida el cromogeno (4-aminoantipirina/p-clorofenol), formando un compuesto de color rojo y se mide espectrofotométricamente a una longitud de onda de 593 nm (Annoni *et al.*, 1982; Buccolo y David, 1973; Werner *et al.*, 1981).

2.7.5. Hemoglobina glucosilada A1c

Esta determinación se basa en el ensayo inmunoturbidimétrico de inhibición (TINIA) para sangre completa hemolizada. Con esta prueba se determinan todas las variantes de hemoglobina glucosilada en el término N de la cadena β, cuya región reconocida por el anticuerpo es idéntica a la glucohemoglobina (HbA1c), y permite controlar la situación metabólica de diabéticos con hemoglobinopatías y uremia. La HbA1c de la muestra forma con el anticuerpo anti- HbA1c un complejo antígeno-anticuerpo soluble. Ya que en la molécula HbA1c existe solamente un sitio de fijación específico para el anticuerpo anti- HbA1c. Al iniciar la reacción los polihaptenos forman con los anticuerpos anti- HbA1c excedentes un complejo anticuerpo-polihapteno insoluble. La hemoglobina liberada de la muestra hemolizada es transformada a un derivado con un espectro de absorción característico y se mide bicromáticamente (Karl, 1993).

2.7.6. Péptido C

Las determinaciones de péptido C se basaron en el inmunoensayo enzimático quimioluminiscente competitivo en fase sólida. El péptido-C humano es una cadena de 31 aminoácidos con un peso molecular de aproximadamente 3020 daltons. Metabólicamente inerte, el péptido-c se

origina en las células β del páncreas como un subproducto del corte enzimático de la proinsulina (Horwitz *et al.*, 1975; Beyer *et al.*, 1979; Beischer, 1983). En este proceso, la insulina y el péptido-C se separan a partir de la prohormona y se secretan en la circulación portal en concentraciones equimoleculares (Horwitz, 1975; Gonen *et al.*, 1979; Polonsky y Rubenstein, 1984). En este hecho radica el interés clínico de la determinación en plasma del péptido-C. Con limitaciones, los niveles de péptido-C pueden ser utilizados como un índice valorable de secreción de insulina. Así, se esperarán bajos niveles de péptido-C cuando la secreción de insulina se vea disminuida, como en el caso de una diabetes insulino-dependiente, o suprimida, como en una respuesta normal a la administración de insulina exógena; mientras que valores altos de péptido-C pueden ser el resultado de un incremento de la actividad de las células β, como se observa en los insulinotas (Horwitz *et al.*, 1976; Rubenstein *et al.*, 1977; Gonen *et al.*, 1979; Bonser y García-Webb, 1984). Por consiguiente, en el diagnóstico diferencial de la hipoglucemia, las determinaciones de péptido-C pueden ser utilizadas junto con las medidas de insulina como un índice de actividad pancreática en la prueba clásica de 72 horas de ayuno, y como único indicador de la actividad pancreática, cuando la insulina (por sí sola) es administrada para comprobar el grado de supresión (Beischer, 1983; Rendell, 1983). Además, en humanos, la auto-administración encubierta de insulina puede ser prácticamente descartada como causa de una hiperinsulinemia cuando se encuentran altos niveles de péptido-C (Rubenstein *et al.*, 1977; Beyer *et al.*, 1979; Rendell, 1983; Bonser y García-Webb, 1984).

3. Resultados y Discusión

Después de la inducción de diabetes con STZ, la concentración de glucosa sérica de estas unidades experimentales fue de 250 a 350 mg/dL; con esta evidencia se procedió a realizar la estrategia experimental propuesta.

En la primera fase del experimento se determinó la dosis óptima de los suplementos de xoconostle (fruto, cladodio y mezcla equitativa de fruto y cladodio de *O. joconostle)*, en ratas macho (cepa Wistar) sanas y con diabetes inducida por STZ (40 mg/kg de peso corporal), mediante una relación dosis reacción en un periodo de tres horas.

En el Cuadro 1 y 2 se observa la variación del efecto de los suplementos debida al tiempo y dosis sobre la concentración de glucosa sérica en ratas sanas y diabéticas, respectivamente. Los animales sanos suplementados con 100 mg/kg de xoconostle presentaron concentraciones de glucosa sérica estadísticamente similares a la de los animales sanos suplementados con agua; sin embargo, cuando fueron suplementados con 200 y 300 mg/kg, su glucosa sérica fue estadísticamente mayor que la de las ratas sanas suplementadas con agua ($p<0.05$). En las ratas diabéticas suplementadas con 100 mg/kg de peso corporal de xoconostle se produjo un menor incremento ($p<0.01$) de la concentración de glucosa sérica, que en las ratas diabéticas suplementadas sólo con agua y que en las ratas diabéticas suplementadas con el doble y el triple de xoconostle ($p<0.05$). Así, se eligió la dosis de 100 mg/kg de peso corporal de xoconostle, por provocar menor incremento en la concentración de glucosa en las ratas diabéticas, sin alterarla en las ratas sanas.

Cuadro 1. Concentración media de glucosa en la sangre (mg/dL) en ratas sanas suplementadas con agua (A), fruto (F), cladodio (C) y mezcla equitativa de fruto y cladodio (M) de *O. joconostle*.

Suplementos	Dosis (mg/kg)	Tiempo 0.0 h	0.5 h	1.0 h	1.5 h	2.0 h	2.5 h	3.0 h
A	0	82 ± 1.2	83 ± 0.0	91 ± 3.1	88 ± 3.3	87 ± 1.0	83 ± 1.1	82 ± 1.8
F	100	82 ± 2.6	99 ± 2.9	75 ± 1.6	77 ± 1.3	76 ± 1.79	76 ± 1.9	75 ± 1.6
C	100	81 ± 2.9	85 ± 2.3	78 ± 2.8	74 ± 1.7	76 ± 2.5	75 ± 1.6	78 ± 1.9
M	100	78 ± 1.4	87 ± 2.6	94 ± 4.2	78 ± 2.3	82 ± 1.9	78 ± 1.1	79 ± 1.2
F	200	84 ± 2.5	102 ± 3.6	116 ± 3.5	108 ± 2.9	96 ± 1.7	91 ± 2.3	87 ± 1.7
C	200	85 ± 1.2	93 ± 3.8	91 ± 3.5	80 ± 2.1	79 ± 2.7	82 ± 3.9	93 ± 3.6
M	200	79 ± 1.1	123 ± 5.9	128 ± 4.7	94 ± 31	93 ± 3.4	86 ± 2.5	77 ± 2.0
F	300	73 ± 1.0	88 ± 3.6	83 ± 2.8	84 ± 3.9	82 ± 2.8	64 ± 1.1	67 ± 1.8
C	300	88 ± 4.4	103 ± 3.9	96 ± 3.1	97 ± 3.6	83 ± 1.6	76 ± 3.2	75 ± 3.0
M	300	82 ± 2.1	97 ± 3.9	112 ± 4.7	94 ± 3.1	85 ± 2.1	82 ± 2.8	79 ± 2.3

Cuadro 2. Concentración media de glucosa en sangre (mg/dL) en ratas diabéticas suplementadas con agua (A), fruto (F), cladodio (C) y mezcla equitativa de fruto y cladodio (M) de *O. joconostle*.

Suplementos	Dosis (mg/kg)	Tiempo 0.0 h	0.5 h	1.0 h	1.5 h	2.0 h	2.5 h	3.0 h
A	0	310 ± 9.9	332 ± 10.4	320 ± 9.6	310 ± 9.6	312 ± 9.3	313 ± 9.7	308 ± 9.9
F	100	210 ± 2.4	171 ± 9.0	150 ± 8.2	145 ± 8.5	143 ± 8.8	137 ± 7.7	119 ±7.5 [a]**
C	100	418 ± 4.4	369 ± 5.4	371 ± 6.3	350 ± 5.0	349 ± 3.8	332 ± 2.3	311 ± 5.7[b]
M	100	454 ± 6.6	455 ± 5.1	440 ± 7.5	406 ± 6.9	389 ± 3.7	381 ± 4.5	341 ± 2.5[b]
F	200	336 ± 10.2	310 ± 10.3	279 ± 10.5	281 ± 11.0	270 ± 9.9	239 ± 8.7	224 ± 9.7[a]
C	200	409 ± 7.3	361 ± 6.8	340 ± 4.9	325 ± 5.6	319 ± 4.9	277 ± 6.8	258 ± 5.3[a]*
M	200	267 ± 10.1	248 ± 10.5	247 ± 10.5	234 ± 10.1	230 ± 10.3	222 ± 10.2	182 ± 9.6[a]
F	300	366 ± 7.3	370 ± 4.6	365 ± 3.6	354 ± 3.7	349 ± 4.1	344 ± 4.7	317 ± 3.2[b]
C	300	310 ± 10.4	359 ± 11.5	324 ± 11.2	282 ± 10.5	266 ± 10.7	256 ± 10.4	246 ± 9.6[b]
M	300	311 ± 10.6	347 ± 12.0	306 ± 11.3	290 ± 11.0	284 ± 11.2	272 ± 10.3	256 ± 9.7[b]

[ab] valores diferentes por suplemento dentro del grupo. ** ($p<0.01$) al compararlo con ratas diabéticas (100, 200 y sanas 300 mg/kg de peso corporal). *($p<0.05$) al compararlo con fruto 100 kg/mg de peso corporal.

En la segunda fase del estudio se evaluó el efecto de 100 mg/kg de peso corporal de los mismos suplementos, sobre la concentración de glucosa, colesterol total, HDL, HbA1c y péptido-C y la ganancia de peso corporal en ratas sanas y diabéticas. Las mediciones se realizaron semanalmente, pero para propósito de esta tesis sólo se presentan los datos iniciales y finales del período experimental de 12 semanas.

Debido a que las concentraciones normales de la glucosa, del colesterol total, del HDL y de los triglicéridos se alteran durante el desarrollo de la DM, y que ello permite en breve conocer el estado metabólico del paciente, sólo para estos parámetros se practicaron los análisis de variación. En el Cuadro 3 se presentan los cuadrados medios y los resultados de la prueba de F correspondiente.

Cuadro 3. Cuadrados medios y resultados de su prueba de F para la concentración (mg/mL) de compuestos en sangre de ratas diabéticas y sanas suplementadas con agua y con fruto, cladodio y mezcla de fruto y cladodio de *O. joconostle*.

	G.L.	Glucosa	Triglicéridos	Colesterol	HDL
Suplemento	3	25447.54***	242.22***	52.39	70.74*
Estado de salud	1	89874.24***	6657.21***	817.27*	11.87
Estado de salud x suplemento	3	19250.79***	84.88*	67.54	34.03
Error	36	861.97	26.78	63.64	26.87
C.V. (%)		22.65	6.63	9.9	20.53

***Significativo en los niveles de probabilidad 0.0001. *Significativo en los niveles de probabilidad de 0.05. G.L. = Grados de libertad. C.V. = Coeficiente de Variación.

De acuerdo con los resultados del análisis de varianza (Cuadro 3), el efecto de los suplementos en la concentración de glucosa sérica fue estadísticamente diferente, pero dependió significativamente del estado de salud de los animales (Figura 1). Así, las ratas sanas y las diabéticas suplementadas con xoconostle presentaron una menor ($p<0.001$) concentración de glucosa sérica que las que recibieron agua. A la vez, el suplemento de fruto en las ratas diabéticas provocó la mayor reducción (70%, $p<0.0001$) de dicha concentración, hasta niveles estadísticamente

similares a los de las ratas sanas. En cambio, los animales diabéticos suplementados con cladodio presentaron la menor reducción en la concentración de glucosa, al igual que síntomas de la DM, como irritabilidad, poliuria, polidipsia y polifagia. De manera notable, las ratas diabéticas suplementadas con la mezcla de fruto y cladodio presentaron concentraciones de glucosa intermedios entre la concentración producida por el fruto y por el cladodio por separado, el cual confirma el fruto como el responsable de la mayor reducción en la concentración de glucosa.

La disminución en la concentración de glucosa sérica debida al fruto fue inmediata y se acentuó en las últimas semanas del experimento. Este resultado discrepa de lo observado en individuos sanos por Pimienta *el al.* (1994), en los cuales la concentración de glucosa se incrementó a los 20 y 40 minutos después del consumo de frutos de *O. joconostle*; estos autores atribuyeron este aumento al mucílago presente en el fruto, lo cual parece poco probable. Que el consumo de todos los suplementos de xoconostle haya provocado una disminución en la concentración de glucosa sérica, tanto en las ratas diabéticas como en las sanas, desde aproximadamente tres horas después de su administración, indica que los mecanismos homeostáticos de regulación de la glucosa actuaron normalmente en todos los animales (Mathews *et al.,* 2002). Además, como los suplementos con fruto provocaron que la concentración de glucosa sérica llegara a valores considerados como normales, es probable que algún compuesto químico presente en el fruto sea la causa de dicha reducción.

Esta disminución en la concentración de glucosa sérica causada por *O. joconostle* también ha sido observada en otras especies de este género, como en *O. ficus-indica* Mill. (Frati-Munari *et al.*, 1989; Frati-Munari *et al.*, 1992), *O. fuliginosa* Griffiths (Trejo-González *et al.*, 1996), O. *lindheimeri* Englem. (Laurenz *et al.,* 2003), *O. megacantha* However *(*Bwititi *et al.*, 2000; Bwititi *et al.*, 2001), *O. robusta* H. L. Wendland (Wolfran *et al.*, 2002) y en *O. streptacantha* Lemaire (Ibáñez-Camacho y Román-Ramos, 1979; Ibáñez-Camacho y Meckes-Lozoya, 1983; Meckes-Lozoya y Ibáñez-Camacho,

1989; Frati-Munari *et al.*, 1988; Frati-Munari *et al.*, 1989a; Frati-Munari *et al.*, 1989b; Frati-Munari *et al.*,1989c; Frati-Munari *et al.*, 1991; Román-Ramos *et al.,* 1991; Román-Ramos *et al.,* 1995; Navarro *et al.*, 2001), es posible que compartan metabolitos similares que sean los responsables del efecto hipoglucemiante observado.

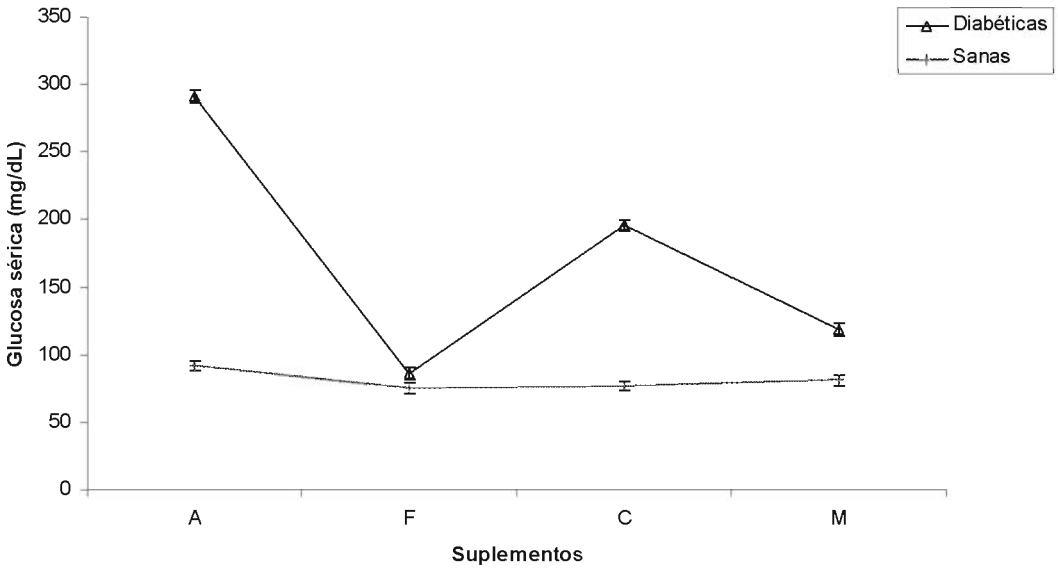


Figura 1. Efecto de la suplementación con agua (A) y con fruto (F), cladodio (C) y mezcla equitativa de fruto y cladodio (M) de *O. joconostle* sobre la concentración de glucosa sérica de ratas diabéticas y de sanas (Los valores son las medias ± error estándar; n=6).

En la DM además de ser deficiente la captación de glucosa, también a largo plazo se altera el metabolismo de los lípidos (Subash-Babu *et al.*, 2007).

Con respecto a triglicéridos, también la interacción estado de salud x suplementos fue altamente significativa (Cuadro 3), es decir, que los suplementos alteran su concentración sérica, pero en la dependencia del estado de salud de los animales. Como se observa en la Figura 2 la concentración de triglicéridos disminuyó significativamente ($p<0.001$) en las ratas sanas suplementadas con xoconostle; sin embargo, la mayor

concentración de triglicéridos de las ratas diabéticas no se alteró significativamente.

Los resultados encontrados tampoco coinciden con lo publicado por Pimienta *et al*. (1994), quienes señalan que no se observó una reducción en los triglicéridos de pacientes sanos suplementados con el fruto de xoconostle. Sin embargo la disminución en la concentración de triglicéridos provocada por *O. joconostle* en las ratas sanas también fue observada por Frati-Munari *et al*. (1989 y 1992) en individuos sanos al administrarles cápsulas de fruto seco de *O. ficus- indica* desecada y por Wolfran *et al*. (2002) con la suplementación de pulpa fresca de fruto de *O. robusta* a individuos con hiperlipidemia.

En la diabetes sin control se presenta un incremento en las concentraciones plasmáticas de los triglicéridos y de los quilomicrones, así como de los ácidos grasos libres; así, el plasma se presenta a menudo lipémico. El aumento de la concentración de triglicéridos se debe sobre todo a su acumulación al reducirse su translocación a los depósitos grasos (Ganong, 2000). Se puede suponer que la disminución en la concentración de triglicéridos en las ratas sanas se debe a que los extractos de joconostle contienen algún compuesto que interfiere en el metabolismo de los lípidos. Así, el consumo de *O. joconostle* puede ser útil como tratamiento alternativo para personas sin DM, pero que presentan concentraciones de triglicéridos elevadas.

De acuerdo con los resultados del análisis de varianza (Cuadro 3) se presentaron diferencias estadísticamente significativas en la concentración sérica de colesterol entre los animales diabéticos y los sanos (Figura 3). Específicamente, en las ratas sanas suplementadas con cladodio o con la mezcla de fruto y cladodio su concentración de colesterol sérico fue menor ($p<0.01$ y $p<0.05$, respectivamente) que en las diabéticas. En cambio en las ratas diabétcas y sanas suplementadas con agua y con fruto su concentración sérica de colesterol fue estadísticamente similar. Nuevamente

resalta el efecto benéfico del fruto en la regulación del complejo lipídico sérico de los animales con DM.

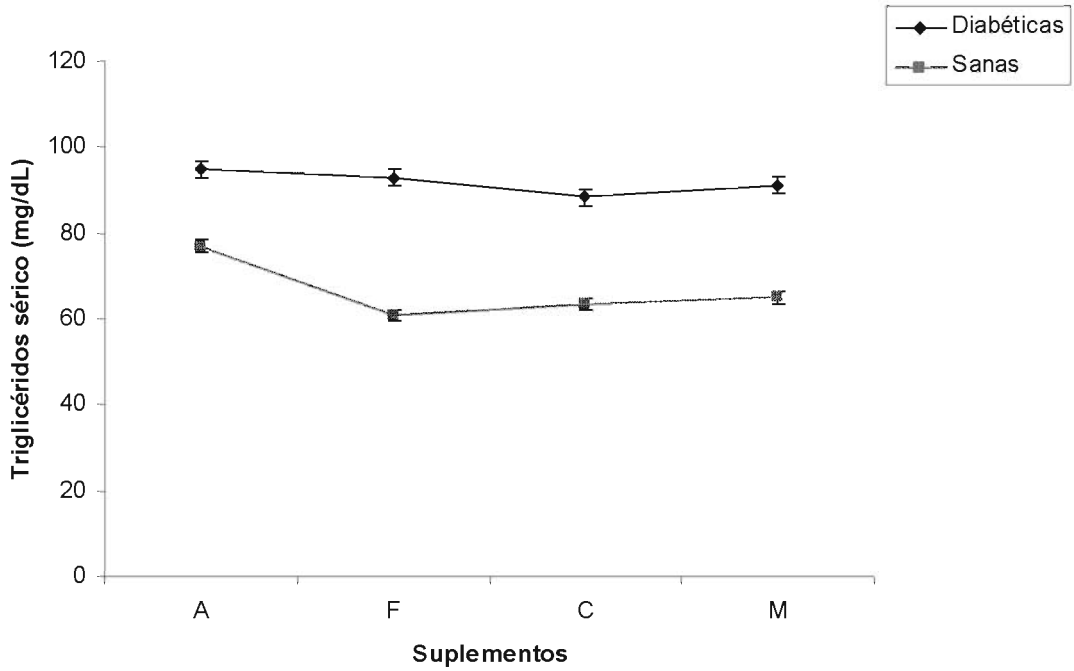


Figura 2. Efecto de la suplementación con agua (A) y con fruto (F), cladodio (C) y mezcla equitativa de fruto y cladodio (M) de *O. joconostle* en la concentración sérica de triglicéridos de ratas diabéticas y de sanas (Los valores son las medias ± error estándar; n=6).

Los resultados obtenidos con el suplemento de fruto, otra vez se contraponen con lo publicado por Pimienta *et al.* (1994), ya que estos autores consignan una disminución en la concentración de colesterol en pacientes sanos suplementados con fruto de xoconostle. Sin embargo, dicha disminución también fue registrada por Frati-Munari *et al.* (1989 y 1992) con cápsulas comerciales de fruto seco de *O. ficus indica* y por Wolfran *et al.* (2002) con pulpa fresca de fruto de *O. robusta*.

El colesterol se absorbe en el intestino y se incorpora en algunos de los quilomicrones formados en su mucosa, los cuales lo conducen al hígado; éste y otros tejidos también sintetizan colesterol (Ganong, 2000). Como el fruto y cladodio contienen fibra soluble, es probable que hayan interferido en

la absorción de lípidos en el intestino; pero también es posible que el suplemento de fruto redujera la biosíntesis del colesterol, regulando su concentración sérica. Por lo general, en pacientes diabéticos la concentración del colesterol plasmático aumenta, lo cual se considera como uno de los factores asociados al desarrollo acelerado de la enfermedad vascular aterosclerótica, complicación importante a largo plazo de la DM (Ganong, 2000).

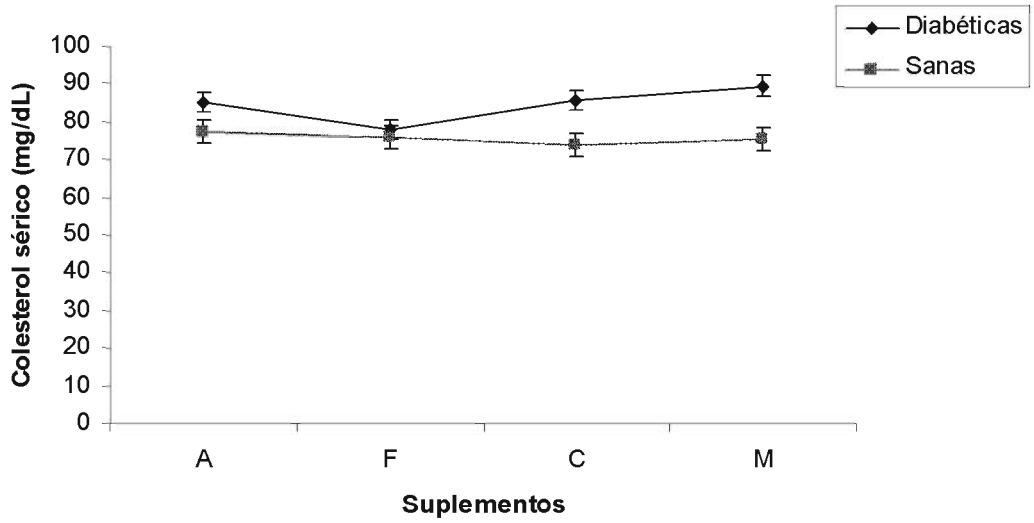


Figura 3. Efecto de la suplementación con agua (A) y con fruto (F), cladodio (C) y mezcla equitativa de fruto y cladodio (M) de *O. joconostle* sobre la concentración de colesterol total sérico de ratas diabéticas y de sanas (Los valores son medias ± error estándar; n=6).

De acuerdo con los resultados del análisis de varianza (Cuadro 3), el factor suplemento provocó diferencias ($p<0.05$) en las concentraciones séricas de HDL (Figura 4). Así, las diferencias significativas en la concentración sérica de HDL entre las ratas sanas y diabéticas suplementadas con agua, evidencia el efecto regulatorio de los suplementos de xoconostle en la concentración de dichos compuestos.

Las lipoproteínas plasmáticas de alta densidad (HDL) son complejos constituidos por proteínas y lípidos responsables del transporte de lípidos y participan en su metabolismo. Las HDL son sintetizadas en el hígado e

intestino delgado, contienen poco colesterol, pues recapturan el remanente en el cuerpo y lo transportan hasta el hígado, donde se metaboliza en forma de sales biliares (Kiss *et al.*, 2006).

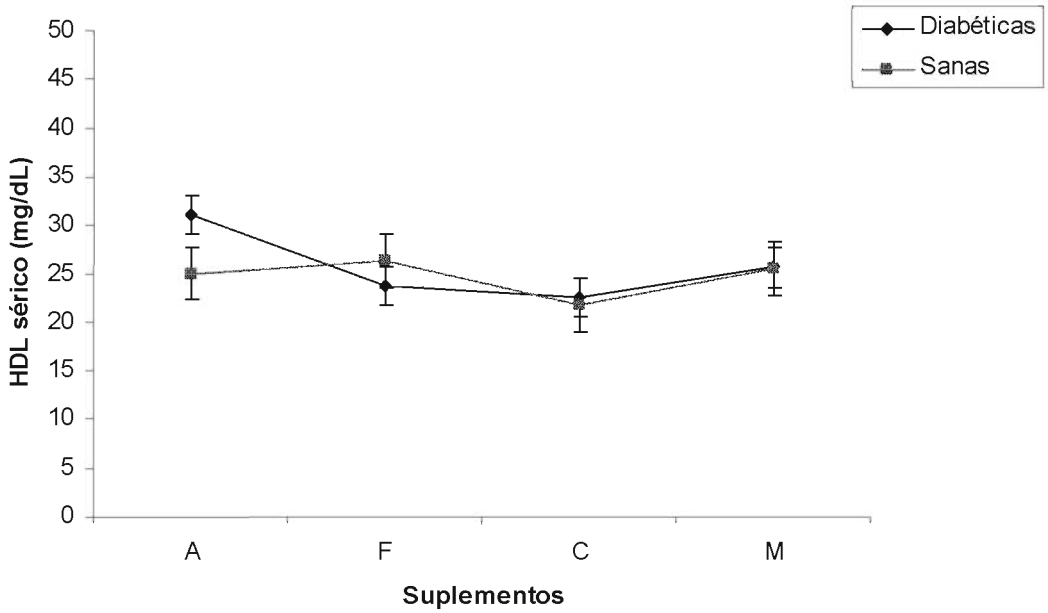


Figura 4. Efecto de la suplementación con agua (A) y con fruto (F), cladodio (C) y mezcla equitativa de fruto y cladodio (M) de *O. joconostle* en la concentración de HDL sérico de ratas diabéticas y de sanas (Los valores son medias ± error estándar; n=6).

En la Figura 5 se resumen los resultados de la suplementación con agua y con fruto, cladodio y mezcla equitativa de fruto y cladodio de *O. joconostle* sobre la concentración de hemoglobina glucosilada (HbA1c) en ratas diabéticas y en sanas. Al inicio del experimento la concentración media de HbA1c fue estadísticamente igual en los grupos de unidades experimentales que recibieron los ocho tratamientos. Doce semanas después, en las ratas diabéticas suplementadas con fruto y la mezcla equitativa de fruto y cladodio se registró una disminución ($p<0.05$) en la concentración de este compuesto; es muy destacable que también se registró dicha reducción ($p<0.01$) en las sanas suplementadas con xoconostle. Los valores de referencia en individuos sanos, son entre 3 y 6%

(Durán-Varela, 2001; Junge *et al.*, 2003). Así, los valores promedios encontrados al final del periodo experimental para las ratas diabéticas suplementadas con fruto (6.51 ± 0.31 %), quedan dentro de dicha amplitud, y los de la mezcla de fruto y cladodio (5.65 ± 0.28 %) la superan solo ligeramente.

Con el aumento episódico de la glucosa plasmática se glucosilan cantidades pequeñas de hemoglobina A para formar HbA1c; sin embargo, el control cuidadoso de la diabetes disminuye esta concentración (Ganong, 2000). La reducción de la concentración de HbA1c provocada por la suplementación con fruto de *O. joconostle* a las ratas diabéticas coincide con lo encontrado por Trejo-González *et al*. (1996) al administrar 1 mg/kg de extracto purificado de fruto de *O. fuliginosa* a ratas con diabetes inducidas por STZ, durante siete semanas, pues estos autores registraron que las concentraciones de hemoglobina glucosilada se redujeron hasta alcanzar los valores normales. De manera que estos resultados corroboran el efecto hipoglucemiante del fruto de xoconostle en ratas diabéticas y en sanas, lo cual tiende a justificar su uso tradicional para estos propósitos.

El uso de dosis bajas de STZ (40 mg/kg) produce una incompleta destrucción de las células β del páncreas, por lo que las ratas aunque se vuelven inmediatamente diabéticas (Aybar *et al.*, 2002); después de este tratamiento muchas células sobreviven, su regeneración es posible (Gómes *et al.,* 2001) y pueden llegar a producir insulina. La evaluación del péptido-C permite verificar si algunas células de las ratas con diabetes provocada volvieron a producir insulina. El péptido-C humano es una cadena de 31 aminoácidos y se origina en las células β del páncreas como un subproducto del corte enzimático de la proinsulina. En este proceso, la insulina y el péptido-C se separan a partir de la prohormona y se incorporan a la circulación portal en concentraciones equimoleculares (Horwitz *et al.*, 1975; Gonen *et al*., 1979; Polonsky y Rubenstein, 1984).

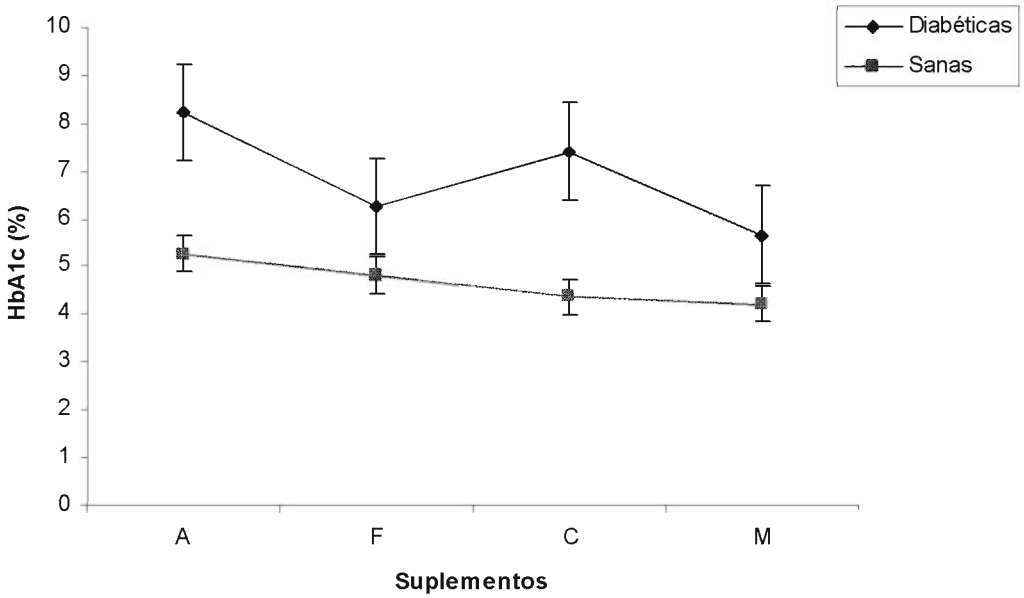


Figura 5. Efecto de la suplementación con agua (A), y con fruto (F), cladodio (C) y mezcla equitativa de fruto y cladodio (M) de *O. joconostle* sobre la concentración de hemoglobina glucosilada (HbA1c) de ratas diabéticas y de sanas (Los valores son medias ± error estándar; n:2).

En este hecho redunda el interés clínico de la determinación en plasma del péptido-C, pues sus niveles pueden ser utilizados como un índice valorable de secreción de insulina. Así, se esperarán bajos niveles de péptido-C cuando la secreción de insulina sea reducida, mientras que valores altos de este compuesto pueden resultar de un incremento de actividad de las células β (Horwitz *et al.*, 1976; Rubenstein *et al.*, 1977; Gonen *et al.*, 1979; Bonser *et al.*, 1984). Por tanto, las cuantificaciones de péptido-C pueden ser utilizadas para monitorizar indirectamente la secreción de insulina en presencia de anticuerpo anti-insulina, y para ayudar a establecer un adecuado programa de tratamiento de la DM (Horwitz *et al.*, 1976; Turkington *et al.*, 1982; Bonser *et al.*, 1984; Polonsky y Rubenstein, 1984).

Al inicio del experimento, la concentración de péptido-C en los animales sanos se encontraba dentro de la amplitud normal para humanos, de acuerdo con la técnica utilizada (IMMULITE péptido-C), de 1.1 – 5 ng/mL (364 – 1655 pmol/L). En la Figura 6 podemos apreciar que se registró una disminución estadística ($p<0.01$) de su concentración en las ratas diabéticas suplementadas con xoconostle. En cambio, en las diabéticas suplementadas sólo con agua y las sanas que recibieron la mezcla de fruto y cladodio se presentó un incremento ($p<0.05$) en la concentración plasmática de este compuesto. Así, es probable que alguna sustancia presente en los suplementos de xoconostle esté interfiriendo en la síntesis del péptido-C en las ratas diabéticas. Posiblemente provocando una disminución en la concentración de glucosa sérica, pues por lo que se aprecia en las ratas diabéticas que recibieron sólo agua sí hubo indicios de regeneración de las células β pancreáticas.

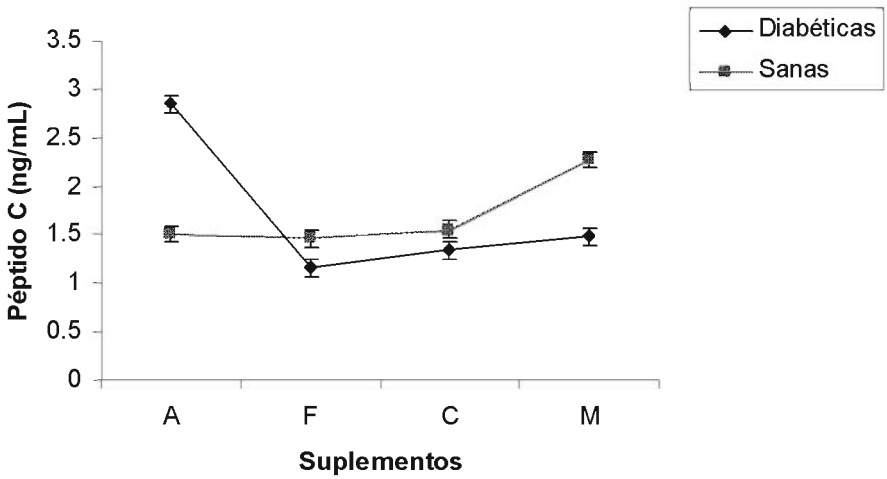


Figura 6. Efecto de las suplementación con agua (A) y con fruto (F), cladodio (C) y mezcla equitativa de fruto y cladodio (M) de *O. joconostle* en la concentración de péptido-C en sangre de ratas diabéticas y en sanas (Los valores son medias ± error estándar; n: 2).

En la Figura 7 se resumen los cambios relativos en el peso corporal durante el período experimental de ratas diabéticas y de sanas que consumieron 100 mg/kg de los suplementos. Al inicio del experimento todas las unidades experimentales tenían un peso similar (250 a 300 g). Al final,

las ratas diabéticas y las sanas suplementadas con agua presentaron ganancia de peso corporal estadísticamente similar, con un aumento del 50% ± 5. Por otra parte, el menor porcentaje de ganancia de peso (31.50% ± 1.57) correspondió a las ratas diabéticas suplementadas con cladodio. En las ratas diabéticas suplementadas con el fruto y con la mezcla la ganancia de peso fue estadísticamente igual a las suplementadas con agua, y a la vez dicha ganancia fue similar a la registrada para las ratas sanas excepto para las sanas suplementada con la mezcla de fruto y cladodio, las cuales presentaron la mayor ($p<0.01$) ganancia de peso (69.3% ± 3.5).

La menor ganancia relativa de peso de las ratas diabéticas suplementadas con cladodio concuerda con la tendencia general que presentan los pacientes diabéticos con el tiempo, quienes van perdiendo peso cuando no reciben un tratamiento adecuado. Esto concuerda con la mayor concentración de glucosa registrada para la suplementación con cladodio. El hecho de que la suplementación con fruto y mezcla de fruto y cladodio a ratas diabéticas le produjera una ganancia de peso estadísticamente similar a la de las ratas sanas, acredita su efecto hipoglucemiante.

El mecanismo específico del efecto hipoglucemiante del fruto de xoconostle es desconocido; sin embargo, se han postulado diversas hipótesis al respecto, como el aumento en la liberación de insulina a través de la estimulación de las células β pancreáticas; resistencia a las hormonas que aumentan la cantidad de glucosa; aumento del número y sensibilidad de sitios receptores de insulina; disminución de la pérdida de glucógeno; aumento del consumo de glucosa por los tejidos y órganos; mayor eliminación de radicales libres; mayor resistencia a la peroxidación de lípidos; corrección del desórden metabólico causada en lípidos y proteínas; y estímulo a la micro circulación de la sangre en el organismo (Marles y Farnsworth,1995; Volpato *et al.*, 2002; Said *et al.*, 2002; Huo *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2003; Budinsky *et al.,* 2001)

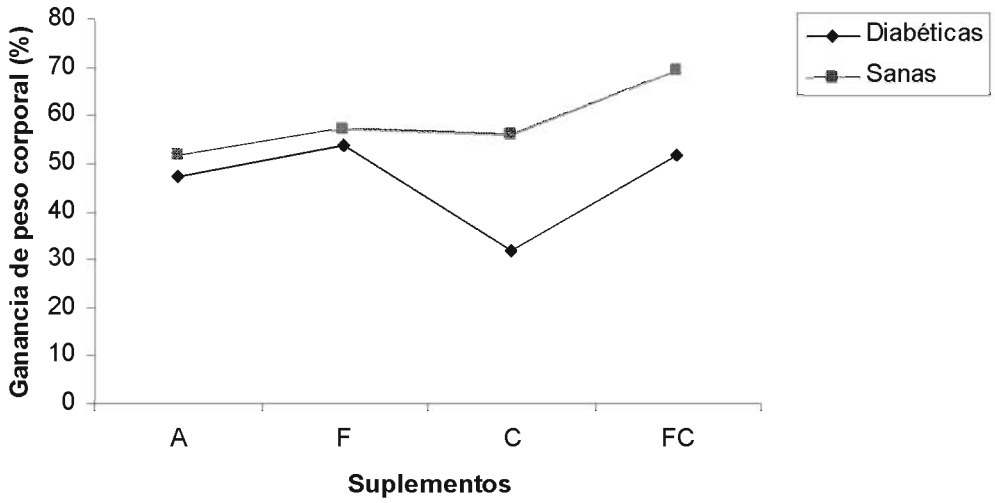


Figura 7. Ganancia relativa de peso corporal ([peso final - peso inicial]*100/peso inicial) de ratas diabéticas y sanas suplementadas durante 12 semanas con (100 mg /kg) fruto (F), cladodio (C) y mezcla equitativa de fruto y cladodio (M) de *O. joconostle* (Los valores son medias ± error estándar; n=6).

Con base en los resultados obtenidos, a que *O. joconostle* es un alimento frecuente del mexicano, y que tradicionalmente es usado para el tratamiento de la DM2, parece muy justificable la realización de estudios clínicos en humanos para esclarecer adecuadamente sus potencialidades como hipoglucemiante o coadyuvante con otras medicinas en el tratamiento de la DM2. A la vez, es importante también identificar y elucidar la estructura química de los compuestos presentes en el fruto y cladodio de esta especie, para así poder identificar el o los metabolitos responsables de los efectos antidiabéticos.

4. Conclusiones

Con base en los resultados obtenidos en el presente estudio podemos concluir que:

La administración de STZ por vía intraperitonial es eficiente en la inducción de la DM, y que su grado de severidad está relacionado con la dosis del fármaco (40mg/kg peso corporal).

La administración oral de 100mg/kg de peso corporal de extractos crudos liofilizados de fruto, cladodio y mezcla equitativa de fruto y cladodio de *O. joconostle* en ratas sanas y en ratas con diabetes inducida por STZ es eficiente en la reducción de la concentración de glucosa sérica, triglicéridos, así como en la HbA1c. Sin embargo, el fruto presentó mayor efecto en la hiperglucemia e hiperlipidemia.

Como la DM es un desorden crónico degenerativo y requiere terapia prolongada, se sugiere que el tratamiento alternativo continuo con suplemento de frutos y cladodios *O. joconostle* podría en los humanos prevenir y controlar las complicaciones de la DM2. Sin embargo, es necesario llevar a cabo más investigación farmacológica y química para definir el o los principios activos y su o sus mecanismos de acción.

5. Bibliografía

Alarcón-Aguillar, F.J., Valdes-Arzate, A., Xolalpa-Molina, S., Banderas-Dorantes, T., Jiménez-Estrada, M., Hernandez-Galicia, E., Roman-Ramos, R., 2003. Hypoglycemic Activity of Two Polysaccharides Isolated from *Opuntia ficus-indica* and *O. streptacantha*. Proc. West. Pharmacol. Soc. 46: 139-42.

Allain, C.C.,Poon, L.S., Chan, C.S., Richmond, W., Fu, P.C.,1974. Enzimatic determination of serum cholesterol. Clin. Chem. 20:470.

Anderson, E. F., 2001. The Cactus Family. Timber Press, Oregon. 776 p.

Andrade-Cetto, A., Heinrich, M., 2005. Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. Journal of Ethnopharmacology. 99:325–348.

Annoni, G., Bottasso, B.M., Ciaci, D., Donato, M. F., Tripodi, A., 1982. LAB. 9:115-118.

Anónimo 1994. Norma Oficial Mexicana NOM-015-SSA2, para la prevención, tratamiento y control de la diabetes [en línea]. Secretaria de Salud. URL:<http://www.salud.gov.mx/unidades/cdi/nom/mo015ssa24.htlm> [Consulta: 02 de junio de 2007].

Anónimo 1999. Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO, especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. [en línea]. URL:<http://www.sagarpa.gob.mx/Dgg/NOM/062zoo.pdf> [Consulta: 02 de junio de 2007].

Arias, S.M., 1997. General Distribution of Cacti. In: Valles S., C., Rodríguez P., L. (Eds.) Suculentas mexicanas Cactáceas. Conabio, Samarnat, UASLP, CVS Publicaciones, México.

Aybar, M., Sanchez-Riera, A.N., Grau, A., Sanchez, S.S., 2002. Hipoglucemic effect of the water extract of *Smallanthus soncifolius* (yacon) leaves in normal and diabetic rats. J. Ethnopharmacol. 74:125-132.

Bautista, C.R., 1982. Los agrosistemas nopaleros del Valle de México. Tesis Profesional. Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas, Universidad Autónoma de Chapingo. Chapingo, México. 92p.

Beischer, W., 1983. Proinsulin and C-Peptid in humans. In: Fotherby, K., Pal, S., editors. Hormones in Normal and Abnormal Human Tissues. Vol 3. Berlin: Walter DeGruyter.

Beyer, J., Krause, U., Cordes, U., 1979. C-Peptide: its biogenesis, structure, determination and clinical significance. Giornale Ital Chem Clin. 4 Suppl 1:9-22.

Bonser, A., Garcia-Webb, P., 1984. C-Peptide measurement: methods and clinical utility. CRC Crit Rev Clin Lab Sci. 19:297-352.

Bwititi, P.T., Musabayane, C.T., Nhachi, C.B., 2000. Effects of *Opuntia megacantha* on blood glucose and kidney function in streptozotocin diabetic rats. Journal Ethnopharmacology 69, 247-52.

Bwititi, P.T., Machakaire, T., Nhachi, C.B., Musabayane, C.T., 2001. Effects of *Opuntia megacantha* leaves extract on renal electrolyte and fluid handling in streptozotocin (STZ) – diabetic rats. Ren Fail. 23, 149-58.

Bravo-Hollis, H., 1978. Las cactáceas de México. 2ª Ed. Vol I. Universidad Autónoma de México. México. 743p.

Bravo-Hollis, H., Sánchez-Mejorada, H., 1991. Las cactáceas de México. 1ª Ed. Vol. III. Universidad Autónoma de México. México. 643p.

Buccolo, G., David, M. 1973. Clin. Chem. 19:476.

Budinsky, A., Wolfram, R., Oguogho, A., Efthimiou, Y., Stamatopoulos, Y., Sinzinger, H., 2001. Regular ingestion of *Opuntia robusta* lowers oxidation injury. Prostaglandis Leukot Essent Fatty Acids. 65, 45-50.

Burrin, J.M., Prince, C.P., 1985. Measurement of blood glucose. Ann. Clin. Biochem. 22:327.

Burtis, C.A., Ashwood, E.R., Ed. Tietz. 1994. Textbook of Clinical Chemistry. 2d. Ed. Philadelphia, PA, WB Saunders.

Campillo, A.J., 2001. Insulina: biosíntesis, acciones y mecanismos. Resistencia insulínica. En: A. Jara. A. (Ed.) Endocrinología. Editorial Médica Panamericana. Madrid, España. 920p.

Castillo G., E., 2002. Productos Naturales y Diabetes. En: Lopez-Castellano, A.C., Silvestre-Castellano, M.D., Villagrasa-Sebastian, V. (Eds.) Diabetes mellitus, aspectos fisiopatológicos, terapéuticos y sociales. Universidad Carden al Herrera-CEU. pp. 49-61.

Durán-Varela, B.R., Rivera-Chavira, B., Franco-Gallegos, E., 2001. Apego al tratamiento farmacológico en pacientes con diagnostico de Diabetes Mellitus tipo 2. Salud pública de México. Vol.43, nº 3.

Frati-Munari, A.C., Gordillo, B.E., Altamirano, P., Ariza, C.R., 1988. Hypoglycemic effect of *Opuntia streptacantha* Lemaire in NIDDM. Diabetes Care. 11(1):63-6.

Frati-Munari, A.C., de León, C., Ariza-Andraca, C.R., Banales-Ham, M.B., López-Ledesma, R., Lozoya, X., 1989. Effect of a desydrated extract of nopal (*Opuntia ficus indica* Mill.) on blood glucose. Arch Invest Med. 20(3):211-216.

Frati-Munari, A.C., Del Valle-Martínez, L.M., Ariza-Andraca, C.R., Islas-Andrade, S., Chavez-Negrete, A. 1989a. Hypoglycemic action of different doses of nopal (*Opuntia streptacantha* Lemaire) in patients with type II diabetes mellitus. Arch Invest Med. 20(2):197-201.

Frati-Munari, A.C., Rios-Gil, U., Ariza-Andraca, C.R., Islas-Andrade, S., Lopez-Ledesma, R. 1989b. Duration of the hypoglycemic action of *Opuntia streptacantha* Lem. Arch Invest Med. 20(4):297-300.

Frati-Munari, A.C., Altamirano-Bustamente, E., Rodriguez-Barcenas, N., Ariza-Andraca, C.R., Lopez-Ledesma, R., 1989c. Hiperglycemic action of *Opuntia streptacantha* Lemaire: study using raw extracts. Arch Invest Med. 20(4):321-5.

Frati-Munari, A.C., Xilotl-Diaz, N., Altamirano, P., Ariza-Andraca, C.R., Lopez-Ledesma, R. 1991. The effect of two sequential doses of *Opuntia streptacantha* upon glycemia. Arch Invest Med. 22(3-4):333-6.

Frati-Munari, A.C., Vera-Lastra, O., Ariza-Andraca, C.R. 1992. Evaluation of nopal capsules in diabetes mellitus. Gac Méd Méx. 128(4):431-6.

Ganong, W. F., 2002. Fisiología Médica. 17ª Ed. Editorial El Manual Moderno. D.F., México. 944p.

García P., L.G., 2004. Fruto deshidratado y pulverizado de cuatro especies de xoconostle (*Opuntia duranguensis*, *O. joconostle*. *O. leucotricha* y *O. matudae*) como condimentos y aperitivos. Tesis profesional. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Facultad de Ingeniería. San Luis Potosí, S.L.P. 56p.

García-Pedraza, L.G., Reyes-Agüero, J.A., Aguirre-Rivera, J.R., Pinos-Rodríguez, J.M., 2005. Preliminary nutricional and organoleptic assessment of xoconostle fruit (*Opuntia* spp.) as a condiment or appetizer. Ital.J. Food. Sci. 17(3):333-340.

Gonzáles D., A., Riojas L., M. E., Arreola N., H. J., 2001. El género *Opuntia* en Jalisco. Guía de campo. Universidad de Guadalajara y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Diversidad. Guadalajara, Jalisco. 135p.

Gonen, G., Rubenstein, A.H., Horwitz, D.L., Blix, P.M.,1979. Clinical significance of C-Peptide. In: Baba, S., Kaneko, T., Yanaihara, N., (Eds.) Proinsulin, Insulin, C-Peptide. Amsterdam: Excerpta medica. 246-53.

Gomes, A., Vedasiroromoni, J.R., Das, M., Sharma, R.M., Ganguly, D.K., 2001. Anti-hyperglucemic effect of black tea (*Camellia sinensis*) in rat. J. Ethnopharmacol. 45(3):234-275.

Gordon, T., Castelli, W.P., Hjortland, M.C., Kannel, WB, Dawber, T.R., 1977. High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. Am. J. Med. 62:707-714.

Grundy, S.M., 1993. Summary of the Second Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expet Panel on Detection, Evaluation and

Treatment of Blood Cholesterol in Adults (Adult treatment panel II). JAMA. 269:3015-23.

Hernández-Ávila, M., Olaíz-Fernández, G., 2002. La diabetes y el mexicano: un reto para la salud pública. Ciencia. 53(3): 8-17.

Hernández-Galicia, E., Aguilar-Contreras, A., Aguilar-Santamaria, L., Roman-Ramos, R., Chavez-Miranda, A.A., Garcia-Vega, L.M., Flores-Saenz, J.L., Alarcón-Aguilar, F.J., 2002. Studies on Hypoglycemic Activity of Mexican Medicinal Plants. Proc. West. Pharmacol. Soc. 45:118-124.

Horwitz, D., 1975. Proinsulin, insulin and C-Peptide concentrations in human portal and peripheral blood. J Clin Invest. 55:1278-83.

Horwitz, D., Kuzuya, H., Rubenstein, A.H., 1976. Circulating serum C-Peptid. N Engl J Med. 295:207-9.

Hou, C.C., Lin, S.J., Cheng, J.T., Hsu, F.L., 2003. Antidiabetic dimeric guianolides and a lignan glycoside from Lactuca indica. J. Nat. Prod. 66(5):625-629.

Huang, X., Hulgren, B., Dybdal, N., Stewart, T.A., 1994. Islet expression of interferon-alpha precedes diabetes in both the BB rat and streptozotocin treated mice. Immunity 1:469-478.

Ibáñez-Camacho, R., Roman-Ramos, R., 1979. Hypoglycemic effect of *Opuntia* cactus. Arch Invest Med. 10(4):223-30.

Ibáñez-Camacho, R., Meckes-Lozoya, M., 1983. Efecto de un producto semipurificado obtenido de *Opuntia straptacantha* L. (Nopal) sobre la glucemia y trigliceridemia del conejo. Arch Invest Med. Vol. 14, Nº. 4.

Junge, W., Wilke, B., Halabi, A., 2003. Determination of reference intervals in adults for hemoglobin A1c (HbA1c). Poster presentation 18th. International Diabetes Federation Congress, Paris.

Karl, J. *et al.*, 1993. Development and Standardization of a New Immunoturbidimetric HbA1c Assay. Klin Lab. 39:991-996.

Kiss, A.C.I., Takaku, M., Damasceno, D.C., Campos K.E., Sinzato, Y.K., Lima, P.O., Volpato, G.T. 2006. Efeito do extrato aquoso de Allium sativum L. sobre parâmetros bioquímicos de ratas com diabete induzido por Streptozotocin. Rev. Bras. Pl. Med. 8(3):24-30

Laurenz, J.C., Collier, C.C., Kuti, J.O., 2003. Hipoglycaemic effect of *Opuntia lindheimeri* Englem in a diabetic pig model. Phytother Res.17(11):26-9.

Li, S.Q. Covino, N.D., Stein, E.G., Till, J.H., Hubbard, S.R., 2003. Structural and biochemical evidence for an autoinhibitory role for tyrosine 984 in the juxtamembrane region of the insulin receptor. J. Biol. Chem. 278:26007-26014.

Martínez-Valls, J.F., Sanahuja-Santafé, M.A., 2002. Fisiopatologia de la Diabetes Mellitus. En: Lopez-Castellano, A.C., Silvestre-Castellano, M.D., Villagrasa-Sebastian, V., Diabetes Mellitus aspectos fisiopatológicos, terapéuticos y sociales. Universidad Cardenal Herrera-CEU. pp. 9-15.

Marles, R.J., Farnsworth, N.R., 1995. Antidiabetic plants and their active constituents. Review. Phytomedicine. 2:137-189.

Mathews, K.C., Van Holde, K.E., Ahern, K.G., 2002. Bioquímica. 3ª Ed. Addison Wesley. Madrid.1335p.

Meckes-Lozoya, M., Ibáñez-Camacho, R., 1989. Hypoglucemic activity of *Opuntia streptacantha* throughout its annual cycle. Am J Chin Med. 17(3-4):221-4.

Navarro H., L.S., Bandeja M., B., Ávila U., M., Meléndez C., M.E., Guerra T., A., Villegas, M., 2001. Estúdio de la actividad hipoglucemiante de *Opuntia streptacantha* (nopal cardón). Escola Nacional de Ciencias Biológicas IPN, IV Congresso Mexicano de Etnobiología Ecologica. México, D.F.

O´Brien, B.A., Harmon, B.V., Cameron, D.P., Allan, D.J., 1996. Beta-cell apoptosis is responsible for the development of IDDM in the multiple low-dose streptozotocin models. J. Pathol. 178(2):176-81.

Pérez-Vargas, E., Bautista P., S., Bazaldúa B., A., 2006. Representación cognitiva de la Diabetes Mellitus en adultos no diagnosticados. UNAM, México. URL:<http://www.psicologiacientifica.com/bv/psicologia-65-1-representacion-cognitiva-de-la-diabetes-mellitus-en-adultos-.html> [Consulta: 15 de mayo de 2007].

Pimenta-Barrios, E., Méndez-Moran, L., Ramirez, B. *et al.*, 1994. Effect of the ingestion of xoconostle fruit (*Opuntia joconostle* Web.) on glycemia and serum lipids. En: Felker, P., Moss, J.R. (Eds.). Proceedings Fifth Annual Texas Prickly Pear Council. Texas, USA. pp. 51-60.

Polonsky, K.S., Rubenstein, A.H., 1984. C-Peptide as a measure of the secretion and hepatic extraction of insulin; pitfalls and limitations. Diabetes. 33:486-93.

Rendell, M., 1983. Expanding clinical use of C-Peptide radioimmunoassay. Acta Diabetol Lat. 20:105-13.

Reynolds, S.G., Arias, E., 2001. Introducción. In: Mandrágon-Jacobo, C., Pérez-Gonzáles, S., (Eds.). pp. 1-4. Cactus (*Opuntia* ssp.) as forage. FAO. Plant production paper. pp. 169-146.

Rifai, N., Warnick, G.R. (Ed.). 1994. Ed. Laboratory Measurement of Lipids, Lipoproteins and Apolipoproteins. Washington, DC, AACC Press.

Roman-Ramos, R., Flores-Saenz, J.L., Partida-Hernandez, G., Lara-Lemus A., Alarcón-Aguilar, F., 1991. Experimental study of the hypoglycemic effect of some antidiabetic plants. Arch Invest Med. 22(1):87-93.

Román-Ramos, R., Flores-Saenz, J.L., Alarcón-Aguilar, F.J., 1995. Anti-hyperglycemic effect of some edible plants. J Ethnopharmacol. 48(1):25-32.

Rubenstein, A. H., Kazuya, H., Horwitz, D.L., 1977. Clinical significance of circulating C-Peptide in Diabetes mellitus and hypoglycemic disorders. Arch Intern Med. 137:625-32.

Said, O., Khalil, K., Fulder, S., Azaizeh, H., 2002. Ethnopharmacological survey of medicinal herbs in Israel, the Golan Heights and the West Bank Region. J. Ethnopharmacol. 83(15):251-265.

Santamaría, F. J., 1992. Diccionario de mejicanismos. 5ª Ed. Porrúa, México. 1207p.

Sánchez, V., Figueroa, S.G. y M.L., 1994. Distribución y variación de *Opuntia joconostle* Weber en el estado de Zacatecas. Geografía Agrícola. 20:69-78.

Scheinvar, L., 1999. Biosistemática de los joconostles mexicanos y su potencial económico. En: Aguirre R., J.R. y Reyes A., J.A. (Eds.). Memoria del VIII Congreso Nacional y VI Internacional sobre el Conocimiento y

Aprovechamiento del Nopal. UASLP. San Luis Potosí, SLP. México. pp. 255-274.

Starr, C., McMillan, B., 2007. Human Biology. 7ª ed. Thompson Higher Education. Belmont, USA. 488p.

Strowski, M.Z., Li, Z., Szalkowski, D., Shen, X., Guan, X.M., Juttner, S., Moller, D.E., Zhang, B.B., 2004. Small-molecule insulin mimetic reduces hyperglycemia and obesity in a nongenetic mouse model of type 2 diabetes. Endocrinology 145(11):5259-5268.

Subash-Babu, P., Prabuseennivasan, S., Ignacimuthu, S., 2006. Cinnamaldehyde-A potential antidiabetic agent. J. Phytomedicine 14:15-22.

Toporek, M., 1984. Bioquímica. 3ª Ed. Interamericana. D.F., México. 523 p.

Trinder, P., 1969. Ann. Clin. Biochem. 6:24.

Trejo-González, A., Gabriel-Ortiz, G., Puebla-Pérez, A.M., Guísar-Contreras, M.D., Munguía-Mazariegos, M.R., Mejía-Arreguin, S., Calva, E., 1996. A purified extract from prickly pear cactus (*Opuntia fuliginosa*) controls experimentally induced diabetes in rats. J Ethnopharmacol. 55(1):27-33.

Turk, J., Corbett, J.A., Ramanadham, S., Bohrer, A., Daniel, L., 1993. Biochemical evidence for nitrix oxid formation from streptozotocin in isolated pancreatic islets. Biochem. Biophisys. Res. Commun. 197:1458-1464.

Turkington, R.W., Estkowski, A., Link, M., 1982. Secretion of insulin or connecting peptide; a predictor of insulin dependence of obese diabetics. Arch Intern Med. 142:1102-5.

Varela-Moreira, G., Silvestre-Castelló, M.D., 2002. Nuevas Pautas diabéticas en la Diabetes. En: Lopez-Castellano, A.C., Silvestre-Castellano, M.D., Villagrasa-Sebastian, V. (Eds.) Diabetes mellitus, aspectos fisiopatológicos, terapéuticos y sociales. Universidad Carden al Herrera-CEU. pp. 23-40.

Volpato, G.T., Damasceno, D.C., Calderon, I.M.P., Rudge, M.V.C., 2002. Revisão de plantas brasileiras com comprovado efeito hipoglicemiante no controle do Diabetes Mellitus. Rev. Bras. Pl. Med. 4:35-45.

Werner, M., Gabrielson, D.G., Eastman, G., 1981. Clin. Chem. 21:268.

Wild, S., Roglic, G.A., Sicree, R., King, H., 2004. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. Diabetes Care 27:1047-1053.

Wolfram, R.M., Kritz, H., Efthimiou, Y., Stomatopoulos, J., Sinzinger, H., 2002. Effect of prickly pear (*Opuntia robusta*) on glucose and lipid – metabolism in non-diabetics with hyperlipidemia – a pilot study. Wien Klin Wochenschr. 114(19-20):840-6.

Zárate, H.M., Ramírez, R. 2007. Sistema de Vigilancia Epidemiológica Hospitalária de Diabetes Tipo 2. Secretaría de Salud. México. URL:< http://www.dgepi.salud.gob.mx/diveent/DM-2-NEW/1-Manual-SVEHDM.pdf> [Contulta en: 10 de junio de 2007].

Zavaleta-Beckler, P., Olivares-Orozco, L.J., Montiel-Salero, D., Chimal-Hernández, A., Scheinvar, L., 2001. Organic Fertilization in sour prickly pear (*Opuntia Joconostle* and *O. matudae*). Agrociencia. 35:609-614.

ANEXOS

SERA-PAK® Plus

TRIGLYCERIDES

STABLE LIQUID

Product No. 01216897	6 x 50 mL
Product No. 05870001	6 x 100 mL
Product No. 00657539	2 x 100 mL

INTENDED USE

For *in vitro* diagnostic use

SERA-PAK® Plus reagents are designed for use with manual methods and commercially available automated analyzers. Refer to the application sheet for instructions and specifications for use with automated analyzers.

Do not use this reagent for any purpose other than that described herein.

PRINCIPLE

Glycerol released from the hydrolysis of triglycerides by lipoprotein lipase is converted by glycerokinase into glycerol-3-phosphate, which is oxidized by glycerolphosphate oxidase to dihydroxyacetone phosphate and hydrogen peroxide. In the presence of peroxidase, hydrogen peroxide oxidizes the chromogen (4-aminoantipyrine / p-chlorophenol) to a red-colored compound.

REAGENT COMPOSITION

Reagent:

Pipes buffer, pH 7.00	50 mmol/L
p-Chlorophenol	2.7 mmol/L
Potassium ferrocyanide	10 µmol/L
Magnesium salt	4.8 mmol/L
4-Aminoantipyrine	0.31 mmol/L
ATP	3.14 mmol/L
Lipoprotein Lipase	≥ 1900 U/L
Glycerol Kinase	≥ 500 U/L
Glycerol-3-phosphate oxidase	≥ 4000 U/L
Peroxidase	≥ 500 U/L
Sodium azide	0.052 %

Standard:

Glycerol (triglyceride equivalent)	200 mg/dL
	2 g/L
	2.28 mmol/L
Sodium azide	0.011 %

REAGENT STABILITY

When stored at 2° C to 8° C and protected from light, the reagents are stable until the expiration date stated on the label.

Discard cloudy reagent.

PRECAUTIONS

Contains sodium azide. Sodium azide can react with copper and lead plumbing to form explosive metal azides. On disposal into a drain, if this method of disposal is in compliance with federal, state, and local requirements, flush reagents with a large volume of water to prevent the buildup of azides.

WORKING REAGENT PREPARATION

The reagent is ready for use.

When stored at 2° C to 8° C, protected from light, and kept free from contamination, the reagents are stable until the expiration date stated on the label.

SAMPLES

Serum, free of hemolysis

Heparin, EDTA, or citrate plasma

PROCEDURE

Wavelength:	500 nm
Temperature:	37° C
Cuvette:	1-cm light path

Read against reagent blank.

	BLANK	STANDARD	SAMPLES
Reagent	1 mL	1 mL	1 mL
Distilled water	10 µL	-	-
Standard	-	10 µL	-
Sample	-	-	10 µL

Mix and, after a 10-minute incubation, measure the optical density (OD).

CALCULATION

$$\frac{\Delta OD\ Sample}{\Delta OD\ Standard} \times n$$

n = 200 mg/dL
n = 2 g/L
n = 2.28 mmol/L

n = standard concentration

REFERENCE VALUES

Male:	60 - 165	mg/dL
	0.60 - 1.65	g/L
	0.68 - 1.88	mmol/L
Female:	40 - 140	mg/dL
	0.40 - 1.40	g/L
	0.46 - 1.60	mmol/L

LINEARITY

If a sample exceeds 800 mg/dL, dilute the sample (one part with nine parts saline solution), repeat the test, and multiply the result by 10.

BIBLIOGRAPHY

Annoni G, Bottasso BM, Ciaci D, Donato MF, Tripodi A. *LAB.* 9:115–118 (1982)

Buccolo G, David M. *Clin. Chem.* 19:476 (1973)

Werner M, Gabrielson DG, Eastman G. *Clin. Chem.* 21:268 (1981)

SERA-PAK® Plus

CHOLESTEROL

STABLE LIQUID

T

R20/21/22, R10, R60, R61
S53, S45

Product No. B01-4506-01 6 x 100 mL
Product No. 03746273 2 x 100 mL

INTENDED USE

For *in vitro* diagnostic use.

SERA-PAK® Plus reagents are designed for use with manual methods and commercially available automated analyzers. Refer to the application sheet for instructions and specifications for use with automated analyzers.

Do not use this reagent for any purpose other than that described herein.

PRINCIPLE

Cholesterol esters are hydrolyzed by cholesterol ester hydrolase to free cholesterol and fatty acids. Existing free cholesterol together with that produced by this reaction is oxidized by cholesterol oxidase to Δ4-cholestenone and hydrogen peroxide. The latter, in the presence of peroxidase, oxidizes the chromogen system (4-aminoantipyrine / phenol) to a red-colored compound.

REAGENT COMPOSITION

Reagent:

Pipes buffer, pH 6.70	50 mmol/L
Phenol	24 mmol/L
Sodium cholate	5 mmol/L
4-Aminoantipyrine	0.5 mmol/L
Cholesterol esterase	≥ 180 U/L
Cholesterol oxidase	≥ 200 U/L
Peroxidase	≥1,000 U/L
Sodium azide	0.05 %

Standard:

Cholesterol	200 mg/dL
	2 g/L
	5.17 mmol/L
2-Methoxyethanol	99.8 %

REAGENT STABILITY

When stored at 2° C to 8° C and protected from light, the reagents are stable until the expiration date stated on the label.

Discard cloudy reagent.

PRECAUTIONS

TOXIC! The standard contains 2-methoxyethanol. Avoid exposure — obtain special instructions before use. Harmful by inhalation, in contact with skin, and if swallowed. Flammable. May impair fertility. May cause harm to the unborn child. In case of accident or if you feel unwell, seek medical advice immediately (show the label where possible).

The reagent contains sodium azide. Sodium azide can react with copper and lead plumbing to form explosive metal azides. On disposal into a drain, if this method of disposal is in compliance with federal, state, and local requirements, flush reagents with a large volume of water to prevent the buildup of azides.

WORKING REAGENT PREPARATION AND STABILITY

The reagent is ready for use.

When stored at 2° C to 8° C, protected from light, and kept free from contamination, the reagents are stable until the expiration date stated on the label.

SAMPLES

Serum
Heparin plasma

PROCEDURE

Wavelength: 500 nm (492–550)
Temperature: 37° C
Cuvette: 1-cm light path

Read against reagent blank.

	BLANK	STANDARD	SAMPLE
Reagent	1 mL	1 mL	1 mL
Distilled water	10 µL	-	-
Standard (200mg/dL)	-	10 µL	-
Sample	-	-	10 µL

Mix and, after a five-minute incubation, read the optical density (OD).

The final color is stable for at least one hour.

CALCULATION

$$\frac{\Delta OD\ Sample}{\Delta OD\ Standard} \times n$$

n = 200 mg/dL
n = 2 g/L
n = 5.17 mmol/L

n = standard concentration

REFERENCE VALUES

150 – 260 mg/dL
1.5 – 2.6 g/L
3.87 – 6.71 mmol/L

LINEARITY

If a sample exceeds 600 mg/dL, dilute the sample (one part with four parts saline solution), repeat the test, and multiply the result by five.

BIBLIOGRAPHY

Allain CC et al. *Clin. Chem.* 20:470 (1974)

Report of the national cholesterol education program expert panel on detection, evaluation and treatment of high blood cholesterol in adults. *Arch Intern Med.* 148:36 (1988)

SERA-PAK® Plus

GLUCOSE

STABLE LIQUID

Product No. 801-4509-01 6 x 100 mL
Product No 06815098 2 x 100 mL

INTENDED USE

For *in vitro* diagnostic use.

SERA-PAK Plus® reagents are designed for use with manual methods and commercially available automated analyzers. Refer to the application sheet for instructions and specifications for use with automated analyzers.

Do not use this reagent for any purpose other than that described herein

PRINCIPLE

Glucose is converted by glucose oxidase into gluconic acid and hydrogen peroxide, which in the presence of peroxidase oxidizes the chromogen (4-aminoantipyrine / phenol) to a red-colored compound.

REAGENT COMPOSITION

Reagent:

Phosphate buffer, pH 7.40	13.8 mmol/L
Phenol	10 mmol/L
4-Aminoantipyrine	0.3 mmol/L
Glucose oxidase	≥10,000 U/L
Peroxidase	≥ 700 U/L
Sodium azide	0.05 %

Standard:

Glucose	100 mg/dL
	1 g/L
	5.56 mmol/L

REAGENT STABILITY

When stored at 2° C to 8° C and protected from light, the reagent is stable until the expiration date stated on the label.

Discard cloudy reagent.

PRECAUTIONS

The reagent contains sodium azide. Sodium azide can react with copper and lead plumbing to form explosive metal azides. On disposal into a drain, if this method of disposal is in compliance with federal, state, and local requirements, flush reagents with a large volume of water to prevent the buildup of azides

WORKING REAGENT PREPARATION AND STABILITY

The reagent is ready for use

When stored at 2° C to 8° C, protected from light, and kept free from contamination, the reagents are stable until the expiration date stated on the label.

SAMPLES

Serum, free of hemolysis
Heparin fluoride plasma, free of hemolysis
Cerebral spinal fluid

PROCEDURE

Wavelength:	500 nm (492–550)
Temperature:	37° C
Cuvette:	1-cm light path

Read against reagent blank.

	BLANK	STANDARD	SAMPLE
Working Reagent	1 mL	1 mL	1 mL
Distilled water	10 µL	-	-
Standard	-	10 µL	-
Sample	-	-	10 µL

Mix and, after a 10-minute incubation, measure the optical density (OD).

The final color is stable for at least one hour.

REFERENCE VALUES

Serum, plasma:	70 – 105 mg/dL
	0.70 – 1.05 g/L
	3.89 – 5.84 mmol/L
Cerebral spinal fluid:	50 – 70 mg/dL
	0.50 – 0.70 g/L
	2.78 – 3.89 mmol/L

CALCULATION

$$\frac{\Delta OD\ Sample}{\Delta OD\ Standard} \times n$$

n = 100 mg/dL
n = 1 g/L
n = 5.56 mmol/L

n = standard concentration

LINEARITY

If a sample exceeds 400 mg/dL, dilute the sample (one part with four parts saline solution), repeat the test, and multiply the result by five.

BIBLIOGRAPHY

Trinder P. *Ann. Clin. Biochem* 6:24 (1969)

Burtis JM, Price CP. Measurement of blood glucose. *Ann. Clin. Biochem.* 22:327 (1985)

SERA-PAK® Plus

HDL CHOLESTEROL DIRECT

IMMUNOINHIBITION METHOD
STABLE LIQUID

Producto No. B01-4577-01 1 x 45 mL
Producto No. B01-4538-01 3 x 45 mL

INTENDED USE

For *in vitro* diagnostic use.

SERA-PAK® Plus reagents are designed for use with manual methods and commercially available automated analyzers. Refer to the application sheet for instructions and specifications for use with automated analyzers.

Do not use these reagents for any purpose other than that described herein.

PRINCIPLE

Anti-human-β-lipoprotein antibody in Reagent 1 binds to lipoproteins (LDL, VLDL and chylomicrons) other than HDL. The antigen-antibody complexes formed block enzyme reactions when Reagent 2 is added. Cholesterol esterase and cholesterol oxidase in Reagent 2 react only with HDL Cholesterol. Hydrogen peroxide produced by the enzyme reactions with HDL Cholesterol yields a blue-color complex upon oxidative condensation of F-DAOS [(N-ethyl-N-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-3,5-dimethoxy-4-fluoroaniline], sodium salt, and 4-aminoantipyrine (4-AA) in the presence of peroxidase.

By measuring the absorbance of the blue-color complex produced at the optimum wavelength of 593 nm, the HDL Cholesterol concentration in the sample can be calculated when compared with the absorbance of the HDL Cholesterol Calibrator.

REAGENT COMPOSITION

Reagent 1 (Pretreatment):

Good's buffer, pH 7.0		30 mmol/L
4-Aminoantipyrine		0.9 mmol/L
Peroxidase	≥	2,400 U/L
Ascorbate oxidase	≥	2,700 U/L
Anti human β-lipoprotein antibody		

Reagent 2 (Enzyme Reagent):

Good's buffer, pH 7.0		30 mmol/L
Cholesterol esterase	≥	4,000 U/L
Cholesterol oxidase	≥	20,000 U/L
F-DAOS		0.8 mmol/L

Calibrator:

Use HDL Cholesterol Calibrator B03-4594-54. Calibrator is not provided with the kit
Refer to the insert in the calibrator kit.

REAGENT STABILITY

When stored at 2° C to 8° C and protected from light, the reagents are stable until the expiration date stated on the label.

Do not use pretreatment reagent that has been frozen.

Do not freeze.

Discard cloudy reagents.

WORKING REAGENT PREPARATION AND STABILITY

The reagents are ready for use.

When stored at 2° C to 8° C, protected from light, and kept free from contamination, the reagents are stable until the expiration date stated on the label.

SAMPLES

Serum

Note: It is recommended that HDL Cholesterol be measured immediately after collection.

When triglycerides in a sample exceed 1,200 mg/dL, dilute the sample with a saline solution, repeat the assay, and multiply the result by the dilution factor.

PROCEDURE

Wavelength: 600 nm (blank, 700 nm)
Temperature: 37° C
Cuvette: 1-cm light path

Read against reagent blank.

	BLANK	CALIBRATOR	SAMPLE
Reagent 1	270 µL	270 µL	270 µL
Distilled water	3 µL	-	-
Calibrator	-	3 µL	-
Sample	-	-	3 µL

Mix, wait four minutes, read the optical density, and add:

Reagent 2: 90 µL

Mix and, after a five-minute incubation, measure the optical density (OD).

CALCULATION

$$\frac{\Delta \text{ OD Sample}}{\Delta \text{ OD Calibrator}} \times n$$

n = calibrator concentration

REFERENCE VALUES

Adult male: 35.3 – 79.5 mg/dL
0.35 – 0.79 g/L
0.92 – 2.07 mmol/L

Adult female: 42.0 – 88.0 mg/dL
0.42 – 0.88 g/L
1.09 – 2.29 mmol/L

LINEARITY

If a sample exceeds 180 mg/dL, dilute the sample (one part with nine parts saline solution), repeat the test, and multiply the result by 10.

BIBLIOGRAPHY

Burtis CA, Ashwood ER, Ed. Tetz. *Textbook of Clinical Chemistry, 2d Ed.* Philadelphia, PA, WB Saunders (1994)

Gordon T, Castelli WP, Hjortland MC et al. *Am. J. Med.* 62:707–714 (1977)

Grundy SM, et al. Summary of the Second Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult treatment panel II) *JAMA.* 269:3015-23 (1993)

Rifai N, Warnick GR, Ed. Laboratory *Measurement of Lipids, Lipoproteins and Apolipoproteins.* Washington, DC, AACC Press (1994)

11867539001V9

HBA1C II

Tina-quant® Hemoglobina A1c II

Estandarizada según la IFCC, extrapolable a DCCT/NGSP

● Estuche adecuado para el analizador Roche/Hitachi respectivo

Ref.	Frasco	Contenido	717	747	902	904	911 912	917	MOD P	MOD D
11822039 216	1	REAGENT 4 x 17 ml	●	●	●	●	●	●	●	
	2	REAGENT 4 x 4 ml								
	3a–d	CALIBRATOR → 4 x 2 ml								
	4	REAGENT 4 x 17 ml								
11822080 216	1	REAGENT 2 x 66 ml		●				●	●	
	2	REAGENT 2 x 16 ml								
	3a–d	CALIBRATOR → 4 x 2 ml								
	4	REAGENT 2 x 66 ml								
11822098 216	1	REAGENT 2 x 71 ml	●	●		●	●			
	2	REAGENT 2 x 17 ml								
	3a–d	CALIBRATOR → 4 x 2 ml								
	4	REAGENT 2 x 71 ml								
11822497 210	1	REAGENT 40 x 66 ml		●				●	●	
	2	REAGENT 40 x 16 ml								
	3a–d	CALIBRATOR → 32 x 2 ml								
	4	REAGENT 40 x 66 ml								

Algunos estuches y analizadores no están disponibles en todos los países. Para otras metódicas específicas, diríjase al representante de Roche Diagnostics en su país.

Español

Información del sistema

Roche/Hitachi 904/911/912: ACN 027, ACN 125, ACN 162, ACN 165.
Roche/Hitachi 917: ACN 027, ACN 125, ACN 802 (código EE.UU. 812), ACN 803 (código EE.UU. 813).
Roche/Hitachi MODULAR P: ACN 027, ACN 125, ACN 802, ACN 803.

Función

Prueba inmunoturbidimétrica para la determinación cuantitativa in vitro de la hemoglobina A1c en sangre completa en analizadores automáticos Roche de química clínica. Las determinaciones de HBA1c se emplean en el seguimiento a largo plazo de la glucemia.

Generalidades[1,2,3,4,5,6,7,8,9]

La hemoglobina (Hb) está formada por cuatro cadenas proteicas con cuatro porciones hemo y constituye la proteína de pigmento rojo de los eritrocitos. Su función principal es el transporte de oxígeno y de dióxido de carbono en la sangre. Cada molécula de Hb es capaz de fijar cuatro moléculas de oxígeno. La Hb consta de una variedad de subfracciones y derivados. Dentro de este heterogéneo grupo, la HbA1c es una de las hemoglobinas glucosiladas, subfracción que se deriva de la unión de varios azúcares a la molécula de Hb. En los adultos normales, la HbA1c se forma en dos pasos por la reacción no enzimática de la glucosa con el grupo amino del nitrógeno terminal de la cadena β en la Hb (HbA). El primer paso es reversible y produce la hemoglobina HbA1c inestable que se reordena lentamente en el segundo paso de la reacción para generar la HbA1c estable.
En los eritrocitos, la cantidad relativa de HbA que se transforma en HbA1c estable aumenta paralelamente a la concentración promedio de glucemia. El proceso de formación de la HbA1c estable depende de la vida media de los eritrocitos, de aproximadamente 100 a 120 días. Como consecuencia de ello, la concentración de HbA1c determinada refleja el nivel promedio de glucemia en los 2 a 3 meses previos a la medición. La determinación de la HbA1c en pacientes con diabetes mellitus constituye así un medio idóneo para el seguimiento de la glucemia a largo plazo. Los niveles de glucosa más recientes influyen primordialmente en el nivel de HbA1c.[1]
La relación entre la concentración de HbA1c y el valor medio de glucemia durante los 2 a 3 meses previos ha sido objeto de numerosos estudios. En un estudio reciente se ha obtenido la siguiente correlación:

Estandarización del DCCT/NGSP[8]
Glucemia media [mmol/l] = 1,98 x HbA1c (%) - 4,29 o bien
Glucemia media [mg/dl] = 35,6 x HbA1c (%) - 77,3

Estandarización de la IFCC (recalculada según la referencia bibliográfica 8)
Glucemia media [mmol/l] = 1,73 x HbA1c (%) + 0,20 o bien
Glucemia media [mg/dl] = 31,2 x HbA1c (%) + 3,51

El riesgo de sufrir complicaciones diabéticas tales como la nefropatía y la retinopatía crecen si el metabolismo no se controla adecuadamente. La HbA1c indica el nivel medio de la glucemia, proporciona un pronóstico de la evolución de complicaciones diabéticas en pacientes con diabetes.[3,5]
En su empleo clínico de rutina, por lo general basta en realizar la prueba cada 3 ó 4 meses. En ciertas situaciones clínicas, como en la diabetes del embarazo o al modificar el tratamiento de forma relevante, puede ser conveniente medir la HbA1c en intervalos de 2 a 4 semanas.[7]

Principio del test[10]

El presente método emplea TTAB* como detergente en el hemolizante para eliminar interferencias por leucocitos, ya que el TTAB no los lisa. No es necesario pretratar las muestras para eliminar la HbA1c inestable.
Este test determina todas las variantes de hemoglobina glucosilada en el término N de la cadena β, cuya región reconocida por el anticuerpo sea idéntica a la HbA1c. A diferencia del método cromatográfico, esta prueba permite controlar la situación metabólica de diabéticos con hemoglobinopatías y uremia.

Hemoglobina A1c

La determinación de HbA1c se basa en el ensayo inmunoturbidimétrico de inhibición (TINIA) para sangre completa hemolizada.

- Muestra y adición de R1 (tampón/anticuerpo)
  La glucohemoglobina (HbA1c) de la muestra forma con el anticuerpo anti-HbA1c un complejo antígeno-anticuerpo soluble. Ya que en la molécula HbA1c existe solamente un sitio de fijación específico para el anticuerpo anti-HbA1c, no se forman estructuras más complejas.
- Adición de R2 (tampón/polihapteno) e inicio de la reacción:

Los polihaptenos forman con los anticuerpos anti-HbA1c excedentes un complejo anticuerpo-polihapteno insoluble que se mide turbidimétricamente.

Hemoglobina

La concentración de hemoglobina se determina en un segundo canal. La hemoglobina liberada de la muestra hemolizada es transformada a un derivado con un espectro de absorción característico y se mide bicromáticamente.

* TTAB = Bromuro de tetradeciltrimetilamonio

HBA1C II

Tina-quant® Hemoglobina A1c II

- tras cambiar de cubetas
- según lo requiera el control de calidad

La calibración no requiere verificación.

Control de calidad

Para el control de la calidad, emplear el material de control indicado más arriba. Asimismo puede emplearse otro material de control apropiado.
Los intervalos y límites del control han de adaptarse a los requisitos individuales del laboratorio. Los valores deben situarse dentro de los límites establecidos. Cada laboratorio debería establecer mediciones correctivas en caso de obtener valores fuera del intervalo preestablecido.
No es necesario pretratar los controles Precinorm HbA1c y Precipath HbA1c con el hemolizante de HbA1c.

Cálculo

Protocolo 1 según la IFCC
La concentración porcentual de hemoglobina A1c se calcula a través del cociente entre HbA1c/Hb, como p. ej..

$$\%\ HbA1c = \frac{HbA1c\ [g/dl]}{Hb\ [g/dl]} \times 100$$

Protocolo 2 según DCCT/NGSP
La concentración porcentual de hemoglobina A1c se calcula a través de la fórmula correctiva:

$$\%\ HbA1c = \left(87{,}6 \times \frac{HbA1c\ [g/dl]}{Hb\ [g/dl]}\right) + 2{,}27$$

Para el cálculo automático, introduzca la fórmula en el analizador Roche/Hitachi 717, bajo PROGRAMA "Calculated TEST"; en el Roche/Hitachi 902, bajo "Test Calculation"; en el Roche/Hitachi 911, bajo "TEST CALCULATION 04-03"; en los Roche/Hitachi 917 y 912, bajo "Main/Utility, Calcu Test, Calc" y en el Roche/Hitachi MOD P, bajo "Utility, Calc Test".

Advertencia

La Federación Internacional de Química Clínica (IFCC) y el programa nacional de estandarización de la glucohemoglobulina de los EE.UU. (NGSP) han dictaminado que los fabricantes no cambien los valores actuales utilizados para reportar la HbA1c hasta que el grupo de trabajo ADA/EASD/IDF que trata el test HbA1c decida al respecto.[25] Esto significa que la mayor parte de los países seguirán expresando sus datos según los valores DCCT/NGSP establecidos. Sírvase ponerse en contacto con las autoridades nacionales a fin de garantizar que su laboratorio se adapte a las normas reinantes en su país.

Limitaciones – interferencias[16,17,18,19,20,21,22]

1. Para el diagnóstico, los valores de HbA1c (%) deben emplearse conjuntamente con la información obtenida por otros procedimientos diagnósticos y por evaluaciones clínicas.
2. El test está concebido exclusivamente para la medición exacta y precisa de la HbA1c (%). Por ello, los resultados de Hb total y de HbA1c no deben darse a conocer por separado.
3. El test no está destinado al diagnóstico de la diabetes mellitus ni al seguimiento diario de la glucosa ni tampoco sustituye el autoanálisis diario de glucemia o glucosuria
4. Cualquiera sea la razón por la cual la vida media de los eritrocitos se acorte, se reduce su exposición a la glucosa y los valores de HbA1c (%) disminuyen, aún si el nivel promedio de glucemia en función del tiempo se encuentra elevado. Una reducción en la vida media de los eritrocitos puede deberse, entre otros, a la anemia hemolítica u otras enfermedades hemolíticas, a células falciformes de carácter homocigótico, al embarazo, a hemorragias crónicas o recientes de gran magnitud. En estas circunstancias se recomienda interpretar los resultados del test HbA1c con cautela.

Criterio: Recuperación dentro de ± 10% del valor inicial.
Ictericia: Sin interferencias significativas por bilirrubina conjugada y Lipemia (Intralipid): Sin interferencia significativa por triglicéridos hasta aprox. 800 mg/dl ó 9,12 mmol/l. No existe una concordancia satisfactoria entre el índice L (correspondiente a la turbidez) y la concentración de triglicéridos.
Los factores reumatoides < 750 UI/ml y el ácido ascórbico < 50 mg/dl (2,84 mmol/l) no interfieren en el test.
En casos muy raros pueden obtenerse resultados falsos debidos a la gammapatía, particularmente del tipo IgM (macroglobulinemia de Waldenstroem).
Con fines diagnósticos, los resultados obtenidos con el test siempre deben evaluarse junto a la anamnesis del paciente, los exámenes clínicos y los resultados de otros análisis.

Intervalo de medición[16]

El intervalo de medición del test de HbA1c se halla entre 0,3 g/dl (0,124 mmol/l) y la concentración del estándar más alto. Esto equivale a un intervalo de medición entre el 2-16% de hemoglobina A1c para una concentración normal de hemoglobina de 15 g/dl ó 9,3 mmol/l (valores de la IFCC, corresponden al 4-16% según el DCCT/NGSP).
Téngase en cuenta al programar el límite superior del intervalo de medición en el analizador que la concentración del estándar más alto es específica del lote.
Si la concentración de HbA1c es superior a la concentración del estándar más alto, diluir el hemolizado 1 – 1 (o la muestra original 1 + 200) con hemolizante y repetir las determinaciones de HbA1c y Hb. El resultado porcentual de HbA1c puede emplearse sin conversión.
Si la concentración de HbA1c es inferior a 0,3 g/dl, hemolizar la muestra original 1 + 50 con hemolizante y repetir las determinaciones de HbA1c y Hb. El resultado porcentual de HbA1c puede emplearse sin conversión.

Intervalo de medición para hemoglobina: 6-30 g/dl (3,73-18,6 mmol/l).

Valores teóricos

Personas de metabolismo sano

Protocolo 1 (acorde con la IFCC): 2,9-4,2% de HbA1c[23]

Protocolo 2 (acorde con DCCT/NGSP): 4,8-5,9% de HbA1c[23]

Los niveles de HbA1c superiores al intervalo de referencia establecido indican la existencia de una hiperglucemia durante un lapso mínimo de los 2 a 3 meses precedentes. Si la diabetes no está sujeta a un control adecuado, los niveles de HbA1c pueden alcanzar e incluso superar el 20%. Se recomienda la intervención terapéutica a partir de niveles del 8%. Los diabéticos con niveles de HbA1c inferiores al 7% cumplen los objetivos fijados por la Asociación Americana de Diabetes [19,20]

Los niveles de HbA1c inferiores al intervalo de referencia establecido suelen indicar un episodio reciente de hipoglucemina, la presencia de variantes de Hb o bien la reducción de la vida media de los eritrocitos.

Cada laboratorio debería comprobar si los intervalos de referencia pueden aplicarse a su colectivo de pacientes y, en caso necesario, establecer sus propios valores.

Datos específicos de desempeño del test[16]

Los datos fueron determinados empleando el sistema Roche/Hitachi indicado a continuación. Los resultados de cada laboratorio en particular pueden diferir de estos valores.

Precisión

La reproducibilidad ha sido determinada mediante controles y una mezcla de sangre completa según un protocolo interno (n = 21) con los siguientes resultados:

Hb	Intraciclo			Interciclo		
Muestra	VM		CV	VM		CV
	g/dl	mmol/l	%	g/dl	mmol/l	%
Precinorm HbA1c	13,5	8,38	0,4	14,0	8,69	1,4
Precipath HbA1c	13,6	8,45	0,5	14,1	8,76	1,4

HBA1C II

Tina-quant® Hemoglobina A1c II

Reactivos – Soluciones de trabajo

HbA1c

R1 Tampón MES**: 0,025 mol/l; tampón TRIS***: 0,015 mol/l, pH 6,2; anticuerpo anti-HbA1c (suero ovino): ≥ 0,5 mg/ml; estabilizantes

R2 Tampón MES: 0,025 mol/l; tampón TRIS: 0,015 mol/l, pH 6,2; polihapteno HbA1c: ≥ 8 µg/ml; estabilizantes

3a-d Hemolizado de sangre humana y sangre ovina; TTAB: 9 g/l; estabilizadores

Hemoglobina

R1 Tampón fosfato: 0,02 mol/l, pH 7,4; estabilizadores

** MES = Ácido 2-morfolino etanosulfónico

*** TRIS = Tris (hidroximetil)-aminometano

Medidas de precaución y advertencias

Para el uso diagnóstico in vitro.
Observar las medidas de precaución usuales para la manipulación de reactivos.
Eliminar los residuos según las normas locales vigentes.
El material de origen humano debe considerarse como potencialmente infeccioso. Este producto ha sido preparado exclusivamente de sangre de donantes que, según los métodos aprobados por la FDA, no contienen anticuerpos anti-VIH, anti-VHC ni AgHBs.
Dado que nunca puede excluirse con total seguridad el riesgo de infección, este producto debe tratarse con el mismo cuidado que una muestra de paciente. En caso de exposición, proceda según las instrucciones de las autoridades sanitarias competentes.[11,12]
Los componentes del presente estuche se clasifican según la directiva europea 88/379/CEE de la siguiente manera:
☒ Xi - Irritante (bromuro de tetradeciltrimetilamonio, TTAB). R36/38; S24/25.
Irrita ojos y piel. Evítese el contacto con los ojos y la piel.
Contacto telefónico: Internacional +49-621-7590, EE.UU.: +1-800-428-2336
Ficha de datos de seguridad a la disposición del usuario profesional que la solicite.

Preparación de los reactivos

HbA1c
R1: El contenido está listo para el uso.
R2: El contenido está listo para el uso.
Hemoglobina
R1 (frasco 4): El contenido está listo para el uso.
Calibradores 3a-d:
Abra cada frasco con cuidado, evitando la pérdida de liofilizado.
Pipetear exactamente 2,0 ml de agua destilada o desionizada dentro de cada frasco. Mezclar suavemente, evitando la formación de espuma.
Dejar reposar 30 minutos antes de usar.

Conservación y estabilidad

Sin abrir, a 2-8°C: hasta la fecha de caducidad indicada.
HbA1c
R1: abierto y refrigerado en el analizador, 28 días.
R2: abierto y refrigerado en el analizador, 28 días.
Hemoglobina
R1: abierto y refrigerado en el analizador, 28 días.

Calibradores: 8 horas a 15-25°C
2 días a 2-8°C
3 meses a (-15) - (-25)°C

Si se desea volver a usar los calibradores, congélelos inmediatamente tras reconstituirlos. Congelar alícuotas de pequeño tamaño, si fuera necesario.

Obtención y preparación de las muestras

Emplear únicamente tubos o recipientes adecuados para recoger y preparar las muestras.
Sólo se han analizado y encontrado aptas las muestras aquí mencionadas.
Sangre capilar, con EDTA o heparinizada.

Estabilidad:[13,15] 3 días a 15-25°C
7 días a 2-8°C
6 meses a (-15) - (-25)°C (congelar sólo una vez)

Preparación de la muestra

Sangre capilar
Extraer la sangre con un tubo capilar desechable y colocarlo entonces en un tubo de ensayo con la cantidad céntupla de hemolizante (p.ej. 20 µl de sangre capilar en 2000 µl de hemolizante). Cerrar el tubo y quitar la sangre del tubo capilar agitando vigorosamente. A continuación, mezclar mediante un mezclador vibratorio o agitando suavemente. El hemolizado está listo para usar cuando la espuma haya desaparecido y el color haya cambiado de rojo a marrón verdoso (aprox. 1-2 min).

Estabilidad del hemolizado: 24 horas a 2-8°C
A (-15) - (-25)°C: 6 meses

Antes del uso, atemperar el hemolizante a temperatura ambiente.

Sangre con EDTA o heparinizada.
Antes de pipetear, mezclar bien la muestra hasta alcanzar una distribución homogénea de los eritrocitos. Evitar la formación de espuma.

Pipetear a un tubo de reactivo o de muestra:	
Hemolizante	1000 µl
Sangre con EDTA o heparinizada.	10 µl

Antes del uso, atemperar el hemolizante a temperatura ambiente.

Mezclar en el mezclador vibratorio o agitando ligeramente. Evitar la formación de espuma. El hemolizado está listo para usar cuando la solución haya desaparecido y el color haya cambiado de rojo a marrón verdoso (aprox. 1-2 min).

Estabilidad del hemolizado: 4 horas a 15-25°C
24 horas a 2-8°C
A (-15) - (-25)°C: 6 meses

Material suministrado

- Consultar la sección "Reactivos – Soluciones de trabajo".

Material requerido (no suministrado)

- Controles: Precinorm HbA1c, Ref. 11488422 (EE.UU. # 1488422), Precipath HbA1c, Ref. 11488449 (EE.UU. # 1488449)
- Hemolizante para HbA1c, Ref. 11488457 (EE.UU. # 1488457)
- NaCl al 0,9%
- Equipo usual de laboratorio

Ejecución del test

Para un desempeño óptimo del test, observar las instrucciones de la presente metódica referentes al analizador empleado. Consultar el manual del operador del analizador en cuanto a las instrucciones específicas de análisis.
Roche no se responsabiliza del desempeño de las aplicaciones no validadas por la empresa. En su caso, el usuario se hace cargo de su definición.

Calibración

Trazabilidad:
El presente método fue estandarizado frente a un método de referencia para la medición de HbA1c en sangre humana aprobado por la IFCC[14,15] y sus resultados pueden extrapolarse mediante cálculo a los resultados obtenidos rastreables al estándar de DCCT/NGSP.
HbA1c
S1: NaCl al 0,9%
S2-5: Calibradores 3a-d
Los valores para el calibrador específicos del lote se introducen con dos decimales después de la coma.
Hemoglobina
S1: NaCl al 0,9%
S2: Calibrador 3a
Los valores para el calibrador específicos del lote se introducen con un decimales después de la coma.
Los calibradores no requieren pretratamiento con el hemolizante de HbA1c.
Frecuencia de calibraciones
Se recomienda efectuar una nueva calibración completa:

- tras cambiar de lote de reactivos

HBA1C II

Tina-quant® Hemoglobina A1c II

HbA1c	Intraciclo			Interciclo		
Muestra	VM		CV	VM		CV
	g/dl	mmol/l	%	g/dl	mmol/l	%
Precinorm HbA1c	0,56	0,35	2,3	0,61	0,38	4,3
Precipath HbA1c	1,42	0,88	1,5	1,53	0,95	3,5
Sangre completa	1,71	1,06	2,1	0,89	0,55	3,1

%HbA1c	Intraciclo			Interciclo		
Muestra	VM	DE	CV	VM	DE	CV
	%	%	%	%	%	%
Precinorm HbA1c	4,1	0,1	2,2	4,4	0,19	4,4
Precipath HbA1c	10,5	0,2	1,8	10,9	0,33	3,0
Sangre completa	9,2	0,2	2,3	8,4	0,27	3,2

Sensibilidad analítica (límite inferior de detección)

HbA1c 0,2 g/dl (0,124 mmol/l)
Hemoglobina: 0,3 g/dl (0,186 mmol/l)

El límite de detección equivale a la menor concentración medible de analito que puede distinguirse de cero. Se calcula como el valor situado a tres desviaciones estándar por encima del estándar más bajo (estándar 1 + 3 DE, precisión intraciclo, n = 21).

Comparación de método

La comparación entre la determinación porcentual de hemoglobina A1c con el reactivo Tina-quant HbA1c II de Roche con los métodos mencionados a continuación ha dado las correlaciones siguientes:

(x) = método de referencia de la IFCC
(y) = Tina-quant HbA1c II, Roche/Hitachi 917, valores según la IFCC

Passing/Bablok[24]	Regresión lineal
y = 1,009 x - 0,03	y = 0,979 x + 0,14
r = 0,950	r = 0,995
DE (dm 95) = 0,393	Sy.x = 0,190

Cantidad de muestras medidas: 64
Concentración de las muestras: entre 3,3 y 13,5%

(x) = Tina-quant HbA1c II, Roche/Hitachi 917, valores según la IFCC
(y) = Aplicación para hemolizados, COBAS INTEGRA 700, valores según IFCC

Passing/Bablok[24]	Regresión lineal
y = 1,000 x + 0,08	y = 0,984 x + 0,20
r = 0,951	r = 0.996
DE (dm 95) = 0,349	Sy.x = 0,180

Cantidad de muestras medidas: 62
La concentración de las muestras varía entre 3,2 y 13,9%.

(x) = Tina-quant HbA1c II, Roche/Hitachi 917, valores según DCCT/NGSP
(y) = Aplicación para hemolizados, COBAS INTEGRA 700, valores según DCCT/NGSP

Passing/Bablok[24]	Regresión lineal
y = 1,000 x + 0,07	y = 0,984 x + 0,21
r = 0,951	r = 0,996
DE (dm 95) = 0,306	Sy.x = 0,160

Cantidad de muestras medidas: 62
La concentración de las muestras varía entre 5,0 y 14,5%.

Especificidad[16]

Para los anticuerpos anti-HbA1c empleados en este estuche no se han encontrado reacciones cruzadas con HbA0, HbA1a, HbA1b, hemoglobina acetilada, hemoglobina carbamilada, albúmina glucosilada, HbA1c lábil ni HbA1d.

Referencias bibliográficas

1. Goldstein DE, Little RR, Lorenz RA, Malone JI, Nathan D, Peterson CM. Tests of glycemia in diabetes. Diabetes Care. 1995;18:896-909.
2. Goldstein DE, Little RR. More than you ever wanted to know (but need to know) about glycohemoglobin testing. Diabetes Care. 1994;17:938-939.
3. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. N Engl J Med. 1993; 329:977-986.
4. Santiago JV. Lessons from the diabetes control and complications trial. Diabetes. 1993;42:1549-1554.
5. UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) group. Intensive blood glucose control with sulfonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). Lancet 1998:352:837-853.
6. Flückiger R, Mortensen HB. Review: glycated haemoglobins. J Chromatogr. 1988;429:279-292.
7. Goldstein DE, Little RR, Wiedmeyer HM, England JD, McKenzie EM. Glycated hemoglobin: methodologies and clinical applications. Clin Chem. 1986:32:B64-B70.
8. Rohlfing CL, Wiedmeyer HM, Little RR, England JD, Tennill A, Goldstein DE. Defining the relationship between plasma glucose and HbA1c. Diabetes Care 2002, 25, 275-278.
9. Bunn HF, Gabbay KH, Gallop PM. The glycosylation of hemoglobin: relevance to diabetes mellitus. Science. 1978; 200:21-27.
10. Karl J et al. Development and Standardization of a New Immunoturbidimetric HbA1c Assay. Klin Lab 1993;39:991-996.
11. Occupational Safety and Health Standards: bloodborne pathogens. (29 CFR 1910.1030). Federal Register. July 1, 2001;17:260-273.
12. Directiva del Consejo (2000/54/CE). Diario oficial de las Comunidades Europeas, N° L262 del 17/10/2000.
13. Use of Anticoagulants in Diagnostic Laboratory Investigations. WHO/DIL/LAB/99.1 Rev.2.Jan. 2002.
14. Kobold U, Jeppsson JO, Duelffer T, Finke A, Hoelzel W, Miedema K. Candidate reference methods for hemoglobin A1c based on peptide mapping. Clin Chem 1997;43:1944-1951.
15. Jeppsson JO, Kobold U, Finke A, Hoelzel W, Hoshino T, Miedema K, Mosca A, Mauri P, Paroni R, Thienpont L, Umemoto M, Weykamp C. Approved IFCC reference method for the measurement of HbA1c in human blood. Clin Chem Lab Med 2002. 40, 78-89.
16. Documentación de Roche Diagnostics.
17. Glick MR, Ryder KW, Jackson SA. Graphical Comparisons of Interferences in Clinical Chemistry Instrumentation. Clin Chem 1986, 32, 470-474.
18. Greiling H, Gressner AM, eds. Lehrbuch der Klinischen Chemie und Pathobiochemie, 3rd ed. Stuttgart/New York: Schattauer, 1995:279.
19. American Diabetes Association. Standards of Medical Care for patients with diabetes mellitus. Diabetes Care [Suppl] 18/1, 1995;8-15
20. Sacks BW, Bruns DE, Goldstein DE, Maclaren NK, McDonald JM, Parrott M. Guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus. Clin Chem 2002.48, 436-472.
21. Martina WV, Martijn EG, van der Molen M, Schermer JG, Muskiet FAJ. β-N-terminal glycohemoglobins in subjects with common hemoglobinopathies: relation with fructosamine and mean erythrocyte age. Clin Chem. 1993;39:2259-2265.
22. Weykamp CW, Penders TJ, Muskiet FAJ, van der Slik W. Influence of hemoglobin variants and derivatives on glycohemoglobin determinations, as investigated by 102 laboratories using 16 methods. Clin Chem. 1993;39:1717-1723.
23. Junge W, Wilke B, Halabi A et al. Determination of reference intervals in adults for hemoglobin A1c (HbA1c). Poster presentation 18th International Diabetes Federation Congress, Paris, 2003.
24. Bablok W et al. A General Regression Procedure for Method Transformation. J Clin Chem Clin Biochem 1988;26:783-790.
25. EASD News Section 5/2004, Report of the ADA/EASD/IDF Working group of the HbA1c assay.

IMMULITE®

C-Peptide

For use on the IMMULITE®
and IMMULITE® 1000 systems

DPC

IMMULITE®/IMMULITE® 1000 C-Peptide

English

Intended Use: For *in vitro* diagnostic use with the IMMULITE and IMMULITE 1000 Analyzers — for the quantitative measurement of C-peptide in serum, heparinized plasma, or urine, as an aid in the diagnosis and treatment of patients with abnormal insulin secretion.

Catalog Number: **LKPE1** (100 tests), **LKPE5** (500 tests)

Test Code: **CPE** Color: **Dark Gray**

CDC Analyte Identifier Code: 1040
CDC Test System Identifier Code: 10159
CLIA Complexity Category: Moderate

Summary and Explanation

Human C-peptide is a 31 amino acid chain with a molecular mass of approximately 3,020 daltons. Metabolically inert, it originates in the pancreatic β-cells as a by-product of the enzymatic cleavage of proinsulin to insulin.[1,2,5] In this process, insulin and C-peptide are split from the prohormone and secreted into the portal circulation in equimolar concentrations.[4,5,7] It is this fact which underlies the clinical interest in plasma determinations of C-peptide.

Within limits, C-peptide levels can serve as a valuable index to insulin secretion. Thus, low C-peptide levels are to be expected where insulin secretion is diminished, as in insulin-dependent diabetes, or suppressed, as a normal response to exogenous insulin; whereas elevated C-peptide levels may result from the increased β-cell activity observed in insulinomas.[3,4,6,9]

Accordingly, in the differential diagnosis of hypoglycemia, C-peptide determinations can be used to supplement insulin measurements as an index to pancreatic activity in the classic 72-hour fasting test, and as the sole indicator of pancreatic activity where insulin itself is administered to check for suppressibility.[1,8] In addition, covert self-administration of insulin can be virtually ruled out as the cause of hyperinsulinemia by the finding of an elevated C-peptide level.[2,3,8,9]

Circulating anti-insulin antibodies are commonly encountered in patients who have undergone insulin therapy. These would typically interfere with immunoassays for insulin, making it impossible to use insulin measurements in this context to check on residual β-cell activity, even if treatment were temporarily suspended. C-peptide measurements have therefore been used as an alternative in this context, to yield information on the natural history of insulin-dependent diabetes, to indirectly monitor insulin secretion in the presence of anti-insulin antibodies, and to help settle on an appropriate course of treatment.[3,6,7,10]

C-peptide has also been measured as an additional means for evaluating glucose tolerance and glibenclamide-glucose tests.[2,3,10]

Principle of the Procedure

IMMULITE/IMMULITE 1000 C-Peptide is a solid-phase, competitive chemiluminescent enzyme immunoassay.

Incubation Cycles: 1 × 60 minutes.

Specimen Collection

Serum and Heparinized Plasma:
The patient should be fasting. Collect blood by venipuncture,[12] avoiding hemolysis, into plain tubes (without anticoagulant) or heparinized tubes, noting the time of collection, and separate the serum or plasma from the cells.

EDTA plasma and sodium fluoride plasma are unsuitable for use.

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

Hemolyzed samples may indicate mistreatment of a specimen before receipt by the laboratory; hence the results should be interpreted with caution.

Icteric or grossly contaminated samples may give erroneous results.

Centrifuging serum samples before a complete clot forms may result in the presence of fibrin. To prevent erroneous results due to the presence of fibrin,

ensure that complete clot formation has taken place prior to centrifugation of samples. Some samples, particularly those from patients receiving anticoagulant therapy, may require increased clotting time.

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. IMMULITE/IMMULITE 1000 C-Peptide 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.

Storage: Assay within 2–3 hours, or store frozen at –20°C for 1 week.[11]

Urine – Collection and Storage:
Collect a 24-hour urine, without preservative, keeping the specimen refrigerated at 2–8°C during collection. Record the total volume of the collection and retain a well-mixed aliquot for analysis. Before assay, clear the sample by centrifugation or filtration.

Storage: For longer storage, aliquot and freeze: stable at –20°C for 30 days.

Predilution of Urine Samples: All urine samples should be diluted *at least* 1-in-4 with C-Peptide Sample Diluent before assay. (Urine samples *should not* be assayed without prior dilution.) A 1-in-20 dilution will bring normal urine samples within the assay's calibration range.

Volume Required:
50 µL serum, plasma, or urine (prediluted). (Sample cup must contain at least 100 µL more than the total volume required.).

Warnings and Precautions

For *in vitro* diagnostic use.

Reagents: Store at 2–8°C. Dispose of in accordance with applicable laws.

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.

Chemiluminescent Substrate: Avoid contamination and exposure to direct sunlight. (See insert.)

Water: Use distilled or deionized water.

Materials Supplied

Components are a matched set. The barcode labels are needed for the assay.

C-Peptide Test Units (LPE1)
Each barcode-labeled unit contains one bead coated with polyclonal rabbit anti-C-Peptide. Stable at 2–8°C until expiration date.
LKPE1: 100 units. **LKPE5:** 500 units.

Allow the Test Unit bags to come to room temperature before opening. Open by cutting along the top edge, leaving the ziplock ridge intact. Reseal the bags to protect from moisture.

C-Peptide Reagent Wedge (LPE2)
With barcode. 7.5 mL alkaline phosphatase (bovine calf intestine) conjugated to C-peptide in buffer, with preservative. Store capped and refrigerated: stable at 2–8°C until expiration date. Recommended usage is within 30 days after opening when stored as indicated.
LKPE1: 1 wedge. **LKPE5:** 5 wedges.

C-Peptide Adjustors (LPEL, LPEH)
Two vials (Low and High) of lyophilized C-peptide in buffered human albumin, with preservative. Reconstitute each vial with **4.0 mL** distilled or deionized water. Let stand for 30 minutes. Mix by gentle swirling or inversion until the lyophilized material is fully dissolved. After reconstitution, aliquot and freeze. Stable at –20°C for 6 months. Discard aliquots after use.
LKPE1: 1 set. **LKPE5:** 2 sets.

Kit Components Supplied Separately

C-Peptide Sample Diluent (LPEZ)
For the manual dilution of urine samples and high serum/plasma samples. One vial containing 25 mL of processed, C-peptide-free buffered human albumin, with preservative. Stable at 2–8°C for 30 days after opening, or for 6 months (aliquotted) at –20°C.

LSUBX: Chemiluminescent Substrate
LPWS2: Probe Wash Module
LKPM: Probe Cleaning Kit
LCHx-y: Sample Cup Holders (barcoded)
LSCP: Sample Cups (disposable)
LSCC: Sample Cup Caps (optional)

PECM: Tri-level C-Peptide Control Module

Also Required
Sample transfer pipets, distilled or deionized water, controls.

Assay Procedure

Note that for optimal performance, it is important to perform all routine maintenance procedures as defined in the IMMULITE or IMMULITE 1000 Operator's Manual.

See the IMMULITE or IMMULITE 1000 Operator's Manual for: preparation, setup, dilutions, adjustment, assay and quality control procedures.

Visually inspect each Test Unit for the presence of a bead before loading it onto the system.

Predilution of Urine Samples: All urine samples should be diluted *at least* 1-in-4 with C-Peptide Sample Diluent before assay.

Recommended Adjustment Interval: 2 weeks.

Quality Control Samples: Use controls or sample pools with at least two levels (low and high) of C-Peptide.

Calculation of Results

The results for *urine* samples, as returned by the IMMULITE Analyzer, must be corrected for dilution by multiplying by the dilution factor. Results are usually reported as micrograms of C-peptide per 24 hours (µg/day). This can be obtained by multiplying the result in ng/mL (= µg/L) by the total volume of the 24-hour collection *in liters*.

Expected Values

Serum and Heparinized Plasma:
Based upon the agreement with DPC's IMMULITE 2000 C-Peptide assay, the IMMULITE C-Peptide procedure can be expected to yield a median of 2.1 ng/mL (695 pmol/L) and a nonparametric central 95% range of:

1.1 – 5 ng/mL (364 – 1,655 pmol/L)

for fasting individuals. The reference range study was performed on serum samples from 71 fasting laboratory volunteers.

Urine:
Based upon the agreement with DPC's Double Antibody C-Peptide assay, the IMMULITE C-Peptide procedure can be expected to yield a mean ± SD of 79 ± 56 µg/day, with a range of 2 to 260 µg/day, representing the central 95% of the observations.

Consider these limits as *guidelines* only. Each laboratory should establish its own reference ranges.

Limitations

Because metabolism of C-peptide differs from that of insulin, C-peptide levels are at best a semi-quantitative index of insulin secretion. The half-life of C-peptide in plasma has been estimated as approximately 30 minutes, compared to approximately 5 minutes for insulin. Because of the difference in half-life, C-peptide circulates in plasma at a level roughly five times that of insulin, even though the two molecules are secreted in an equimolar ratio. Again, the liver plays a major role in clearing insulin, whereas C-peptide is removed by degradation and elimination mainly through the kidneys. Hepatic and renal complications will therefore affect the circulating C-peptide/insulin ratio.

Heterophilic antibodies in human serum can react with the immunoglobulins included in the assay components causing interference with *in vitro* immunoassays. [See Boscato LM, Stuart MC. Heterophilic antibodies: a problem for all

immunoassays. Clin Chem 1988:34:27-33.] Samples from patients routinely exposed to animals or animal serum products can demonstrate this type of interference potentially causing an anomalous result. These reagents have been formulated to minimize the risk of interference; however, potential interactions between rare sera and test components can occur. For diagnostic purposes, the results obtained from this assay should always be used in combination with the clinical examination, patient medical history, and other findings.

Performance Data

See Tables and Graphs for data *representative* of the assay's performance. Results are expressed in ng/mL. (Unless otherwise specified, all results were generated on serum samples collected in tubes without anticoagulants, gel barriers, or clot-promoting additives.)

Conversion Factor:
ng/mL × 331 → pmol/L

Calibration Range: 0.5 – 7 ng/mL
(166 to 2,317 pmol/L)
WHO 1st IRP 84/510.

Analytical Sensitivity: 0.3 ng/mL
(99 pmol/L) for serum and plasma samples.

Precision: Samples were repeatedly assayed in quadruplicate over the course of several days, for a total of 20 runs and 80 replicates. (See "Precision" table.)

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

Recovery: Samples spiked 1 to 19 with two C-peptide solutions (18 and 72 ng/mL) were assayed. (See "Recovery" table for representative data.)

Specificity: The antibody is highly specific for C-peptide. (See "Specificity" table.)

Bilirubin: Interferes with the assay at levels of 100 mg/L and 200 mg/L, causing elevation of values. (See "Bilirubin" table)

Hemolysis: Presence of packed red blood cells in concentrations up to 30 µL/mL has no effect on results, within the precision of the assay.

Alternate Sample Types: No significant effect for heparinized plasma, Becton Dickinson SST® vacutainer tubes. EDTA plasma and sodium fluoride plasma are unsuitable for use. By linear regression:

(Heparin) = 1.03 (Serum) – 0.04 ng/mL
r = 0.99

(SST) = 1.16 (Plain Tubes) + 0.81 ng/mL
r = 0.98

Means:
4.4 ng/mL (Serum)
4.5 ng/mL (Heparin)
5.9 ng/mL (SST Tubes)

Method Comparison–Serum: The assay was compared to DPC's IMMULITE 2000 C-Peptide on 66 serum samples. (Concentration range: approximately 0.5 to 6.5 ng/mL See graph.) By linear regression:

(IML) = 1.01 (IML 2000) – 0.1 ng/mL
r = 0.990

Means:
2.8 ng/mL (IMMULITE)
2.8 ng/mL (IMMULITE 2000)

Method Comparison–Urine: The assay was compared to DPC's Double Antibody C-Peptide on 24 urine samples. (Concentration range: up to approximately 6.7 ng/mL. See "Method Comparison: Urine" graph.) By linear regression:

(IMMULITE) = 0.89 (DA) – 0.01 ng/mL
r = 0.983

Means:
2.51 ng/mL (IMMULITE)
2.81 ng/mL (Double Antibody)

References

1) Beischer W. Proinsulin and C-Peptide in humans. In: Fotherby K, Pal S, editors. Hormones in Normal and Abnormal Human Tissues. Vol 3. Berlin: Walter DeGruyter, 1983: 1-43. 2) Beyer J, Krause U, Cordes U. C-Peptide: its biogenesis, structure, determination and clinical significance. Giornale Ital Chem Clin 1979;4 Suppl 1:9-22. 3) Bonser A, Garcia-Webb P. C-Peptide measurement: methods and clinical utility. CRC Crit Rev Clin Lab Sci 1984;19:297-352. 4) Gonen G, Rubenstein AH, Horwitz DL, Blix PM. Clinical significance of C-Peptide. In: Baba S, Kaneko T, Yanaihara N, editors. Proinsulin, Insulin, C-Peptide. Amsterdam: Excerpta Medica, 1979: 246-53. 5) Horwitz D, et al. Proinsulin, insulin and C-Peptide concentrations in human portal and peripheral blood. J Clin Invest 1975;55:1278-83. 6) Horwitz D, Kuzuya H, Rubenstein AH. Circulating serum C-Peptide. N Engl J Med 1976;295:207-9. 7) Polonsky KS, Rubenstein AH. C-Peptide as a measure of the secretion and hepatic extraction of insulin; pitfalls and limitations. Diabetes 1984;33:486-93. 8) Rendell M. Expanding clinical use of

C-Peptide radioimmunoassay. Acta Diabetol Lat 1983;20:105-13. 9) Rubenstein AH, Kuzuya H, Horwitz DL. Clinical significance of circulating C-Peptide in diabetes mellitus and hypoglycemic disorders. Arch Intern Med 1977;137:625-32. 10) 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. 11) Data on file. 12) 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.

Technical Assistance

In the United States, contact DPC's Technical Services department. Tel: 800.372.1782 or 973.927.2828 Fax: 973.927.4101. Outside the United States, contact your National Distributor.

Manufactured by EURO/DPC Ltd. under a Quality System registered to ISO 13485:2003.

Tables and Graphs

Precision (ng/mL)

		Within-Run[1]		Total[2]	
	Mean[3]	SD[4]	CV[5]	SD	CV
1	0.97	0.1	10.3%	0.14	14.4%
2	2.1	0.16	7.6%	0.22	10.5%
3	3.5	0.25	7.1%	0.29	8.3%
4	4.6	0.3	6.5%	0.36	7.8%
5	5.7	0.39	6.8%	0.43	7.5%

Linearity (ng/mL)

	Dilution[1]	Observed[2]	Expected[3]	%O/E[4]
1	4 in 4[5]	3.4	—	—
	2 in 4	1.5	1.7	88%
	1 in 4	0.77	0.85	91%
2	8 in 8	3.8	—	—
	4 in 8	2.1	1.9	111%
	2 in 8	1.0	0.95	105%
	1 in 8	0.52	0.48	108%
3	8 in 8	5.3	—	—
	4 in 8	2.4	2.7	89%
	2 in 8	1.4	1.3	108%
	1 in 8	0.57	0.66	86%

Recovery (ng/mL)

	Solution[1]	Observed[2]	Expected[3]	%O/E[4]
1	—	0.27	—	—
	A	1.1	1.2	92%
	B	3.7	3.9	95%
2	—	0.60	—	—
	A	1.6	1.5	107%
	B	4.6	4.2	110%
3	—	0.83	—	—
	A	1.6	1.7	94%
	B	4.4	4.4	100%

Specificity

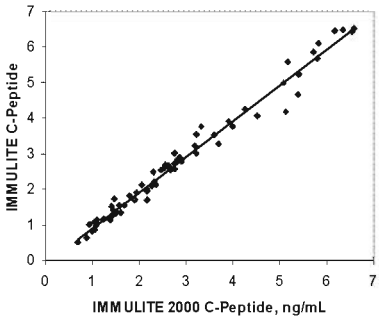
Compound[1]	Amount Added[2]	Apparent ng/mL[3]	% Cross-reactivity[4]
Insulin	200 µIU/mL	ND	ND
Glucagon	15,000 ng/mL	ND	ND
Secretin	15,000 ng/mL	ND	ND
Proinsulin	10.0 ng/mL	1.25	13%

ND: not detectable.[5]

Bilirubin

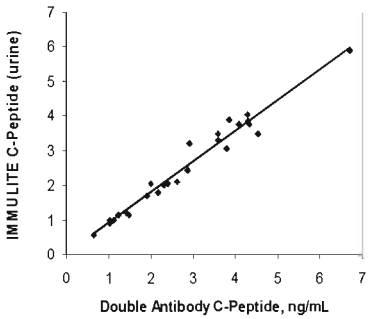
	Unspiked[1]	100 mg/L	200 mg/L
1	2.1	2.6	3.0
2	2.6	3.1	4.0
3	3.4	4.2	4.7
4	3.6	4.6	4.9
5	5.3	6.0	6.3
6	5.7	6.3	6.7

Method Comparison: Serum



(IML) = 1.01 (IML 2000) – 0.1 ng/mL
r = 0.990

Method Comparison: Urine



(IMMULITE) = 0.89 (DA) – 0.01 ng/mL
r = 0.983

Deutsch. **Precision**: [1]Intra-Assay, [2]Gesamt, [3]Mittelwert, [4]S (Standardabweichung), [5]CV (Variationskoeffizient). **Linearity**: [1]Verdünnung, [2]Beobachtet (B), [3]Erwartet (E), [4]% B/E, [5]4 in 4. **Recovery**: [1]Probe, [2]Beobachtet (B), [3]Erwartet (E), [4]% B/E. **Specificity**: [1]Verbindung, [2]zugesetzte Menge, [3] Gemessene Konzentration, [4]% Kreuzreaktivität, [5]NN: Nicht nachweisbar. **Bilirubin**: [1]Ohne Zugabe von. **Method Comparison**: C-Peptide: C-Peptid.

Español. **Precision:** [1]Intraensayo, [2]Total, [3]Media, [4]DS, [5]CV. **Linearity**: [1]Dilución, [2]Observado (O), [3]Esperado (E), [4]%O/E, [5]4 en 4. **Recovery**: [1]Solución, [2]Observado (O), [3]Esperado (E), [4]%O/E. **Specificity**: [1]Compuesto, [2]Cantidad añadida, [3]Concentración aparente, [4]% Reacción cruzada, [5]ND: no detectable. **Bilirubin**: [1]Sin añadir. **Method Comparison**: C-Peptide: Péptido-C

Français. **Precision**: [1]Intraessai, [2]Total, [3]Moyenne, [4]SD, [5]CV. **Linearity**: [1]Dilution, [2]Observé (O), [3]Attendu (A), [4]%O/A, [5]4 dans 4. **Recovery**: [1]Solution, [2]Observé (O), [3]Attendu (A), [4]%O/A. **Specificity**: [1]Composé, [2]ajouté, [3] Concentration apparente, [4]Réaction croisée %. [5]ND: non détectable. **Bilirubin**: [1]Non chargés. **Method Comparison**: C-Peptide: C-Peptide

Italiano. **Precision**: [1]Intra-serie, [2]Totale, [3]Media, [4]SD (Deviazione Standard), [5]CV (Coefficiente di Variazione). **Linearity**: [1]Diluizione, [2]Osservato (O), [3]Atteso (A), [4]%O/A, [5]4 in 4. **Recovery**: [1]Soluzione, [2]Osservato (O), [3]Atteso (A), [4]%O/A. **Specificity**: [1]Composto, [2]quantità aggiunta, [3] Concentrazione apparente, [4]Percentuale di Crossreattività, [5]ND: non determinabile. **Bilirubin**: [1]Semplice, senza aggiunte. **Method Comparison**: C-Peptide: C-Peptide

Português. **Precision**: [1]Entre-ensaios, [2]Total, [3]Média, [4]Desvio padrão, [5]Coeficiente de variação. **Linearity**: [1]Diluição, [2]Observado (O), [3]Esperado (E), [4]%O/E, [5]4 em 4. **Recovery**: [1]Solução, [2]Observado (O), [3]Esperado (E), [4]%O/E. **Specificity**: [1]Composto, [2]Quantidade adicionada, [3]Apparent Concentration, [4]Percentagem de reacção cruzada, [5]ND: não detectável. **Bilirubin**: [1]Não adicionada. **Method Comparison**: C-Peptide: Péptido-C

Deutsch

C-Peptid - IMMULITE

Anwendung: Zur in vitro-Diagnostik unter Verwendung der IMMULITE und IMMULITE 1000 Systeme – zur quantitativen Messung von C-Peptid im Serum, Heparin-Plasma und Urin, als Hilfe in der Diagnose und in der Behandlung von Patienten mit anormaler Insulinsekretion.

Artikelnummer: **LKPE1** (100 Tests), **LKPE5** (500 Tests)

Testcode: **CPE** Farbe: **dunkelgrau**

Klinische Relevanz

Humanes C-Peptid ist ein einkettiges Polypeptid (31 Aminosäureeinheiten) mit einem Molekulargewicht von annähernd 3 020 Dalton. In den ß-Zellen des Pankreas entsteht das biologisch inaktive C-Peptid als Nebenprodukt bei der enzymatischen Spaltung von Proinsulin in Insulin.[1,2,5] Während dieses Prozesses wird das Insulin und C-Peptid von dem Prohormon abgespalten und gelangt in äquimolaren Mengen durch die Vena portae in den Kreislauf.[4,5,7] Diese Tatsache

unterstreicht die klinische Bedeutung der C-Peptid-Bestimmung im Plasma.

Innerhalb bestimmter Grenzen können die C-Peptid Werte ein wertvoller Hinweis für die Insulinsekretion sein. Bei einer Insulin-abhängigen Diabetes können niedrige C-Peptid-Werte bei verminderter Insulin-Sekretion bzw. erniedrigte Werte als Reaktion auf exogenes Insulin erwartet werden. Erhöhte C-Peptid-Werte können von einer erhöhten Aktivität der β-Zellen bei Insulinomen herrühren.[3,4,6,9]

Zusätzlich können C-Peptid Bestimmungen ergänzend zu den Insulin Bestimmungen in der Differentialdiagnose der Hypoglykämie als Maß für die Pankreasaktivität nach dem klassischen 72-Stunden-Fasten-Test oder auch als alleiniger Indikator der Pankreasaktivität in Verbindung mit einem Insulin-Suppressionstest dienen.[1,8] Außerdem können heimliche Selbstverabreichungen an Insulin bei erhöhten C-Peptid Werten als Ursache für eine Hyperinsulinämie praktisch ausgeschlossen werden.[2,3,8,9]

Anti-Insulin-Antikörper treten häufig bei Patienten auf, die einer Insulintherapie unterzogen worden sind. Diese würden in einem Immunoassay zu Interferenzen führen, so dass die Insulinbestimmung in diesem Kontext zur Abklärung der Restaktivität der β-Zellen nicht benutzt werden kann, auch wenn die Therapie zeitweise unterbrochen wird. Die Bestimmung des C-Peptid kann in diesen Fällen als eine Alternative genutzt werden, um Informationen über den Verlauf der Insulin-abhängigen Diabetes zu gewinnen, um indirekt die Insulin-Sekretion in der Anwesenheit von Anti-Insulin-Antikörpern zu monitoren und um bei der Festlegung einer geeigneten Theapie zu helfen.[3,6,7,10]

Die Bestimmung des C-Peptid kann als ein zusätzliches Hilfsmittel bei der Beurteilung der Glukosetoleranz- und Glibenclamid-Glukose-Tests eingesetzt werden.[2,3,10]

Methodik

Der C-Peptid – IMMULITE/IMMULITE 1000-Test ist ein kompetitiver Festphasen-, Chemilumineszenz-Immunoassay.

Inkubationszyklen: 1 × 60 min.

Probengewinnung

Serum und Heparin-Plasma:

Der Patient sollte nüchtern sein. Die Blutentnahme erfolgt in normale Gefäße (ohne Antigerinnungsmittel) oder in Heparin-Rörchen unter Vermeidung von Hämolyse.[12] Den Entnahmezeitpunkt notieren und das Serum oder Plasma von den Zellen trennen.

EDTA-Plasma und Natriumflouridplasma sind für dieses Testsystem nicht geeignet.

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

Bei hämolysierten Proben besteht die Möglichkeit einer unsachgemäßen Handhabung vor Eintreffen im Labor, daher sind die Ergebnisse mit Vorsicht zu interpretieren.

Ikterische oder stark kontaminierte Proben können zu fehlerhaften Ergebnissen führen.

Die Zentrifugation der Serumproben vor dem völligen Abschluss der Gerinnung kann zu Fibringerinnseln führen. Um fehlerhaften Analysenergebnissen infolge von Gerinnseln vorzubeugen, ist sicherzustellen, dass die Gerinnung vor der Zentrifugation der Proben vollständig abgeschlossen ist. Insbesondere Proben von Patienten unter Antikoagulantien-therapie können eine verlängerte Gerinnungszeit aufweisen.

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. IMMULITE/IMMULITE 1000 C-Peptid sind nicht mit allen möglichen Röhrchenvariationen ausgetestet worden. Details der getesteten Röhrchenarten sind dem Kapitel "Alternative Probenarten" zu entnehmen.

Lagerung: Test innerhalb 2–3 Stunden, oder für 1 Woche bei –20°C eingefroren werden.[11]

Urinsammeln und Lagerung:
24-Stunden-Urin ohne Konservierungsmittel sammeln. Während des Sammelns kühlen (2–8°C),

Gesamtvolumen ermitteln, Urin gut mischen und in Teilmengen abfüllen. Urinproben vor dem Einsatz im Assay durch Zentrifugation oder Filtration klären.

Lagerung: Zur längeren Lagerung, aliquotieren und einfrieren. 30 Tage bei –20°C haltbar.

Vorverdünnung der Urinproben: Alle Urinproben sollten mindestens 1:4 verdünnt werden. (Urinproben sollten *nicht* ohne vorherige Verdünnung eingesetzt werden). Eine 1:20 Verdünnung bringt *normale* Urinproben in den Messbereich des Assays.

Erforderliche Menge:
50 µl Probe: Serum, Plasma oder Urin (vorverdünnt). (Inhalt des Probenträgers muss mindestens 100 µl über der erforderlichen Gesamtmenge liegen.)

Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Zur *In-vitro*-Diagnostik.

Reagenzien: Bei 2–8 °C lagern. Unter Einhaltung der geltenden gesetzlichen Vorschriften entsorgen.

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.

Chemilumineszenz-Substrat: Kontamination und direkte Sonneneinstrahlung vermeiden. Siehe Packungsbeilage.

Wasser: Destilliertes oder deionisiertes Wasser verwenden.

Im Lieferumfang enthalten

Die Komponenten sind aufeinander abgestimmt. Die Barcode-Etiketten werden für den Assay benötigt.

C-Peptid-Testeinheiten (LPE1)
Enthalten Polystyrol-Kugeln beschichtet mit C-Peptid-Antikörpern (polyklonal, Kaninchen), barcodiert. Bei 2–8°C bis zum Verfallsdatum haltbar.
LKPE1: 100 Testeinheiten.
LKPE5: 500 Testeinheiten.

Verpackte Testeinheiten vor dem Öffnen stehen lassen, bis sie Zimmertemperatur erreicht haben. Oben entlang der Kante aufschneiden, ohne den Plastikverschluss zu beschädigen. Verpackungen wieder dicht verschließen, damit der Inhalt trocken bleibt.

C-Peptid-Reagenzbehälter (LPE2)
Mit Barcode. 7,5 ml mit alkalischer Phosphatase (Rinderkalbsdarm) konjugiert mit C-Peptid in Pufferlösung, mit Konservierungsmittel. Verschlossen und gekühlt aufbewahren: Bei 2–8°C bis zum Ablaufdatum haltbar. Bei entsprechender Lagerung beträgt die empfohlene Aufbrauchsfrist nach dem Öffnen 30 Tage.
LKPE1: 1 Behälter.
LKPE5: 5 Behälter.

C-Peptid-Kalibratoren (LPEL, LPEH)
Zwei Fläschchen (niedrig und hoch) mit lyophilisiertem C-Peptid in einer humanen Albumin-Lösung, mit Konservierungsmittel. Rekonstitution mit **4,0 ml** destiliertem oder deionisiertem Wasser. 30 min. stehen lassen. Vorsichtig durchmischen. Nach Rekonstituierung aliquotieren und einfrieren. 6 Monate bei –20°C haltbar. Aliquote nach Gebrauch verwerfen.
LKPE1: 1 Set. **LKPE5:** 2 Sets.

Separat erhältliche Testsystem-Komponenten

C-Peptid-Probenverdünnungsreagenz (LPEZ)
Zum manuellen Verdünnen der Urinproben und von hoch konzentrierten Serum-/Plasmaproben. Enthält 25 ml prozessierte C-Peptid-freie human Albumin/Puffermatrix, mit Konservierungsmittel. Nach dem Öffnen

30 Tage bei 2-8°C stabil oder 6 Monate aliquotiert bei –20°C.

LSUBX: Chemilumineszenz-Substrat
LPWS2: Pipettenwaschlösung
LKPM: Pipettenreinigungsset
LCHx-y: Halterungen für die Probenträger (mit Barcodierung)
LSCP: Probenträger (Einwegartikel)
LSCC: Verschlüsse für die Probenträger (optional)

PECM: Drei - Konzentrationen C-Peptid-Kontrollmodul.

Ebenfalls benötigt
Transferpipetten für die Proben; destilliertes bzw. deionisiertes Wasser; Kontrollen.

Testdurchführung

Für eine optimale Funktion des Gerätes ist unbedingt zu beachten, dass die Wartungen, wie im IMMULITE oder IMMULITE 1000-Handbuch beschrieben, regelmäßig durchgeführt werden.

Das Handbuch für das IMMULITE bzw. IMMULITE 1000 enthält die Anweisungen für: Vorbereitung, Geräteeinstellungen, Verdünnungen, Kalibrierung, Testdurchführung und Qualitätskontrollen.

Überprüfen Sie jedes Testeinheit auf das Vorhandensein der Polystyrol-Kugel vor dem Einsetzen in das Gerät.

Vorverdünnung der Urinproben: Alle Urinproben sollten mindestens 1:4 mit dem C-Peptid-Verdünnungspuffer verdünnt werden.

Empfohlenes Kalibrationsintervall:
2 Wochen.

Qualitätskontrollproben: Kontrollen oder Seren mit C-Peptid in zumindest zwei Konzentrationen (niedrige und hohe) verwenden.

Berechnung der Ergebnisse

Die vom IMMULITE ermittelten Ergebnisse der Urinproben müssen mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert werden. Die Werte werden in der Regel in Mikrogramm C-Peptid pro 24 Stunden angegeben (µg/Tag). Hierzu werden die Ergebnisse in ng/ml (= µg/l) mit dem Gesamtvolumen des 24-Stunden Urins in *Liter* multipliziert.

Referenzwerte

Serum und Heparin Plasma:
Basierend auf der guten Korrelation zum IMMULITE 2000 können für den IMMULITE C-Peptid Assay ein Median von 2,1 ng/mL (695 pmol/L) und folgender 95% Vertrauensbereich (nichtparametrische Verteilung) angenommen werden:

1,1 – 5,0 ng/mL
(364 – 1 655 pmol/L)

Die Referenzwertestudie wurde mit Serumproben von 71 nüchternen Probanden durchgeführt

Urin
Basierend auf der guten Korrelation zum DPC DAk-RIA können folgende Referenzwerte (24-Stunden-Sammelurin) erwartet werden:

Mittelwert (± 1SD): 79 ± 56 µg/ Tag

95% Vertrauensbereich: 2–260 µg/Tag

Diese Grenzwerte sind lediglich als Richtlinien aufzufassen. Jedes Labor sollte seine eigenen Referenzbereiche etablieren.

Grenzen der Methode

Da der Metabolismus von Insulin sich deutlich von dem des C-Peptids unterscheidet, sind die C-Peptid Spiegel bestenfalls als semi-quantitativer Index der Insulin Sekretion zu werten. Die Halbwertszeit des C-Peptids im Plasma beträgt ca. 30 Minuten, die des Insulins ca. 5 Minuten. Aufgrund der unterschiedlichen Halbwertszeiten zirkuliert das C-Peptid im Plasma in ca. 5-fach höheren Konzentrationen im Vergleich zum Insulin, obwohl beide Moleküle in equimolarem Verhältnis sezerniert werden. Während die Leber die Hauptrolle im Abbau des Insulins spielt, wird das C-Peptid hauptsächlich in den Nieren degradiert und eliminiert. Hepatische und renale Komplikationen beeinflussen demnach die C-Peptid/Insulin Ratio im zirkulierenden Plasma.

Heterophile Antikörper in Humanseren können mit Immunglobulinen aus den Assaykomponenten reagieren und Interferenzerscheinungen innerhalb des in vitro Immunoassays verursachen. (Clin.

Chem. 1988:34:27-33) Proben von Patienten, die häufig mit Tier- bzw. Tierserumprodukten zu tun haben, können die erwähnten Interferenzen verursachen und zu anomalen Resultaten führen. Die verwendeten Reagenzien sind so konzipiert, dass das Risiko einer Interferenz mit den zu messenden Proben minimiert ist. Dennoch können potentiell Interaktionen zwischen seltenen Seren und den Testkomponenten auftreten. Zu diagnostischen Zwecken sollten die mit dem Assay erhaltenen Ergebnisse immer in Kombination mit der klinischen Untersuchung, der Patientenanamnese und anderen Befunden gesehen werden.

Leistungsdaten

Siehe Tabellen und Grafiken mit repräsentativen Daten für den Assay. Die Ergebnisse sind in ng/ml ausgedrückt. (Alle Daten wurden – sofern nicht anders angegeben – mit Serumproben in Röhrchen ohne Gelbarrieren oder gerinnungsfördernde Zusätze ermittelt.)

Umrechnungsfaktor:
ng/ml x 331 → pmol/l

Messbereich: 0,5 – 7 ng/ml
(166 – 2 317 pmol/l)
kalibriert nach WHO 1st IRP 84/510

Analytische Sensitivität: 0,3 ng/ml (99 pmol/l) für Serum oder Plasma-Proben.

Präzision: Proben wurden innerhalb von 20 Tagen mit jeweils zwei Testansätzen in Doppelbestimmung gemessen (insgesamt 40 Bestimmungen und 80 Einzelmessungen; siehe Tabelle „Precision").

Linearität: Proben wurden in verschiedenen Verdünnungen getestet. (siehe Tabelle „Linearity").

Wiederfindung: Die getesteten Proben waren mit zwei C-Peptid-Lösungen (18 und 72 ng/ml) 1:19 versetzt. (Repräsentative Daten entnehmen Sie bitte der Tabelle „Recovery".)

Spezifität: Hochspezifischer Anti-C-Peptid-Antikörper (siehe Tabelle „Specificity").

Bilirubin: In einer Konzentration von 100 mg/l und 200 mg/l beeinträchtigt Bilirubin den Assay, d.h. es führt zu einer Erhöhung der Werte. (siehe Tabelle „Bilirubin")

Hämolyse: Erythrozytenkonzentrate haben in Konzentrationen bis zu 30 µl/ml keinen Einfluss auf die Messung, der größer als die Impräzision des Assays selbst ist.

Alternative Probenarten: kein signifikanter Effekt durch Heparin-Plasm, Becton Dickinson SST® Vacutainer-Rörchen. EDTA- und Natriumfluorid-Plasma sind in diesem Testsystem nicht empfehlenswert. Durch lineare Regression:

(Heparin) = 1,03 (Serum) – 0,04 ng/ml
r = 0,99

(SST) = 1,16 (Einfachen Röhrchen) + 0,81 ng/mL
r = 0,98

Mittelwerte:
4,4 ng/ml (Serum)
4,5 ng/ml (Heparin)
5,9 ng/ml (SST Röhrchen)

Methodenvergleich—Serum: Der Assay wurde unter Verwendung von 66 Patientenproben mit dem IMMULITE 2000 C-Peptid Assay von DPC verglichen. (Konzentrationsbereich ca. 0,5 – 6,5 ng/ml. Siehe Grafik.) Durch lineare Regression:

(IML) = 1,01 (IML 2000) – 0,1 ng/ml
r = 0,990

Mittelwerte:
2,8 ng/ml (IMMULITE)
2,8 ng/ml (IMMULITE 2000)

Methodenvergleich—Urin: Der Assay wurde unter Verwendung von 24 Urinproben mit dem Doppel Antikörper C-Peptid-RIA verglichen. (Konzentrationsbereich: bis ca. 6,7 ng/ml. Siehe Grafik: "Method Comparison: Urine".) Durch lineare Regression:

(IMMULITE) = 0,89 (DA) – 0,01 ng/ml
r = 0,983

Mittelwerte:
2,51 ng/ml (IMMULITE)
2,81 ng/ml (Doppel Antikörper)

Anwendungsberatung

Bei Rückfragen wenden Sie sich bitte an Ihre DPC Niederlassung.

Hergestellt von Euro/DPC Ltd. unter dem Qualitätssystem ISO 13485:2003.

Español

IMMULITE Péptido-C

Utilidad del análisis: Para su uso en el diagnóstico *in vitro* con los analizadores IMMULITE e IMMULITE 1000 — para la medida cuantitativa del Péptido-C en suero, plasma heparinizado, o urina, para su uso en diagnóstico in vitro como ayuda en el diagnóstico y tratamiento de los pacientes con secreción anormal de insulina.

Referencia: **LKPE1** (100 tests), **LKPE5** (500 tests)

Código del Test: **CPE**
Código de Color: **Gris Oscuro**

Resumen y Explicación del Test.

El Péptido-C humáno es una cadena de 31 aminoácidos con un peso molecular de aproximadamente 3 020 daltons. Metabólicamente inerte, se origina en las células β del páncreas como un subproducto del corte enzimático de la proinsulina.[1,2,5] En este proceso, la insulina y el Péptido-C se separan a partir de la prohormona y se secretan a la circulación portal en concentraciones equimoleculares.[4,5,7] En este hecho redunda el interés clínico de la determinación en plasma del Péptido-C.

Con limitaciones, los niveles de Péptido-C pueden ser utilizados como un índice valorable de secreción de insulina. Así, se esperarán bajos niveles de Péptido-C cuando la secreción de insulina se vea disminuida, como en el caso de una diabetes insulino-dependiente, o suprimida, como en una respuesta normal a la administración de insulina exógena; mientras que valores altos de Péptido-C pueden ser resultado de un incremento de actividad de las células β, como se observa en los insulinomas.[3,4,6,9]

Por consiguiente, en el diagnóstico diferencial de la hipoglucemia, las determinaciones de Péptido-C pueden ser utilizadas junto con las medidas de insulina como un índice de actividad pancreática en el test clásico de 72 horas en ayuno, y como único indicador de la actividad pancreática cuando la insulina por si sola es administrada para comprobar el grado de supresión.[1,8] Además, la auto-administración encubierta de insulina puede ser prácticamente descartada como causa de una hiperinsulinemia cuando se encuentran altos niveles de Péptido-C.[2,3,8,9]

Normalmente, en pacientes que llevan a cabo un tratamiento con insulina, se encuentran anticuerpos anti-insulina circulantes. Esto puede interferir con los inmunoensayos de insulina, haciendo imposible en este contexto la cuantificación de insulina para comprobar la actividad residual de las células β, incluso cuando el tratamiento haya sido suspendido temporalmente. Por tanto, las cuantificaciones de Péptido-C pueden ser utilizadas como un alternativa en este contexto, para proporcionar información adicional a la historia natural de una diabetes insulino-dependiente, para monitorizar indirectamente la secreción de insulina en presencia de anticuerpo anti-insulina, y para ayudar a establecer un adecuado programa de tratamiento. [3,6,7,10]

El Péptido-C tambien puede ser utilizado como un medio adicional para evaluar la tolerancia la glucosa y los test de glibenclamida-glucosa. [2,3,10]

Principio del análisis

El IMMULITE/IMMULITE 1000 C-Peptide es un inmunoensayo enzimático quimioluminiscente competitivo en fase sólida.

Ciclos de incubación: 1 × 60 minutos.

Recogida de la muestra

Suero y plasma heparinizado:
El paciente debe estar en ayunas.
Recoger la sangre por venopunción[12] , evitando la hemólisis, en tubos sin anticoagulante o con heparina, anotando la hora de recogida y proceder a la separación del suero de las células.

No se recomienda el uso de plasma con EDTA ni plasma con fluoruro sódico.

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

Las muestras hemolizadas podrían indicar una mala manipulación de la muestra

antes de ser recibida por el laboratorio; en este caso, los resultados deben interpretarse con precaución.

Las muestras ictericas o ampliamente contaminadas pueden dar resultados erróneos.

La centrifugacion de las muestras de suero antes de que se forme el coagulo puede ocasionar la presencia de fibrina. Para evitar resultados erroneos debidos a la presencia de fibrina, asegurarse que se ha formado el coagulo completamente antes de centrifugar las muestras. Algunas muestras, particularmente aquellas de pacientes sometidos a terapia anticoagulante, pueden requerir mayor tiempo de coagulacion.

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 Péptido-C IMMULITE/IMMULITE 1000 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.

Conservación: realizar el ensayo en las 2–3 horas tras la recogida de muestra, o congelar las muestras a –20°C durante una semana.[11]

Recogida de la Orina y Conservación: Recoger una muestra de orina de 24 horas sin conservador, manteniendo la muestra refrigerada a 2–8°C durante la recolección. Registrar el volumen total recogido y guardar una alícuota bien mezclada para analizar. Antes de analizar, aclarar la muestra por centrifugación o filtración.

Conservación: Para almacenamiento prolongado, alicuotar y congelar: estable a –20°C durante 30 dias.

Predilución de las muestras de la orina: Todas las muestras de orina deben ser diluidas por lo menos 1:4 con diluyente de muestra de Péptido-C antes de realizar el análisis. (Las muestras de orina no deben ser analizadas sin una dilución previa.) Una dilución 1:20 dará lugar a muestras de orina normales dentro del rango de calibración del análisis.

Volumen de Muestra
50 µl del suero, del plasma, o de la orina (prediluida). La copa de muestra debería contener al menos 100 µl más que el volumen total de muestra requerido para todos los tests a ser realizados sobre la muestra.

Advertencias y precauciones

Para uso diagnóstico *in vitro*.

Reactivos: Mantener a 2–8°C. Desechar de acuerdo con las normas aplicables.

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 sodica, en concentraciones menores de 0,1 g/dl, como conservante. Para su eliminacion, lavar con grandes cantidades de agua para evitar la constitucion de residuos de azidas metalicas, potencialmente explosivas, en las canerias de cobre y plomo.

Sustrato quimioluminiscente: evite la contaminación y exposición a la luz directa del sol. (Ver el prospecto.)

Agua: Use agua destilada o desionizada.

Materiales Suministrados

Los componentes representan un juego completo. Las etiquetas de código de barras son necesarias para el ensayo.

Unidades de análisis de Péptido-C (LPE1)
Cada unidad etiquetada con código de barras contiene una bola recubierta de anticuerpo policlonal de conejo anti-Péptido-C. Estable a 2–8°C hasta la fecha de caducidad.
LKPE1: 100 unidades.
LKPE5: 500 unidades.

Espere a que las bolsas de las unidades de análisis alcancen la temperatura ambiente antes de abrirlas. Ábralas cortando por el extremo superior, dejando el borde del cierre de cremallera intacto. Vuelva a cerrar las bolsas

herméticamente para protegerlas de la humedad.

Vial de Reactivo de Péptido-C (LPE2)
Con códigos de barras. 7,5 ml de fosfatasa alcalina (de intestino de ternera) conjugada al Peptido-C en solución tampón, con conservante. Guardar tapado y refrigerado: estable a 2–8°C hasta la fecha de caducidad. Se recomienda utilizarlo antes de que pasen 30 días después de abrirlo cuando se guarda según lo indicado.
LKPE1: 1 vial. **LKPR5:** 5 viales.

Ajustadores de Péptido-C (LPEL, LPEH)
Dos viales (bajo y alto) de péptido C liofilizado en albúmina humana tamponada, con conservante. Reconstituir cada vial añadiendo **4,0 ml** de agua destilada. Mezcle por agitación o inversión suave. Deje reposar 30 minutos. Mezcle por agitación o inversión suave hasta que se haya disuelto completamente el material liofilizado. Después de la reconstitución, alicuotar y congelar. Estable a –20°C durante 6 meses. Desechar las alícuotas después de usar.
LKPE1: 1 set. **LKPR5:** 2 sets.

Componentes del kit que se suministran por separado

Diluyente de muestra de Péptido-C (LPEZ)
Para diluciones manual de muestras de orina ó muestras de suero o plasma de elevada concentración. Un vial contiene 25 ml de albúmina humana tamponada libre de péptido-C, con conservante. Estable a 2–8°C durante 30 días después de abrise, o hasta 6 meses (alicuotados) a –20°C.

LSUBX: Sustrato quimioluminiscente
LPWS2: Lavado de sonda
LKPM: Kit de limpieza de sonda
LCHx-y: Soportes de recipientes de muestras (con códigos de barras)
LSCP: Recipientes de muestras (desechables)
LSCC: Tapas para los recipientes de muestras (opcionales)

PECM: Módulo Control de Péptido-C con tres niveles.

También necesarios
Pipetas de transferencia de muestras; agua destilada o desionizada; controles.

Ensayo

Aviso: para obtener el funcionamiento óptimo, es importante realizar todos los procedimientos del mantenimiento general según lo definido en el manual del operador de IMMULITE o IMMULITE 1000.

Ver el Manual del Operador del IMMULITE o IMMULITE 1000 para: preparación, procesamiento, diluciones, ajuste, procedimientos de ensayo y control de calidad.

Inspeccionar visulamente cada unidad de rección para asegurarse de que hay una bola antes de introducirla en el Sistema.

Predilución de las muestras de la orina: Todas las muestras de orina deben ser diluidas por lo menos 1:4 con diluyente de muestra de Péptido-C antes de realizar el análisis.

Intervalo de ajuste recomendado: 2 semanas.

Muestras de Control de calidad: Usar controles o pools de suero con al menos dos niveles diferentes (bajo y alto) de peptido-C.

Cálculo de Resultados

Los resultados para muestras de *orina*, tal y como son obtenidos por el Analizador IMMULITE, deben ser corregidos por la dilución, multiplicando por el factor de dilución. Los resultados se presentan normalmente en microgramos de péptido-C por cada 24 horas (µg/dia). Este valor puede ser obtenido multiplicando el resultado en ng/ml (= µg/L) por el volumen total de orina de 24 horas en litros.

Valores esperados

Suero y plasma heparinizado:
Basándonos en la excelente correlación con el ensayo IMMULITE 2000 Péptido-C de DPC, podemos esperar que el ensayo IMMULITE Péptido-C tenga una mediana de 2,1 ng/ml (695 pmol/l) y un rango de referencia 95% no paramétrico central de:

1,1 – 5 ng/ml (364 – 1 655 pmol/l)

para individuos en ayunas. El estudio del rango de referencia fue realizado en muestras de 71 voluntarios en ayunas.

Orina:
Basándonos en la excelente correlación con el ensayo Péptido-C de Doble Anticuerpo de DPC, podemos esperar que el ensayo IMMULITE Péptido C tenga una media ± SD de 79 ± 56 µg/día, con un intervalo de 2 a 260 µg/día representando el rango central 95% de las observaciones.

Estos límites han de considerarse sólo como una guía. Cada laboratorio deberá establecer sus propios intervalos de referencia.

Limitaciones

Debido a que el metabolismo del péptido-C difiere del metabolismo de la insulina, los niveles de péptido-C son el mejor índice semicuantitativo de la secreción de insulina. La vida media del péptido-C plasmático está estimada en 30 minutos, en comparación con los 5 minutos de la insulina plasmática. Debido a esta diferencia en su vida media, los niveles de péptido-C plasmáticos son cinco veces más elevados que los de insulina, aunque estas dos moléculas se segreguen en cantidades equimolares. Además, el hígado es la principal vía de degradación de la insulina, mientras que el péptido-C se degrada y elimina por vía renal. Las complicaciones hepáticas y renales van a afectar a la proporción péptido-C/ Insulina.

Los anticuerpos heterofílicos en el suero humano pueden reaccionar con las inmunoglobulinas de los componentes del ensayo provocando interferencias con los inmunoanálisis in vitro. [Ver Boscato LM, Stuart MC. Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays. Clin Chem 1988:34:27-33.] Las muestras de los pacientes que frecuentemente están expuestos a animales o a productos séricos animales pueden presentar este tipo de interferencia que potencialmente ocasione un resultado anómalo. Estos reactivos han sido formulados para minimizar el riesgo de interferencia, no obstante, pueden darse interacciones anómalas entre sueros conflictivos y los componentes del ensayo. Con fines de diagnóstico, los resultados obtenidos con este ensayo siempre deben ser usados en combinación con el examen clínico, la historia médica del paciente y cualquier otro dato clínico relevante.

Características analíticas

Los resultados de Péptido-C se expresan como nanogramos por mililitro (ng/ml). A menos que se especifique lo contrario, todos los resultados se obtuvieron con muestras de suero recogidas en tubos sin anticoagulantes, geles separadores o aditivos promotores de la coagulación.

Factor de Conversión:
ng/ml x 331 → pmol/L

Intervalo de calibración: 0,5 – 7 ng/ml (166 – 2 317 pmol/L), (WHO 1st IRP 84/510)

Sensibilidad: 0,3 ng/ml (99 pmol/l) para muestra de suero y plasma

Precision: Las muestras fueron procesadas en cuadriplicado durante varios dias, para un total de 20 tandas y 80 replicados. (Ver la tabla de "Precision").

Linealidad: las muestras fueron analizadas con varias diluciones. (Ver la tabla de “Linearity” para resultados representativos).

Recuperación: Se analizaron muestras sobrecargadas 1 en 19 con dos soluciones de Péptido-C (18 y 72 ng/ml). (Ver la tabla "Recovery" para resultados representativos).

Especificidad: El anticuerpo es muy específico para Péptido-C. (Véase la tabla "Specificity").

Bilirrubina: Interfiere con el ensayo a niveles de 100 mg/l y 200 mg/l, provocando una elevación de los valores. (Véase la tabla "Bilirubin")

Hemolisis: La presencia de eritrocitos hasta concentraciones de 30 µL/mL no tiene efecto en los resultados, en lo concerniente a la precisión del ensayo.

Tipos de Muestras Alternativos: Sin efecto significativo para plasma heparinizado, tubos vacutainer SST® de Becton Dickinson. No se recomienda el uso de plasma con EDTA ni de plasma con fluoruro sódico. Por regresión lineal:

(Heparina) = 1,03 (Suero) – 0,04 ng/ml
r = 0,99

(SST) = 1,16 (Tubos Simples) + 0,81 ng/mL
r = 0,98

Medias:
4,4 ng/ml (Suero)
4,5 ng/ml (Heparina)
5,9 ng/ml (Tubos SST)

Comparación de los métodos–suero: El ensayo se comparó con el IMMULITE 2000 Péptido-C de DPC sobre 66 muestras de pacientes. (Intervalo de concentración: aproximadamente 0,5 – 6,5 ng/mL. Véase el gráfico). Por regresión lineal:

(IML) = 1,01 (IML 2000) – 0,1 ng/ml
r = 0,990

Medias:
2,8 ng/ml (IMMULITE)
2,8 ng/ml (IMMULITE 2000)

Comparación de los métodos–orina: El ensayo de IMMULITE Péptido-C se comparó con el ensayo Péptido-C de Doble Anticuerpo de DPC sobre 24 muestras de pacientes, con concentraciones de Péptido-C superiores a 6,7 ng/ml. (Véase el gráfico.) El análisis de la regresión lineal ofreció la siguiente estadística:

(IMMULITE) = 0,89 (DA) + 0,01 ng/ml
r= 0,983

Medias:
2,51 ng/ml (IMMULITE)
2,81 ng/ml (Doble Anticuerpo)

Asistencia técnica

Póngase en contacto con su Distribuidor Nacional.

Fabricado por EURO/DPC Ltd. bajo un Sistema de Calidad acorde con la ISO 13485:2003.

Français

IMMULITE C-Peptide

Domaine d'utilisation : dosage quantitatif du C-Peptide dans le sérum, le plasma hépariné ou les urines. Ce test est réservé à un usage diagnostique *in vitro* avec l'Analyseur IMMULITE et de IMMULITE 1000 et constitue une aide au diagnostic et au traitement de patients présentant une sécrétion anormale d'insuline.

Référence catalogue : **LKPE1** (100 tests), **LKPE5** (500 tests)

Code produit : **CPE** Couleur : **Gris Foncé**

Introduction

Le C-Peptide humain est constitué d'une chaîne peptidique de 31 acides aminés, son poids moléculaire est d'environ 3 020 daltons. Métaboliquement inerte, il provient des cellules β du pancréas où il est issu du clivage enzymatique de la pro-insuline en insuline.[1,2,5] Au cours de cette réaction, l'insuline et le C-Peptide sont donc libérés à partir de cette pro-hormone et sécrétés dans la circulation portale à des concentrations équimolaires.[4,5,7] Ce mode de sécrétion explique l'intérêt clinique de la détermination du taux de C-Peptide plasmatique.

Dans certaines limites, le taux de C-Peptide peut donc constituer un index valable de la sécrétion d'insuline. De faibles taux de C-Peptide seront ainsi trouvés lors d'une diminution de la sécrétion d'insuline dans le diabète insulino-dépendant, ou en l'absence normale de toute sécrétion, lors de l'apport d'insuline exogène. En revanche, des taux élevés de C-Peptide peuvent être le résultat de l'augmentation de l'activité des cellules β observée dans les insulinomes. [3,4,6,9]

Par conséquent dans le diagnostic différentiel de l'hypoglycémie, le dosage du C-Peptide, en complément du dosage de l'insuline, sera utilisé comme un index de l'activité pancréatique en utilisation classique (sérum de 72 heures) et comme le seul indicateur de l'activité pancréatique lorsque l'insuline est administrée pour définir le taux de suppression. [1,8] Enfin, une administration cachée d'insuline peut être virtuellement éliminée des causes d'hyperinsulinémie si le taux de C-Peptide est élevé. [2,3,8,9]

Des anticorps circulants anti-insuline sont fréquemment trouvés chez des patients sous traitement à l'insuline. Ces anticorps interfèrent dans le dosage de l'insuline, rendant alors impossible tout contrôle de l'activité résiduelle des cellules β même si le traitement est suspendu temporairement. Le dosage du C-Peptide remplace alors dans ce contexte celui de l'insuline et permet de définir l'origine d'un diabète insulino-dépendant, de suivre indirectement la sécrétion d'insuline en présence d'anticorps anti-insuline et

d'aider à la mise en place d'un traitement approprié.[3,6,7,10]

Le dosage du C-Peptide peut également permettre d'évaluer la tolérance, lors des tests au glucose et au glibenclamide - glucose.[2,3,10]

Principe du test

IMMULITE/IMMULITE 1000 C-Peptide est une immunoenzymologie chimioluminescente compétitive à phase solide.

Cycles d'incubation : 1 × 60 minutes.

Recueil des échantillons

Sérum et plasma hépariné:
Le patient doit être à jeun. Prélever par ponction veineuse,[12] en évitant l'hémolyse, sur tubes secs (sans anticoagulant) ou sur tubes héparinés. Noter l'heure du prélèvement et séparer le sérum ou le plasma des cellules.

Les plasmas EDTA et fluorure de sodium ne doivent pas être utilisés.

Il est recommandé de clarifier les échantillons hyperlipémiques par ultracentrifugation.

Des échantillons hémolysés peuvent être révélateurs d'une préparation inadéquate du prélèvement avant son envoi au laboratoire ; il faudra donc interpréter les résultats avec prudence.

Des échantillons ictériques ou fortement contaminés peuvent donner des résultats érronés.

La centrifugation des échantillons sériques avant la formation complète du caillot peut entraîner la présence de fibrine. Pour éviter les résultats erronés dûs à la présence de fibrine, s'assurer de la formation complète du caillot avant de centrifuger les échantillons. Certains échantillons, en particulier ceux provenant de patients sous anti-coagulants, peuvent nécessiter un temps plus long pour la formation du caillot.

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 C-Peptide IMMULITE/IMMULITE 1000 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.

Conservation : Doser dans les 2 à 3 heures suivantes ou conserver congelé à –20°C pendant 1 semaine.[11]

Urine – Recueil des échantillons et Conservation:
Collecter les urines de 24 heures sans conservateur et conserver les échantillons réfrigérés à +2–8°C durant le prélèvement. Inscrire le volume total des urines et conserver une partie bien homogénéisée pour l'analyse. Avant d'effectuer le dosage, clarifier les échantillons par une centrifugation ou par une filtration.

Conservation : Pour une conservation plus longue, aliquoter et congeler: stable 30 jours à –20°C.

Prédilution des échantillons d'urine : tous les échantillons d'urine doivent être dilués *au moins* au 1:4 dans du diluant C-Peptide avant dosage (les échantillons d'urine *ne doivent pas* être dosés sans dilution préalable). Une dilution au 1:20 amènera les échantillons d'urine normaux dans le domaine de mesure du dosage.

Volume nécessaire
50 µl de sérum, de plasma ou d'urine (prédiluée). (L'unité-échantillon doit contenir au moins 100 µl de plus que le volume total nécessaire.)

Précautions d'emploi

Réservé à un usage diagnostique *in vitro*.

Réactifs : conserver les réactifs à +2/ +8°C. Eliminer les déchets conformément à la réglementation en vigueur.

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-HCV 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.

Substrat chimiluminescent : éviter la contamination et l'exposition directe au soleil. (Voir notice).

Eau : utiliser de l'eau distillée ou désionisée.

Matériel fourni

Les composants de la trousse ne peuvent être utilisés que conjointement. Les étiquettes à code-barre sont nécessaires au dosage.

Tests unitaires C-Peptide (LPE1)
Avec code-barre. Chaque unité test contient une bille revêtue d'un anticorps polyclonal de lapin anti-C-Peptide. Stable à +2°C/+8°C jusqu'à la date de péremption.
LKPE1: 100 unités.
LKPE5: 500 unités.

Porter les sachets à température ambiante avant d'ouvrir. Ouvrir le sachet avec des ciseaux en préservant le dispositif de fermeture. Refermer les sachets pour les protéger de l'humidité.

Cartouche à réactif C-Peptide (LPE2)
Avec code-barres. 7,5 ml de C-Peptide marqué à la phosphatase alcaline (intestins de veau) dans un tampon, avec conservateur. Conserver bouché et réfrigéré : stable à +2°C/+8°C jusqu'à la date de péremption. A utiliser de préférence dans les 30 jours qui suivent l'ouverture, si les recommandations de stockage sont respectées.
LKPE1: 1 flacon. **LKPE5:** 5 flacons.

Ajusteurs C-Peptide (LPEL, LPEH)
2 flacons ("Haut" et "Bas") de C-Peptide lyophilisé dans de l'albumine humaine tamponnée, avec conservateur. Reconstituer chaque flacon avec **4,0 ml** d'eau distillée ou désionisée. Laisser reposer 30 mn. Agiter doucement jusqu'à complète dissolution du produit lyophilisé. Après reconstitution, aliquoter et congeler. Stable à –20°C pendant 6 mois. Jeter les aliquots après utilisation
LKPE1: 1 jeu. **LKPE5:** 2 jeux.

Composants du coffret fournis séparément

Diluant C-Peptide (LPEZ)
Pour la dilution manuelle des échantillons d'urine et des échantillons de sérum/plasma de concentration élevée. Un flacon contenant 25 ml d'albumine humaine prétraitée et tamponnée sans C-Peptide avec conservateur. Stable à +2°C/+8°C pendant 30 jours après ouverture ou 6 mois (aliquoté) à –20°C.

LSUBX : Substrat chimiluminescent
LPWS2 : Solution de lavage
LKPM : Coffret de décontamination de l'aiguille de prélèvement
LCHx-y : Supports pour godets échantillons (avec code-barre)
LSCP : Godets échantillons (à usage unique)
LSCC : Bouchons pour godets échantillons (optionnel)

PECM : Contrôle C-Peptide à trois niveaux.

Egalement requis
Pipettes pour le transfert des échantillons ; eau distillée ou désionisée ; contrôles.

Protocole de dosage

Noter que pour des performances optimales, il est important de réaliser toutes les procédures de maintenance de routine selon les instructions du Manuel d'Utilisation de l'IMMULITE ou de l'IMMULITE 1000.

Voir le manuel d'utilisation de l'IMMULITE ou de l'IMMULITE 1000 pour la préparation, le démarrage du système, les ajustements, le dosage et les procédures de contrôle de qualité.

Vérifier visuellement que chaque Unité-Test contient bien une bille avant de la charger dans l'automate.

Prédilution des échantillons d'urine : tous les échantillons d'urine doivent être dilués au moins au 1:4 dans du diluant C-Peptide avant dosage.

Intervalle d'ajustement recommandé : 2 semaines.

Echantillons pour le contrôle de qualité : Utiliser des contrôles ou des pools de

sérums avec au moins deux niveaux de concentration (faible ou élevé) de C-Peptide.

Calcul des résultats

Les résultats pour les échantillons *d'urine*, comme rendus par l'IMMULITE, doivent être corrigés pour la dilution en multipliant par le facteur de dilution. Les résultats sont habituellement rendus en microgrammes de C-Peptide par 24 heures (µg/jour), que l'on peut obtenir en multipliant le résultat en ng/ml (=µg/l) par le volume total de la collecte de 24 heures en *litres*.

Valeurs attendues

Sérum et plasma hépariné :
Basé sur la corrélation avec le dosage IMMULITE 2000 C-Peptide de DPC, le test IMMULITE C-Peptide doit avoir une médiane à 2,1 ng/ml (695 pmol/l) et un domaine non paramétrique centré à 95 % de :

1,1 – 5 ng/ml (364 –1 655 pmol/l)

pour des individus à jeun. L'étude des valeurs normales a été réalisée sur 71 volontaires à jeun

Urine :
Basé sur la corrélation avec le dosage Double Anticorps C-Peptide de DPC, le test IMMULITE C-Peptide doit avoir une moyenne ± SD de 79 ± 56 µg/j avec un domaine centré à 95 % de 2 à 260 µg/j.

Utiliser ces valeurs *à titre indicatif* uniquement. Chaque laboratoire devrait établir ses propres valeurs de référence.

Limites

Puisque le métabolisme du C-Peptide est assez différent de celui de l'insuline, les taux du C-Peptide représentent un index semi-quantitatif de la sécrétion d'insuline. En effet, la demi-vie du C-Peptide dans le plasma est approximativement de 30 minutes, comparée à celle de l'insuline qui n'est que de 5 minutes. En raison de la différence au niveau de la demi-vie, le taux plasmatique circulant du C-Peptide est grossièrement 5 fois celui de l'insuline bien que les deux molécules soient sécrétées selon un ratio équimolaire. Une fois encore, le foie joue un rôle majeur dans la clairance de l'insuline, alors que le C-Peptide est dégradé et éliminé au niveau rénal. Par conséquent, les complications rénales ou hépatiques affectent le ratio C-Peptide/Insuline circulant.

Les anticorps hétérophiles du sérum humain peuvent réagir avec les immunoglobulines faisant partie des composants du coffret et interférer avec les immunodosages in vitro. [Voir Boscato LM, Stuart MC. Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays. Clin Chem 1988:34:27-33.] Les échantillons provenant de patients fréquemment exposés aux animaux ou aux produits sériques d'origine animale peuvent présenter ce type d'interférence pouvant potentiellement donner un résultat anormal. Ces réactifs ont été mis au point afin de minimiser le risque d'interférence, cependant des interactions potentielles entre des sérums rares et les composants du test peuvent se produire. Dans un but diagnostique, les résultats obtenus avec ce dosage doivent toujours être utilisés en association avec un examen clinique, l'histoire médicale du patient et d'autres résultats.

Performances du test

Consulter les tableaux et graphiques pour obtenir les données *représentatives* des performances du test. Les résultats sont donnés en ng/ml. (En l'absence de précision supplémentaire, tous les résultats ont été obtenus sur des échantillons sériques prélevés sur tubes sans anticoagulant, ni gel, ni activateur de la coagulation).

Facteur de conversion :
ng/ml x 331 → pmol/l

Domaine de mesure : 0,5 – 7 ng/ml (166 – 2 317 pmol/l), (OMS 1° IRP 84/510).

Sensibilité analytique : 0,3 ng/ml (99 pmol/l) pour les échantillons de sérum et de plasma.

Précision : les échantillons ont été dosés en quadruple pendant plusieurs jours, soit un total de 20 séries et de 80 résultats. (Voir le tableau « Precision ».)

Test de dilution : des échantillons ont été dosés à différentes concentrations. (Voir

le tableau « Linearity » pour des données représentatives.)

Récupération: les échantillons testés ont été chargés dans un rapport de 1 à 19 avec deux solutions (18 et 72 ng/ml). (Voir le tableau « Recovery » pour des données représentatives.)

Spécificité : l'anticorps est hautement spécifique du C-Peptide. (Voir le tableau « Specificity ».)

Bilirubine : interfère avec le dosage pour des concentrations de 100 mg/l et 200 mg/l en causant une élévation des valeurs. (Voir le tableau « Bilirubin ».)

Hémolyse : La présence d'agrégat d'hématies jusqu'à une concentration de 30 µl/ml, n'a aucun effet sur les résultats quant à la précision du dosage.

Utilisation de différents types d'échantillons : aucun effet significatif pour le plasma hépariné, tubes vacutainer SST® Becton Dickinson. Les plasmas EDTA et fluorure de sodium ne doivent pas être utilisés. Par régression linéaire :

(Héparine) = 1,03 (Sérum) – 0,04 ng/ml
r = 0,99

(SST) = 1,16 (Tubes Ordinaires) + 0,81 ng/mL
r = 0,98

Moyennes .
4,4 ng/ml (Sérum)
4,5 ng/ml (Héparine)
5,9 ng/ml (Tubes SST)

Comparaison de méthodes – sérum: Le test a été comparé au test IMMULITE 2000 C-Peptide de DPC sur 66 échantillons sériques (dont les concentrations allaient d'environ 0,5 à 6,5 ng/ml. Voir le graphique). Par régression linéaire :

(IML) = 1,01 (IML 2000) – 0,1 ng/ml
r = 0,990

Moyennes .
2,8 ng/ml (IMMULITE)
2,8 ng/ml (IMMULITE 2000)

Comparaison de méthodes – urine: Le test a été comparé au test Double Anticorps C-Peptide de DPC sur 24 échantillons d'urine (dont les concentrations allaient jusqu'à environ 6,7 ng/ml. Voir le graphique "Method Comparison : Urine"). Par régression linéaire :

(IML) = 0,89 (DA) – 0,01 ng/ml
r = 0,983

Moyennes .
2,51 ng/ml (IMMULITE)
2,81 ng/ml (Double Anticorps)

Assistance technique

En France distribué par DPC France 90 bd National 92257 La Garenne-Colombes.

Fabriqué par EURO/DPC Ltd. dans le cadre d'un Système Qualité enregistré sous ISO 13485:2003.

Italiano

IMMULITE C-Peptide

Uso: Ad uso diagnostico *in vitro* con gli Analizzatori IMMULITE ed IMMULITE 1000 — per la misurazione quantitativa del C-Peptide nel siero, nel plasma eparinizzato o nell'urina, quale ausilio nella diagnosi e nel trattamento di pazienti con una secrezione anomala di insulina.

Codice: **LKPE1** (100 test),
LKPE5 (500 test)

Codice del Test: **CPE**
Colore: **Grigio Scuro**

Riassunto e Spiegazione del Test

Il C-Peptide umano è costituito da una catena di 31 aminoacidi con una massa molecolare di circa 3 020 dalton. Metabolicamente inerte, ha origine nelle cellule pancreatiche β quale sottoprodotto della scissione enzimatica dalla proinsulina all'insulina.[1,2,5] In questo processo, l'insulina ed il C-Peptide sono divisi dal proormone e distribuiti nel circolo portale in concentrazioni equimolari.[4,5,7] E' questo fatto che sottolinea l'interesse clinico nelle determinazioni del C-Peptide.

Entro dei limiti, i livelli di C-Peptide possono servire come indice importante di secrezione dell'insulina. Per questo motivo, sono da attendersi livelli bassi di C-Peptide nei casi in cui la secrezione dell'insulina sia diminuita, come nel diabete insulino-dipendente, o soppressi, quale risposta normale all'insulina esogena; mentre livelli elevati di C-Peptide possono essere causati dall'aumento dell'attività delle cellule-β osservato nell'insulinoma.[3,4,6,9]

Per questo motivo, nella diagnosi differenziale di ipoglicemia, le determinazioni del C-Peptide possono essere utilizzate in aggiunta alle misurazioni dell'insulina quale indice dell'attività pancreatica nel classico test del digiuno di 72 ore, e come unico indicatore dell'attività pancreatica nei casi in cui l'insulina stessa venga somministrata per controllare la soppressione.[1,8] Inoltre, l'autosomministrazione celata di insulina può essere virtualmente eliminata come causa di iperinsulinemia mediante la scoperta di un livello di C-Peptide elevato.[2,3,8,9]

Anticorpi anti-insulina circolanti sono spesso riscontrati in pazienti sottoposti a terapia con insulina. Di solito questi interferiscono con gli immunodosaggi della insulina, rendendo impossibile l'uso delle determinazioni di insulina in questo contesto per controllare l'attività residua delle cellule-β, anche se il trattamento fosse temporaneamente sospeso. Per questo motivo, le misurazioni del C-Peptide sono state utilizzate come alternativa in questo contesto, per ottenere informazioni sull'andamento del diabete insulino-dipendente, per controllare indirettamente la secrezione di insulina in presenza di anticorpi anti-insulina, e per aiutare nella scelta della terapia idonea.[3,6,7,10]

Il C-Peptide è stato misurato anche come ulteriore strumento di valutazione della tolleranza al glucosio e nei dosaggi del glibenclamide-glucosio.[2,3,10]

Principio del Dosaggio

IMMULITE/IMMULITE 1000 C-Peptide é un enzima di fase solida, chimico luminescente, immuno-analisi.

Cicli d'incubazione: 1 × 60 minuti.

Prelievo dei Campioni

Siero e plasma eparinizzato:
Il paziente deve essere a digiuno.
Effettuare il prelievo di sangue,[12] evitando l'emolisi, in provette semplici (senza anticoagulante) o in provette eparinizzate, annotando l'ora del prelievo, e separare il siero o il plasma dalle cellule.

Non si consiglia l'utilizzo di plasma EDTA e di fluoruro di sodio.

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

I campioni emolizzati posson indicare il trattamento non idoneo del campione prima dell'arrivo al laboratorio; per questo motivo, i risultati devono essere interpretati con prudenza.

I campioni itterici o grossolamente contaminati possono produrre risultati errati.

La centrifugazione di campioni di siero prima che la coagulazione sia completa può produrre fibrina. Per evitare risultati errati dovuti alla presenza di fibrina, assicurarsi che il processo di coagulazione sia completo prima di centrifugare i campioni. Alcuni campioni, in modo particolare quelli di pazienti sottoposti a terapia con anticoagulanti, possono richiedere tempi di coagulazione più lunghi.

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'IMMULITE/IMMULITE 1000 C-Peptide non é stato verificato con tutte le possibili variazioni di tipi di provette. Consultare la sezione riguardante Campioni Alternativi per dettagli sulle provette testate.

Conservazione: I campioni di siero e di plasma non analizzati entro 2–3 ore possono essere *congelati* a –20°C per una settimana.[11]

Urina – Raccolta e Conservazione:
Prelevare le urine nelle 24 ore, senza conservanti, mantenendo il campione refrigerato a 2–8°C durante il prelievo. Annotare il volume totale del prelievo e conservare un'aliquota ben mescolata per l'analisi. Prima del dosaggio, schiarire il campione attraverso centrifugazione e filtrazione.

Conservazione: Per una conservazione prolungata: aliquotare e congelare: stabile a –20°C per 30 giorni.

Prediluizione dei campioni di urina:
Tutti i campioni di urina devono essere diluiti *almeno* 1:4 con il Diluente C-Peptide prima del dosaggio. (I campioni di urina *non dovrebbero* essere dosati senza diluizione precedente). Una diluizione 1:20

porterebbe i campioni di urina normali entro il range di calibrazione del dosaggio.

Volume Richiesto:
50 µL di siero, plasma o urina (prediluito). (Il porta campioni deve contenere almeno 100 µL più del volume totale richiesto).

Avvertenze e Precauzioni

Ad uso diagnostico *in vitro*.

Reagenti: Conservare i reagenti a 2–8°C. Eliminare in conformità alle leggi vigenti.

Seguire le precauzioni generali e manipolare tutti i componenti come se fossero potenzialmente infetti. I materiali derivati dal sangue umano sono stati testati con esito negativo per la sifilide, gli anticorpi anti-HIV 1 e 2, l'Antigene di Superficie dell'Epatite B e 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.

Substrato Chemiluminescente: Evitare la contaminazione e l'esposizione alla luce solare diretta. (Vedi metodica.)

Acqua: Utilizzare solo acqua distillata o deionizzata.

Materiali Forniti

I componenti sono un gruppo accoppiato. Le etichette del codice a barra sono necessarie per la prova.

Test Unit C-Peptide (LPE1)
Ogni test unit con codice a barre contiene una sferetta coattata con un anticorpo policlonale di coniglio anti-C-Peptide. Stabile a 2–8°C fino alla data di scadenza. **LKPE1:** 100 unit. **LKPE5:** 500 unit.

Le buste delle test unit devono essere portate a temperatura ambiente prima dell'apertura. Aprire tagliando lungo il bordo superiore, lasciando intatta la chiusura ermetica. Risigillare le buste per proteggere le sferette dall'umidità.

Porta Reagente C-Peptide (LPE2)
con codice a barre. 7,5 mL di fosfatasi alcalina (intestino di vitello) coniugata con C-Peptide in un tampone, con conservanti. Conservare sigillato nel frigorifero: stabile a 2–8°C fino alla data di scadenza. Si consiglia di utilizzare il prodotto entro 30 giorni dall'apertura se conservato nella maniera indicata.
LKPE1: 1 porta reagente.
LKPE5: 5 porta reagenti.

Calibratori C-Peptide (LPEL, LPEH)
Due flaconi (uno Basso e uno Alto) di C-Peptide liofilo in un tampone di albumina umana, con conservanti. Ricostituire ogni flacone con **4,0 mL** di acqua distillata o deionizzata. Lasciar riposare per 30 minuti. Mescolare agitando delicatamente o invertendo la miscela finchè il materiale liofio sia completamente dissolto. Dopo la ricostituzione, aliquotare e congelare. Stabile a –20°C per 6 mesi. Scartare le aliquote dopo l'uso.
LKPE1: 1 set. **LKPE5:** 2 set.

Componenti del Kit Forniti Separatamente

Diluente del C-Peptide (LPEZ)
Per la diluizione manuale dei campioni di urina e dei campioni elevati di siero/plasma. Un flacone contenente 25 mL di albumina umana tamponata, processata e priva di C-Peptide, con conservanti. Stabile a 2–8°C per 30 giorni dopo l'apertura, o per 6 mesi (aliquotato) a –20°C.

LSUBX: Substrato Chemiluminescente
LPWS2: Tampone di lavaggio dell'Ago
LKPM: Kit di Pulizia dell'Ago
LCHx-y: Tubi porta campioni (con codice a barre)
LSCP: Porta campioni (monouso)
LSCC: Coperchi per porta campioni (opzionali)

PECM: Controllo C-Peptide tri-levello

Materiali richiesti
Pipette per la dispensazione dei campioni; acqua distillata o deionizzata; controlli.

Procedura del Dosaggio

Attenzione: per avere prestazioni ottimali, è importante effettuare le procedure di manutenzione di routine cosiccome definito nel Manuale dell'Operatore IMMULITE o IMMULITE 1000.

Vedi il Manuale dell'Operatore IMMULITE o IMMULITE 1000 per: preparazione, setup, diluizione, calibrazione, dosaggio e controllo di qualità.

Controllate ogni test unit verificando la presenza della sferetta prima di caricarla sullo strumento.

Prediluizione dei campioni di urina: Tutti i campioni di urina devono essere diluiti *almeno* 1:4 con il Diluente C-Peptide per campioni prima del dosaggio.

Intervallo di Calibrazione Consigliato: 2 settimane.

Controllo di Qualità: Utilizzare controlli o pool di sieri con almeno due livelli (Alto e Basso) di C-Peptide.

Calcolo dei Risultati

I risultati per i campioni *di urina* cosiccome calcolati dall'analizzatore IMMULITE devono essere corretti moltiplicando per il fattore di diluizione. Di solito, i risultati vengono registrati come microgrammi di C-Peptide nelle 24 ore (µg/giorno). Questo può essere ottenuto moltiplicando il risultato in ng/mL (= µg/L) per il volume totale del prelievo nelle 24-ore in *litri*.

Valori Attesi

Siero e plasma eparinizzato:
Sulla base della correlazione con il dosaggio DPC C-Peptide IMMULITE 2000, il dosaggio C-Peptide IMMULITE dovrebbe produrre un valore mediano di 2,1 ng/mL (695 pmol/L) ed un range parametrale centrale 95% di:

1,1 – 5 ng/mL (364 – 1 655 pmol/L)

per individui a digiuno. Lo studio sul range di riferimento è stato condotto su campioni di siero prelevati da 71 volontari a digiuno.

Urina:
Sulla base della correlazione con il dosaggio Double Antibody C-Peptide della DPC, il dosaggio C-Peptide IMMULITE ci si attende debba presentare una SD media di 79 ± 56 µg/giorno, con un range da 2 a 260 µg/giorno che rappresenta un range centrale del 95% delle osservazioni.

Detti valori dovrebbero essere considerati solo come *suggerimento*. Ogni laboratorio dovrebbe stabilire i propri range di riferimento.

Limiti

Poiché il metabolismo del C-Peptide differisce dal metabolismo dell'insulina, i livelli di C-Peptide sono un indice semi-quantitativo della secrezione di insulina. E' stata stimata l'emivita del C-Peptide nel plasma di circa 30 minuti, paragonata a circa 5 minuti dell'insulina. A causa della differenza nell'emivita, il C-Peptide circola nel plasma ad un livello cinque volte superiore a quello dell'insulina, anche se le due molecole sono secrete in rapporto equimolare. E' chiaro che il fegato ha un ruolo chiave nell'eliminazione dell'insulina, mentre il C-Peptide viene rimosso mediante degradazione ed eliminazione principalmente attraverso i reni. Per questo motivo, complicazioni epatiche e renali avranno un effetto sul rapporto C-Peptide/insulina circolante

Gli anticorpi eterofili presenti nel siero umano possono reagire con le immunoglobuline presenti nelle componenti del dosaggio provocando un'interferenza con i dosaggi in vitro. [Vedi Boscato LM, Stuart MC. Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays. Clin Chem 1988:34:27-33.] Campioni di pazienti routinariamente esposti agli animali o a prodotti derivati da siero di animali possono presentare questo tipo di interferenza causa potenziale di risultati anomali. Questi reagenti sono stati formulati per minimizzare il rischio di interferenze, tuttavia, possono verificarsi interazioni potenziali tra sieri rari e componenti del test. A scopo diagnostico, i risultati ottenuti da questo dosaggio devono sempre essere utilizzati unitamente all'esame clinico, all'anamnesi del paziente e ad altre indagini di laboratorio.

Prestazioni del Dosaggio

Vedere le tabelle ed i grafici per dati *rappresentativi* delle prestazioni del dosaggio. I risultati sono espressi in ng/mL. (Se non diversamente specificato, tutti i risultati sono stati generati su campioni di siero, prelevati in provette senza anticoagulanti, barriere di gel o additivi che favoriscano la formazione di coaguli).

Fattore di Conversione:
ng/mL × 331 → pmol/L

Range di calibrazione: 0,5 – 7 ng/mL (166 – 2 317 pmol/L), (WHO 1st IRP 84/510)

Sensibilità analitica: 0,3 ng/mL (99 pmol/L) per campioni di siero e di plasma.

Precisione: i campioni sono stati ripetutamente dosati in quadruplicato nel corso di più giorni, per un totale di 20 sedute e 80 replicati. (vedi la tabella "Precision").

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

Recupero: Sono stati dosati campioni 1:19 ai quali sono state aggiunte due soluzioni (18 e 72 ng/mL). (Vedi la Tabella "Recovery" per dati rappresentativi.)

Specificità: L'anticorpo è molto specifico per il C-Peptide. (Vedere la tabella "Specificity")

Bilirubina: Interferisce con il dosaggio a livelli di 100 mg/L e 200 mg/L, causando un innalzamento dei valori. (Vedere la tabella "Bilirubin")

Emolisi: La presenza di globuli rossi impaccati in concentrazioni fino a 30 µL/mL non ha effetto sui risultati entro il range di precisione del dosaggio.

Tipo di Campione Alternativo: Nessun effetto significativo per plasma eparinizzato, Becton Dickinson vacutainer SST®. Non utilizzare plasma EDTA ed plasma al fluoruro di sodio. Mediante regressione lineare:

(Eparina) = 1,03 (Siero) – 0,04 ng/mL
r = 0,99

(SST) = 1,16 (Tubi Semplici) + 0,81 ng/mL
r = 0,98

Valore Medio:
4,4 ng/mL (Siero)
4,5 ng/mL (Eparina)
5,9 ng/mL (Tubi SST)

Comparazione di Metodi – Siero: Il dosaggio è stato comparato al dosaggio IMMULITE 2000 C-Peptide della DPC in 66 campioni di siero. (Range di concentrazione: fino a 0,5 – 6,5 ng/mL circa. Vedi grafico.) Con regressione lineare:

(IML) = 1,01 (IML 2000) – 0,1 ng/mL
r = 0,990

Valore medio:
2,8 ng/mL (IMMULITE)
2,8 ng/mL (IMMULITE 2000)

Confronto di metodi – Urina: Il dosaggio è stato paragonato al Doppio Anticorpo C-Peptide della DPC in 24 campioni di urina. Range di concentrazione: fino a 6,7 ng/mL circa. Vedi grafico.) Con regressione lineare:

(IML) = 0,89 (DA) – 0,01 ng/mL
r = 0,983

Valore medio:
2,51 ng/mL (IMMULITE)
2,81 ng/mL (Doppio Anticorpo)

Assistenza Tecnica

All'estero: Si prega di contattare il proprio Distributore DPC Nazionale.

Prodotto dalla EURO/DPC Ltd. nell'ambito di un Sistema di Qualità Certificato ISO 13485:2003.

Português

IMMULITE Péptido-C

Utilização: Para o doseamento *in vitro* de Péptido-C em soro, plasma heparinizado ou urina, no auxílio ao diagnóstico e tratamento de doentes com secreção anormal de insulina, em conjunto com o Analisador IMMULITE e IMMULITE 1000.

Números de catálogo:
LKPE1 (100 testes), **LKPE5** (500 testes)

Código do teste: **CPE**
Cor: **Cinzento escuro**

Sumário e explicação do teste

O Péptido-C humano é uma cadeia de 31 aminoácidos com uma massa molecular de aproximadamente 3 020 daltons. Metabolicamente inerte,tem origem nas β-células pancreáticas como um subproduto da segmentação enzimática de pró-insulina para insulina.[1,2,5] Neste processo, a insulina e o Péptido-C são separados da pró-hormona e segregados na circulação portal em concentrações equimolares.[4,5,7] É este factor que determina a base do interesse clínico nas determinações no plasma do Péptido-C.

Dentro de certos limites, os níveis de Péptido-C podem actuar como um índice valioso para a secreção de insulina. Deste

modo, esperam-se baixos níveis de Péptido-C onde a secreção de insulina estiver diminuída, como no caso de diabetes dependentes de insulina, ou suprimida, como resposta normal à insulina exogenética; enquanto níveis elevados de Péptido-C podem resultar do aumento de actividade das β-células observado em insulinomas.[3,4,6,9]

Deste modo, no diagnóstico diferencial de hipoglicemia, as determinações do Péptido-C podem ser utilizadas para complementar medições de insulina como um índice da actividade pancreática no clássico teste de jejum de 72 horas, e como o único indicador de actividade pancreática onde a própria insulina fôr administrada para verificar a supressibilidade.[1,8] Além disso, a auto-administração dissimulada de insulina pode ser praticamente excluída como a causa de hiperinsulinemia pela descoberta de um nível elevado de Péptido-C.[2,3,8,9]

Os anticorpos anti-insulina circulantes são normalmente encontrados em doentes que se submeteram à terapia de insulina. Estes anticorpos poderiam tipicamente interferir com imunoensaios para insulina, impossibilitando o uso de medições de insulina neste contexto para verificar actividade residual de β-células, mesmo se o tratamento fosse suspenso temporariamente. Deste modo , as medições de Péptido-C têm sido utilizadas como uma alternativa neste contexto, para produzir informações sobre a história natural de diabetes dependentes de insulina, para monitorizar indirectamente a secreção de insulina na presença de anticorpos anti-insulina, e para auxiliar na determinação de um curso adequado de tratamento.[3,6,7,10]

O Péptido-C também é medido como meio adicional para avaliar a tolerância à glicose e testes de glicose-glibenclamide.[2,3,10]

Princípio do Procedimento

O IMMULITE/IMMULITE 1000 Péptido-C é um imunoensaio competitivo de fase sólida, de enzimas quimico-luminosas.

Ciclos de incubação: 1 × 60 minutos.

Colheita

Soro e plasma heparinizado:
O doente deve estar em jejum. Tirar sangue da veia,[12] evitando hemólise, em tubos simples (sem anticoagulante) ou tubos heparinizados, anotando a hora, e separando o soro ou plasma das células.

Plasma EDTA e plasma de fluoreto de sódio não são apropriados para uso.

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

Amostras hemolisadas podem indicar tratamento incorrecto de uma amostra antes do envio para o laboratório; portanto os resultados devem ser interpretados com cuidado.

Amostras ictéricas ou totalmente contaminadas podem causar resultados errados.

A centrifugação de amostras de soro antes da formação completa do coágulo pode resultar na presença de fibrina. Para prevenir resultados errados devido à presença de fibrina, certifique-se que a formação do coágulo foi completa antes da centrifugação das amostras. Algumas amostras, em especial as de doentes que recebem terapia anticoagulante podem requerer um maior tempo de formação do coágulo.

Os tubos para colheita sanguínea de diferentes fabricantes, podem originar diferentes valores, dependendo dos materiais e aditivos, incluíndo gel ou barreiras fisicas, activadores do coágulo e/ou anti coagulantes. IMMULITE/IMMULITE 1000 Péptido-C não foram ainda testados com todas as possiveis variações originadas pelos tipos de tubos. Consultar a secção Tipos de Amostras Alternativas para obter detalhes sobre os tubos que foram testados.

Estabilidade: Amostras de soro e plasma não doseadas dentro de 2–3 horas podem ser armazenadas *congeladas* a –20°C até 1 semana.[11]

Urina – Colheita e Armazenamento:
Colher a urina de 24 horas, sem conservante, mantendo a amostra refrigerada a 2–8°C durante a colheita. Para períodos mais longos, aliquotar e congelar: estável a –20°C durante 30

dias. Registe o volume total da colheita e conserve uma aliquota bem homogenizada para análise. Antes do ensaio, clarificar a amostra por centrifugação ou filtração.

Pré-diluição de Amostras de Urina: Todas as amostras de urina devem ser diluídas *pelo menos* na proporção de 1 para 4 com o Diluente de Amostra de Péptido-C antes do doseamento. (Amostras de urina *não* devem ser doseadas sem diluição prévia.) Uma diluição de 1 para 20 coloca as amostras normais de urina no valor de calibração do ensaio.

Volume de amostra:
50 µL de soro, plasma, ou urina (pré-diluída). (Cuvete de amostra deve conter um mínimo de 100 µL a mais que o volume total exigido.)

Precauções

Para uso de diagnóstico in vitro.

Reagentes: Manter a 2–8°C. Elimine de acordo com as normas aplicadas.

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

Substrato quimioluminescente: Evite contaminação e exposição à luz directa (ver bula).

Água: Utilize água destilada ou desionizada.

Materiais Fornecidos

Os componentes formam um conjunto uno e indivisível. Os códigos de barras no interior das caixas são necessários para o ensaio.

Unidades de Teste de Péptido-C (LPE1)
Cada unidade rotulada com código de barras contém uma pérola revestida com anti-peptído C policlonal de coelho. Estável até a data de validade a 2–8°C.
LKPE1: 100 unidades.
LKPE5: 500 unidades.

Deixe que as saquetas de Unidade de Teste fiquem à temperatura ambiente antes de as abrir. Abra cortando pela ranhura superior, mantendo o fecho intacto. Sele novamente as saquetas para proteger contra a humidade.

Embalagem de Reagente de Péptido-C (LPE2)
Com código de barras. 7,5 mL de fosfatase alcalina (de intestino de vitela) conjugada com Péptido-C tamponizado, com conservante. Armazene tapado e refrigerado: Estável até à data de validade a 2–8°C. Recomenda-se a utilização até 30 dias após aberto quando armazenado de acordo com as indicações.
LKPE1: 1 embalagem.
LKPE5: 5 embalagens.

Ajustes de Péptido-C (LPEL, LPEH)
Contém dois frascos (nível alto e baixo) de Péptido-C liofilizado em albumina humana tamponizada, com conservante. Reconstitua cada frasco com **4,0 mL** de água destilada ou desionizada. Deixe repousar durante 30 minutos. Misture por inversão ou movimentos lentos até o material liofilizado dissolver completamente. Após reconstituição, divida em alíquotas e congele. Estável por 6 meses a –20°C. Rejeite as alíquotas após uso.
LKPE1: 1 conjunto. **LKPE5:** 2 conjuntos.

Componentes do kit fornecidos separadamente

Diluente de amostra para Péptido-C (LPEZ)
Para a diluição manual de amostras de urina o amostras de soro o plasma elevadas. Um frasco que contenha 25 mL de albumina humana processada, sem Péptido-C e com conservante. Estável, após a abertura, durante 30 dias a 2–8°C, ou por 6 meses (aliquotado) a –20°C.

LSUBX: Substrato quimioluminescente
LPWS2: Solução de lavagem
LKPM: Kit de limpeza do pipetador

LCHx-y: Suportes de cuvetes de amostra (com código de barras)
LSCP: Cuvetes de amostra (descartáveis)
LSCC: Tampa de cuvetes de amostra (opcional)

PECM: Controlo de três níveis de Péptido-C

Também necessário:
Pipetas de transferência de amostra; água destilada ou desionizada; controlos.

Procedimento de doseamento

Têr em atenção que para obter um desempenho óptimo, é importante efectuar todos os procedimentos de manutenção de rotina conforme definido no Manual de Operador do IMMULITE ou IMMULITE 1000.

Ver o Manual do Operador do IMMULITE ou IMMULITE 1000 para: preparação, setup, diluições, ajustes, procedimento do ensaio e controlo de qualidade.

Confirme a presença da esfera em cada Unidade de Teste antes de a colocar no sistema.

Pré-diluição de Amostras de Urina: Todas as amostras de urina devem ser diluídas *pelo menos* a 1 para 4 com o Diluente de Amostra de Péptido-C antes do doseamento.

Intervalo entre ajustes aconselhável: 2 semanas.

Amostras de controlo de qualidade: utilize controlos ou "pools" com, pelo menos, dois níveis (alto e baixo) de Péptido-C.

Cálculo de Resultados

Os resultados para amostras de *urina*, tal como os obtidos pelo Analisador IMMULITE, devem ser corrigidos para diluição, multiplicando-se pelo factor de diluição. Os resultados são geralmente apresentados em microgramas de Péptido-C por 24 horas (µg/dia). Este valor pode ser obtido multiplicando-se o resultado em ng/ml (= µg/L) pelo volume total da colheita de 24 horas *em litros*.

Valores de Referência

Soro e plasma heparinizado
Baseado na concordância com o ensaio de Péptido-C da DPC IMMULITE 2000, observa-se que o procedimento de Péptido-C de IMMULITE apresente uma média de 2,1 ng/mL (695 pmol/L) e um valor de nonparametric da central 95% de:

1,1 – 5 ng/mL (364 – 1 655 pmol/L)

para indivíduos em jejum. O estudo do intervalo de referência foi realizado em amostras de soro de 71 voluntários de laboratório em jejum.

Urina
Baseado na concordância com o ensaio de Péptido-C DA da DPC, observa-se que o procedimento de Péptido-C de IMMULITE apresente uma média de SD (desvio padrão) de 79 ± 56 µg/dia, com um intervalo de 2 a 260 µg/dia, representando o centro de 95% das observações.

Estes valores devem ser considerados apenas como directrizes. Cada laboratório deve estabelecer os seus próprios valores.

Limitações

Como o metabolismo do Péptido-C difere do da insulina, os níveis de Peptido C são, no melhor dos casos, um índice semi-quantitativo da secreção de insulina. A semi vida do Péptido-C em plasma tem sido estimado em aproximadamente 30 minutos, comparado com aproximadamente 5 minutos para a insulina. Devido à diferença de tempo de semi vida, o Péptido-C circula no plasma a um nível aproximado 5 vezes superior ao da insulina, mesmo que as duas moléculas sejam segregadas numa proporção equimolar. Uma vez mais se insiste que o fígado tem um papel importante na eliminação de insulina, enquanto o Péptido-C é removido por degradação e eliminação, principalmente através dos rins. Complicações hepáticas e renais irão, portanto, afectar a proporção de circulação de insulina/ Péptido-C.

Os anticorpos heterófilicos no soro humano podem reagir com as imunoglobulinas presentes no ensaio, causando interferência com os imunoensaios in vitro. [Ver Boscato LM, Stuart MC. Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays. Clin Chem 1988:34:27-33.] Amostras de doentes expostas em rotina a produtos ou soros

de animais podem demonstrar este tipo de interferência, potencial causador de resultados anómalos. Estes reagentes foram formulados para minimizar o risco de interferência, contudo podem ocorrer potenciais interacções entre soros (raros) e componentes do teste. Para fins de diagnóstico, os resultados obtidos neste ensaio devem ser sempre analisados em combinação com o exame clínico, história de medicação do doente e outros achados que possam correlacionar.

Características do Ensaio

Ver tabelas e gráficos para dados representativos do desempenho do doseamento. Os resultados são apresentados em ng/mL. (Salvo referência em contrário, todos os dados provêm de amostras de soro colhidas em tubos sem anticoagulantes, barreiras de gel ou aditivos promotores de coagulação para o Peptido)

Factor de conversão:
ng/mL × 331 → pmol/L

Calibração: 0,5 – 7 ng/mL
(166 – 2 317 pmol/L) ,
(WHO 1st IRP 84/510)

Sensibilidade Analítica: 0,3 ng/mL
(99 pmol/L para amostras de soro e plasma)

Precisão: Amostras foram repetidamente ensaiadas em quadriplicado no decurso de vários dias, num total de 20 séries e 80 réplicas. (Vêr a tabela "Precision".)

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

Recuperação: As amostras foram adicionadas na relação de 1 para 19 com dois soluções (18 e 72 ng/mL) antes do doseamento. (Ver tabela de "Recovery" para dados representativos.)

Especificidade: O doseamento é específico para Péptido-C. (Ver tabela de "Specificity".)

Bilirrubina: Interfere com a avaliação a níveis de 100 mg/L e 200 mg/L, causando aumento dos valores. (Ver tabela de "Bilirubin".)

Hemolise: A presença de eritrocitos em concentrações até 30 µL/mL não tem efeito no resultado, dentro da precisão do ensaio.

Tipo de amostras alternativas: Nenhum efeito significativo para o plasma heparinizado, tubos de vacum SST® da Becton Dickinson. Plasma EDTA ou plasma de fluoreto de sódio não são apropriados para uso. Regressão linear:

(Heparina) = 1,03 (Soro) – 0,04 ng/mL
r = 0,99

(SST) = 1,16 (Tubos Simples) + 0,81 ng/mL
r = 0,98

Médias:
4,4 ng/mL (Soro)
4,5 ng/mL (Heparina)
5,9 ng/ml (Tubos SST)

Comparação de Métodos – Soro: O doseamento do comparado ao Péptido-C IMMULITE 2000 da DPC em 66 amostras de soro. (Valores de concentração: approx. 0,5 – 6,5 ng/mL. Ver gráfico.) Regressão linear:

(IML) = 1,01 (IML 2000) – 0,1 ng/mL
r = 0,990

Médias:
2,8 ng/mL (IMMULITE)
2,8 ng/mL (IMMULITE 2000)

Comparação de Métodos – Urina: O doseamento foi comparado ao Péptido-C Anticorpo Duplo de DPC em 24 amostras de urina. (Valores de concentração: Até approx 6,7 ng/mL. Ver gráfico.) Regressão linear:

(IML) = 0,89 (DA) – 0,01 ng/mL
r = 0,983

Médias:
2,51 ng/mL (IMMULITE)
2,81 ng/mL (Anticorpo Duplo)

Assistência Técnica:

Por favor contacte o seu Distribuidor Nacional.

Fabricado pela EURO/DPC Ltd. de acordo com o Sistema de Qualidade registado segundo a norma ISO 13485:2003.

EURO/DPC LTD
Glyn Rhonwy
Llanberis, Gwynedd LL55 4EL
United Kingdom

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

2005-04-29

PILKPE – 10

CE

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