

Arbeitsanleitung/Manual

# Intaktes Proinsulin ELISA

*Zur in vitro Bestimmung von intaktem Proinsulin in humanem Serum und Plasma*

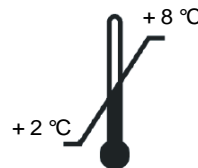
# Intact Proinsulin ELISA

*For the in vitro determination of intact Proinsulin in human serum and plasma*

Gültig ab / Valid from 01.03.2011



K 7821



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, D 64625 Bensheim  
Tel.: ++49 6251 70190-0  
Fax: ++ 49 6251 849430  
e.mail: [Info@immundiagnostik.com](mailto:Info@immundiagnostik.com)  
[www.immundiagnostik.com](http://www.immundiagnostik.com)

## Inhalt / Content

1. Deutsch
2. English

Weitere Informationen zu unseren Produkten finden Sie auf unserer  
Homepage

Additional information about our products is available on our homepage

[www.immundiagnostik.com](http://www.immundiagnostik.com)

## 1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Proinsulin-Assay ist ein immunometrischer Assay zur quantitativen Bestimmung von intaktem Proinsulin in humanen Serum- und Plasmaprobe. Die Bestimmung von Proinsulin wird bei der Diagnose und Behandlung von Patienten mit Typ-2-Diabetes angewendet. Nur zur *in vitro* Diagnostik.

## 2. EINLEITUNG

Proinsulin ist eine Vorstufe von Insulin, die von den  $\beta$ -Zellen des Pankreas synthetisiert wird. Unter normalen Umständen werden während der Bildung sekretorischer Granula praktisch alle Proinsulinmoleküle zur Erzeugung von Insulin an den Aminosäureresten 32-33 und 65-66 gespalten. Eine geringe Menge nicht modifiziertes Proinsulin gelangt in den Blutkreislauf; man nimmt jedoch an, dass es keine oder nur geringe biologische Aktivität besitzt. Erhöhte Konzentrationen von Proinsulin im Kreislauf können bei Insulinresistenz-Syndromen wie Typ-2-Diabetes und bei Patienten mit Insulinom auftreten. In solchen Situationen kann der Proinsulin-Assay in Verbindung mit einem hochspezifischen Insulin-Assay nützliche Informationen über die Veränderungen in der Insulinprozessierung liefern.

### Indikationen

- Diabetes Typ I und II
- Insulinomen, funktionaler Hypoglykämie und Hyperinsulinämie
- Nierenfunktionsstörungen, Zirrhosen und Hyperthyreose
- Erkrankung der Herzkranzgefäße

### 3. INHALT DER TESTPACKUNG

Artikel Nr.	Inhalt	Kit Komponenten	Menge
K 7821MTP	PLATE	Mikrotiterplatte, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 7821WP	WASHBUF	ELISA Waschpufferkonzentrat 10x	1 x 100 ml
K 7821AK	AB	Biotin markierter Proinsulin Antikörper	1 x 12 ml
K 7821PV	SAMPLEBUF	Probenpuffer, gebrauchsfertig	1 x 12 ml
K 7821K	CONJ	HRP-Konjugat, gebrauchsfertig	1 x 12 ml
K 7821ST	STD	Standards, je 1ml, lyophilisiert	5 vials
K 7821KO	CTRLA	Kontrolle A, 1ml, lyophilisiert	1 vial
K 7821KO	CTRLB	Kontrolle B, 1ml, lyophilisiert	1 vial
K 7821TMB	SUB	TMB Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 7821AC	STOP	ELISA Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 15 ml

Die bei dem Test verwendeten Standards wurden am WHO-Referenzpräparat IRR 84/611 kalibriert.

### 4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Deionisiertes Wasser
- Präzisionspipetten und Einmalpipettenspitzen mit variablen Volumina von 10 - 1000 µl
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Mikrotiterplattenschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Vortex-Mixer
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Mikrotiterplattenphotometer mit Filter 450 nm und 405 nm (Referenzfilter 620 oder 690 nm)

## 5. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Bei Lagerung bei 2–8°C behalten ungeöffnete Reagenzien ihre Haltbarkeit bis zum Verfallsdatum. Reagenzien nicht nach Ablauf des Verfallsdatums verwenden. Geöffnete Reagenzien müssen bei 2–8°C gelagert werden. Mikrotiterplatten müssen bei 2–8°C gelagert werden. Der angebrochene Folienbeutel sollte nach Entnahme einer Platte immer wieder dicht verschlossen werden. Rekonstituierte bzw. verdünnte Reagenzien sind bei Lagerung bei 2–8°C zwei Wochen haltbar.
- Das **WASHBUF** (Waschpufferkonzentrat) muss vor Gebrauch **1:10** in bidestilliertem Wasser (aqua bidest.) verdünnt werden (100 ml WASHBUF + 900 ml aqua bidest.), gut mischen. Aufgrund der hohen Salzkonzentration in den Stammlösungen kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich im Wasserbad bei 37 °C auf. Das **Pufferkonzentrat** kann bei **2-8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Die **verdünnte Pufferlösung** ist bei **2-8 °C einen Monat** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- Die **STD** (Standards) und **CTRL** (Kontrolle A oder B) müssen vor Gebrauch mit 1 ml destilliertem Wasser rekonstituiert werden. Die rekonstituierten Standards und Kontrollen 5 Minuten stehen lassen, dann sanft mischen, um zu gewährleisten, dass sich alle Feststoffe lösen. Nach dem Rekonstituieren sind sie bei 2-8°C zu lagern und bis zu 1 Monat stabil. Die nicht rekonstituierten Standards und Kontrollen können bei 2-8°C bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden.
- Alle anderen Testreagenzien sind bei **2-8 °C** zu lagern und bei entsprechender Lagerung bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

## 6. PROBENVORBEREITUNG

### *Probenverdünnung*

Es ist keine Vorverdünnung der Proben notwendig.

### **Probenmatrices**

Für diesen Assay kann Serum, Heparin- oder EDTA-Plasma verwendet werden. Keine stark hämolysierten Proben verwenden.

### Probenentnahme Plasma

Vollblut sollte in ein Röhrchen aufgenommen werden, das EDTA oder Heparin als Antikoagulans enthält, maximal 20 Minuten stehen gelassen werden und dann mindestens 15 Minuten bei 2000 bis 3000 rpm zentrifugiert werden. Der klare, zellfreie Überstand sollte dann sofort abgenommen und verwendet werden.

### Probenentnahme Serum

Serum sollte in ein Serumröhrchen ohne Antikoagulans aufgenommen, maximal 20 Minuten stehen gelassen werden und dann mindestens 15 Minuten bei 2000 bis 3000 rpm zentrifugiert werden. Der klare, zellfreie Überstand sollte dann sofort abgenommen und verwendet werden.

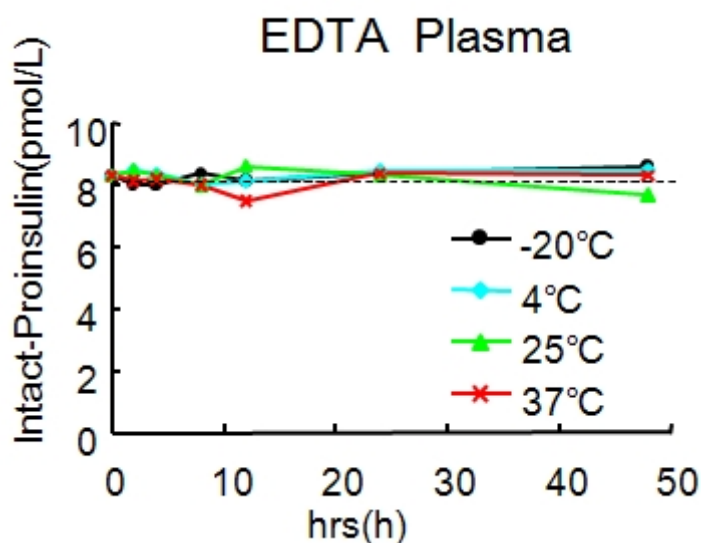
### Probenlagerung

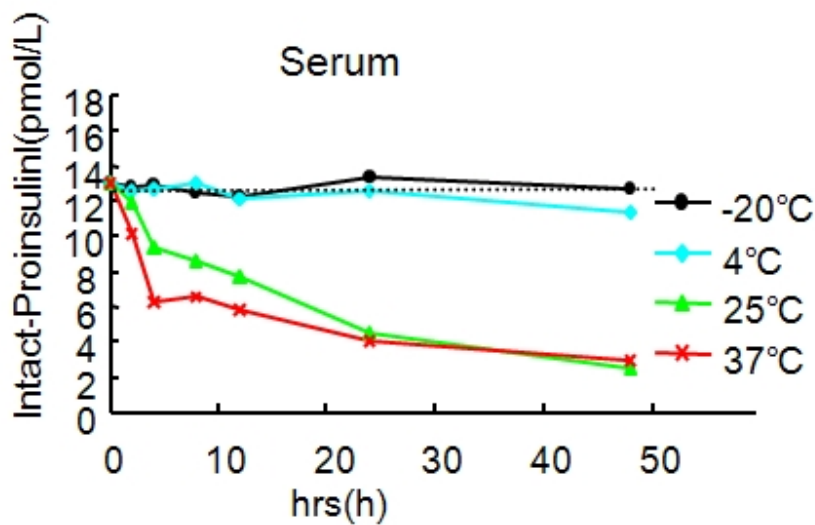
Proben sollten nach Abnahme verschlossen werden und können vor dem Test bis zu 24 Stunden bei 2–8°C gelagert werden. Zur längeren Lagerung vor dem Test können Proben einmal bei -20°C eingefroren werden. Aufgetaute Proben sollten vor dem Test zum Durchmischen mehrere Male umgedreht werden.

Wir empfehlen alle Proben in Doppelbestimmungen zu analysieren.

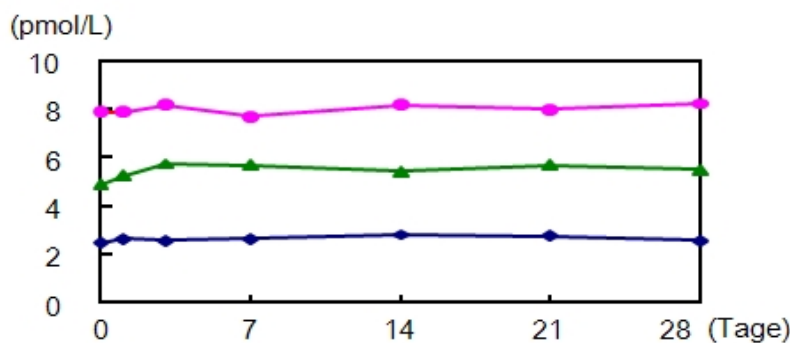
### Probenstabilität

Generell sollte frisch abgenommenes Plasma oder Serum verwendet werden. Zur Lagerung sollten die Proben maximal 24 Stunden bei 2-8°C gelagert werden. Für eine längere Lagerung müssen die Proben bei -20°C gelagert werden.





### Langzeitstabilität bei -20°C



## 7. TESTDURCHFÜHRUNG

### Testprinzip

Der Proinsulin-Assay ist ein Sandwich ELISA, bei dem ein spezifischer Festphasenantikörper eingesetzt wird, der auf dem Boden einer Mikrotiterplatte immobilisiert ist, sowie ein löslicher Antikörper, der mit Biotin markiert ist. Die Probe wird zusammen mit einem Puffer in den Vertiefungen der Mikrotiterplatte inkubiert. Nach einem Waschschrift wird die Lösung mit dem markierten Antikörper zugegeben. Nach dem zweiten Inkubationsschritt und einem weiteren Waschschrift wird ein Peroxidase-markierter Antikörper hinzugegeben. Es folgt eine dritte Inkubation und ein letzter Waschschrift. Anschließend wird die Substratlösung zugegeben und die Farbentwicklung nach einer definierten Zeit gestoppt. Die Extinktion wird bei 450 nm mit einem Mikrotiterplattenlesegerät gemessen. Die Intensität der gebildeten Farbe ist proportional der Proinsulin-Konzentration in der Probe.

## Pipettierschema

1. Im Test dürfen nur <b>Reagenzien und Proben</b> verwendet werden, die <b>Raumtemperatur</b> (18-26°C) aufweisen. Vor Gebrauch Reagenzien und Proben gut mischen
2. Die <b>Positionen für STD</b> (Standard), <b>SAMPLE</b> (Probe) und <b>CTRL</b> (Kontrolle) im Protokollblatt markieren
3. Die <b>benötigten Mikrotiterstreifen</b> aus dem Kit nehmen. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen können abgeklebt bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum bei 2-8 °C gelagert werden
4. <b>50 µl SAMPLEBUF</b> (Probenpuffer) in die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen pipettieren
5. <b>50 µl STD</b> (Standard) <b>SAMPLE</b> (Probe) <b>CTRL</b> (Kontrolle) in Doppelbestimmung in die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen pipettieren
6. Streifen abkleben und <b>2 Stunden bei Raumtemperatur (18-26°C)</b> inkubieren
7. Inhalt der Vertiefungen verwerfen und Flüssigkeitsreste durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen dann mit <b>300 µl verdünntem Waschpuffer</b> befüllen und wieder die Flüssigkeitsreste durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen. Diesen Vorgang weitere <b>2 x wiederholen</b> und nach jedem Waschschrift die Flüssigkeitsreste durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen
8. <b>100 µl AB</b> (Biotin-Antikörper) in alle Vertiefungen pipettieren
9. Streifen abkleben und <b>1 Stunde bei Raumtemperatur (18-26°C)</b> inkubieren
10. Inhalt der Vertiefungen verwerfen und Flüssigkeitsreste durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen dann mit <b>300 µl verdünntem Waschpuffer</b> befüllen und wieder die Flüssigkeitsreste durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen. Diesen Vorgang weitere <b>2 x wiederholen</b> und nach jedem Waschschrift die Flüssigkeitsreste durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen
11. <b>100 µl CONJ</b> (Konjugat) in alle Vertiefungen pipettieren



12. Streifen abdecken und <b>30 Minuten bei Raumtemperatur</b> (18-26°C) inkubieren
13. Inhalt der Vertiefungen verwerfen und Flüssigkeitsreste durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen dann mit <b>300 µl verdünntem Waschpuffer</b> befüllen und wieder die Flüssigkeitsreste durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen. Diesen Vorgang weitere <b>2 x wiederholen</b> und nach jedem Waschschrift die Flüssigkeitsreste durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen
14. <b>100 µl SUB</b> (Substrat) in alle Vertiefungen pipettieren
15. <b>30 Minuten bei Raumtemperatur</b> (18-26°C) im Dunkeln inkubieren
16. <b>100 µl STOP</b> (Stopplösung) in alle Vertiefungen pipettieren
17. <b>Extinktion</b> sofort im Mikrotiterplattenphotometer bei <b>450 nm</b> gegen die Referenzwellenlänge 620 nm (oder 690 nm). Ist keine Referenzwellenlänge vorhanden, wird nur bei 450 nm gemessen.

## 8. ERGEBNISSE

Wir empfehlen die „**kubische Spline Funktion**“ zur Auswertung der Ergebnisse.

Vor jeder automatischen Auswertung sollte stets eine Kontrolle der Doppelwerte auf Plausibilität („Ausreißerkontrolle“) durchgeführt werden; falls dies nicht durch das verwendete Programm erfolgt, sollte die Kontrolle manuell durchgeführt werden.

Alternativ können folgende Algorithmen verwendet werden.

### 1. 4-Parameter-Funktion

Für die optische Dichte empfehlen wir eine lineare Ordinate und für die Konzentration eine logarithmische Abszisse (bei einer logarithmischen Abszisse muss für den Standard mit der Konzentration 0 ein Wert kleiner 1 eingegeben werden z. B. 0.01).

### 2. Punkt-zu-Punkt-Auswertung

Für die optische Dichte und für die Konzentration empfehlen wir eine lineare Ordinate bzw. Abszisse.

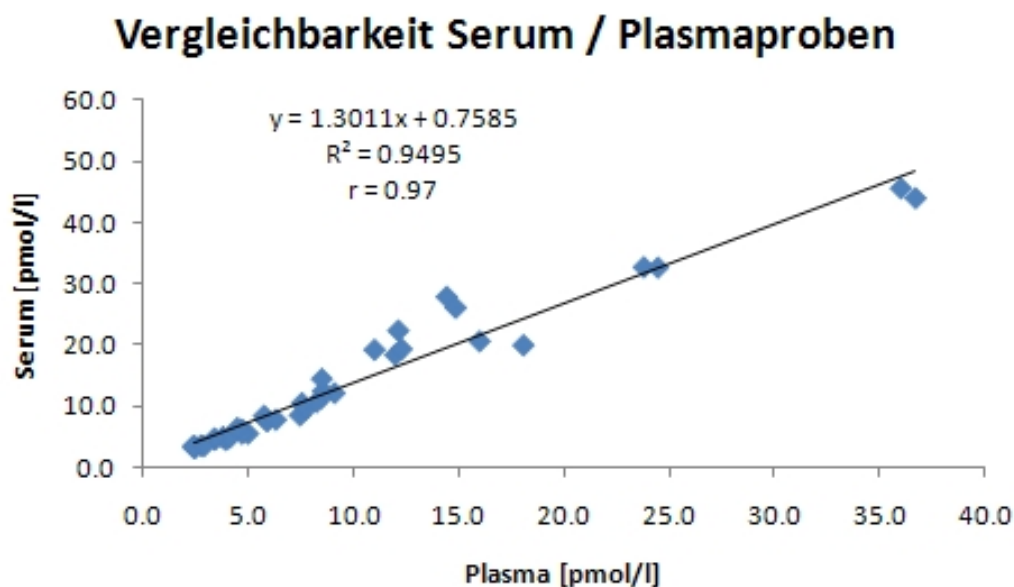
## Vergleichbarkeit von Serum und Plasmaproben

In der Regel wird empfohlen die Bestimmung des intakten Proinsulins in Plasmaproben durchzuführen, da die Stabilität des Parameters in dieser Matrix besser ist als in Serumproben. Eine Messung in Serumproben ist jedoch möglich.

Der Vergleich von Serum und Plasmaproben (n = 40) liefert folgende Regressionsgleichung:

$$Y \text{ (Plasma-Konzentration)} = 1.3 * (\text{Serum}) + 0.76$$

Daher sind Bestimmungen von Serumproben stets anhand dieser Regressionsgleichung zu verrechnen um eine Vergleichbarkeit mit den Literaturangaben gewährleisten zu können (siehe Punkt 9. „Erwartete Ergebnisse“).



## 9. QUALITÄTSKONTROLLE

Immundiagnostik AG empfiehlt den Einsatz von kommerziell erhältlichen Kontrollen (wenn vorhanden) für die interne Qualitätskontrolle.

Wir empfehlen die Kontrollen bei jedem Testansatz mitzumessen. Die Ergebnisse der Kontrollen müssen auf Richtigkeit überprüft werden. Liegen einer oder mehrere Werte außerhalb des angegebenen Bereiches, kann Immundiagnostik AG die Richtigkeit der Werte nicht gewährleisten.

## *Erwartete Ergebnisse*

Es wird dringend empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen Referenzwerte für den normalen und den pathologischen Bereich bestimmt. Mit dem Proinsulin-Assay sind Studien mit erwachsenen Männern und Frauen durchgeführt worden, bei denen zuvor Typ-2-Diabetes diagnostiziert worden war und die mit oralen Antidiabetes-Medikamenten behandelt wurden (1–3). An 149 Standorten, die an der IRIS-II-Studie teilnahmen, wurden Proben von Patienten mit Typ-2-Diabetes unter oraler Medikation oder Diättherapie gesammelt. Insgesamt nahmen an dieser Studie 2146 männliche und 2124 weibliche Patienten mit Typ-2-Diabetes ohne laufende Insulintherapie teil. In einer weiteren Studie wurden zur Bestimmung von intaktem Proinsulin und Adiponectin bei unterschiedlich stark ausgeprägter Insulinresistenz 10 Gruppen von je 50 Patienten mit jeweils zunehmenden HOMA-Werten (HOMA, homeostasis model assessment): Bewertung nach dem Homöostase-Modell) zufällig aus einer Kohorte von 4265 Personen ausgewählt. Eine weitere Studie bewertete 48 Patienten mit Typ-2-Diabetes und laufender oraler Antidiabetes-Therapie. 20 Frauen und 28 Männer im Alter von 60 ( $\pm$  9) Jahren wurden mittels eines intravenösen Glukosetoleranztests untersucht. Es wurde eine Bestimmung der Nüchternwerte von intaktem Proinsulin, Insulin, Resistin, Adiponectin und Glukose durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Studien zeigten, dass ein Nüchternwert für Proinsulin von  $> 10$  pmol/l bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 das Vorliegen einer Insulinresistenz mit sehr hoher Spezifität und Sensitivität anzeigt. Die Nüchternwerte für Proinsulin in gesunden Probanden lagen unterhalb von 10 pmol/l.

Um die Spezifität des Nachweises zu erhöhen und aufgrund neuerer Studien muss jedoch davon ausgegangen werden, dass ein Nüchternwert unterhalb von 11 pmol/L als normal betrachtet werden kann.

In der Regel sollten bei Patienten mit Typ 2 Diabetes bei Werten im oberen Normbereich (7-11 pmol/L) die Messungen nach 3-6 Monaten wiederholt werden.

Bei Typ 2 Diabetes Patienten mit Werten  $> 11$  pmol/L liegt mit hoher Wahrscheinlichkeit eine Insulinresistenz mit Sekretionsstörung vor.

Bei Patienten ohne Diabetes mellitus und einem Wert  $> 11$  pmol/L wird die Abklärung eines Diabetes mellitus oder Insulinoms empfohlen sowie die Erhebung eines kardiovaskulären Risikostatus.

(Siehe auch verschiedene Labordienstleister z.B. [www.labor-limbach.de](http://www.labor-limbach.de), [www.bioscientia.de](http://www.bioscientia.de), [www.labor28.de](http://www.labor28.de))

## Anwendungsbeschränkungen

- Die mit diesem Assay erhaltenen Werte sind nur zur Unterstützung bei der Diagnosestellung vorgesehen.
- Wie bei allen serologischen Tests muss die Interpretation der mit diesem Test erhaltenen Ergebnisse im Zusammenhang mit den klinischen Symptomen des Patienten, der Anamnese und weiteren klinischen und/oder Laborergebnissen betrachtet werden.
- Optimale Ergebnisse können nur bei strikter Befolgung der Testanleitung erzielt werden.
- Es ist frisches Plasma zu verwenden oder Proben, die nicht mehr als zweimal eingefroren und aufgetaut wurden. Proben, die unsachgemäß gelagert wurden, oder mehrfach eingefroren und aufgetaut wurden, können zur Verfälschung der Ergebnisse führen.
- Reproduzierbare Ergebnisse erfordern sorgfältiges Pipettieren, die Einhaltung der Inkubationszeiten und -temperaturen sowie das gründliche Mischen aller angesetzten Lösungen.
- Während des Waschvorganges ist darauf zu achten, dass alle Vertiefungen gleichmäßig mit Waschpuffer gefüllt sind und keine Rückstände in den Vertiefungen zurückbleiben.

## Substanzen, die das Ergebnis beeinträchtigen können

Interferenzen wurden gemäß den Empfehlungen des CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) untersucht (CLSI EP7-A2). Um den Effekt von Lipämie zu untersuchen, wurden Test-Pools vorbereitet, in denen Plasmaproben mit einer handelsüblichen Lipidemulsion (Intralipid Sigma) versetzt wurden. Testproben zur Untersuchung des Effekts von Hämolyse wurden durch osmotischen Schock hergestellt. Um ikterische Proben zu erhalten, wurden Plasmaproben mit handelsüblichem Bilirubin (Sigma) versetzt.

Bei einem Lipämie-Index von bis zu 975 wurde keine Interferenz durch Lipämie beobachtet. Eine Interferenz durch Hämolyse war nicht nachweisbar bis zu einem Hämolyse-Index von 467. Bilirubin bewirkte keine nachweisbare Interferenz bis zu einem Ikterus-Index von 1065.

## 10. TESTCHARAKTERISTIKA

### Präzision und Reproduzierbarkeit

#### Intra-Assay-Präzision

Drei verschiedene Plasma-Pools wurden in 5 getrennten Assays jeweils in Duplikaten getestet und lieferten folgende Ergebnisse:

Intaktes Proinsulin (pmol/l)	CV%	n
3.38	2.61	5
27.6	4.47	5
57.2	3.57	5

#### Wiederfindungsrate

Fünf Plasmaproben mit einem niedrigen Gehalt an endogenem intaktem Proinsulin wurden mit rekombinantem Proinsulin in 3 Konzentrationen versetzt. Die Wiederfindungsrate für Proben im Bereich von 9 bis 22 pmol/l ist jeweils als Prozentanteil des erwarteten Ergebnis gezeigt.

Sample	1	2	3	4	5
Spike 5%	102.4	107.5	100.4	98.8	97.6
Spike 10%	105.1	107.1	102.8	101.9	96.1
Spike 15%	104.4	107.5	102.1	101.3	100.4

Die mittlere Wiederfindungsrate betrug 102,4%.

#### Linearität

Vier Patientenproben mit einem erhöhten Gehalt an Proinsulin wurden mit Probenpuffer verdünnt. Die folgende Tabelle zeigt die in den unverdünnten und den verdünnten Proben jeweils gemessenen Konzentrationen für intaktes Proinsulin.

Intaktes Proinsulin (pmol/l)				
Dilution Factor	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4
0	46.1	46.7	22.8	48.6
1:2	24.1	26.6	12.6	27.5
1:4	11.0	12.7	6.3	12.4
1:8	5.4	5.3	3.3	6.0

### *Sensitivität*

Die Sensitivität wurde auf zwei Standardabweichungen vom Mittelwert von 20 Replikaten eines Nullwert-Standards geschätzt. Diese Berechnung ergibt für die analytische Sensitivität des Proinsulin-Assays einen Wert von 0,02 pmol/l. Die Dynamik des Assays liegt im Bereich von 0,02–100 pmol/l.

### *Hook-Effekt*

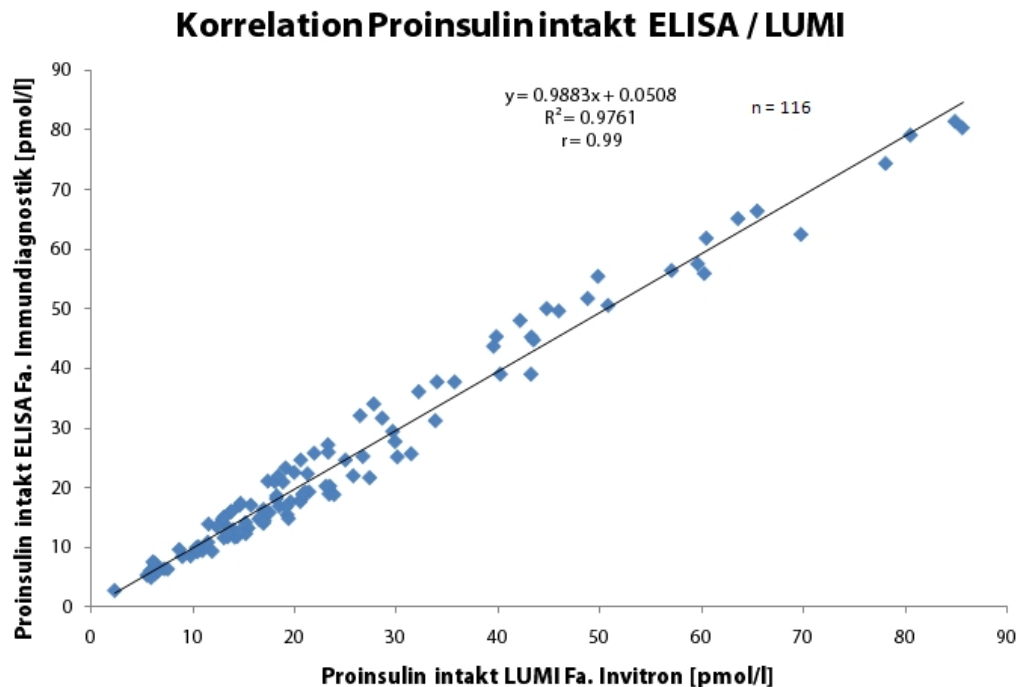
Aufgrund des Testaufbaus, bei dem die Inkubationen mit Festphasenantikörper und markiertem Antikörper getrennt ablaufen, tritt kein Hook-Effekt auf.

### *Kreuzreaktivität*

Die Kreuzreaktivität gegenüber verwandten Proteinen wurde bei einer Proteinkonzentration von jeweils 100 pmol/l untersucht. Das Ergebnis ist als Prozentanteil der Reaktivität einer Probe mit einer identischen Konzentration von intaktem Proinsulin angegeben.

Peptid	CR [%]
Intaktes Proinsulin	100
Insulin	0.0
32-33 split Proinsulin	5.6
Des 31-32 split Proinsulin	1.4
65-66 split Proinsulin	37
Des 65-66 split Proinsulin	63
C-Peptid	0.0

## Vergleich mit dem Goldstandard Chemolumineszenz



## 11. VORSICHTSMAßNAHMEN

- Nur zur *in vitro* Diagnostik.
- Qualitätskontrollen sollten immer mit gemessen werden.
- Das für Kitkomponenten verwendete humane Material wurde auf HIV, Hepatitis B und Hepatitis C getestet und für negativ befundet. Dennoch wird empfohlen, die Kitkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material zu behandeln.
- Die Kitkomponenten enthalten Natriumazid oder Thimerosal zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen. Natriumazid bzw. Thimerosal sind giftig. Auch Substrate für enzymatische Farbreaktionen sind giftig und karzinogen. Jeder Kontakt mit Haut oder Schleimhaut ist zu vermeiden.
- Die Stopplösung besteht aus verdünnter Schwefelsäure ( $H_2SO_4$ ).  $H_2SO_4$  ist eine starke Säure und muss auch in verdünnter Form mit Vorsicht verwendet werden.  $H_2SO_4$  verursacht bei Kontakt mit der Haut Verätzungen. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen, Schutzkleidung und Schutzbrille gearbeitet werden. Bei Kontakt mit der Schwefelsäure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden.

## 12. TECHNISCHE MERKMALE

- Reagenzien der Kitpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Substratlösung muss vor Gebrauch farblos sein.
- Mikrotiterstreifen müssen während den Inkubationen mit Folie abgedeckt sein.
- Schaumbildung beim Mischen der Reagenzien sollte vermieden werden.
- Die Bestimmung ist immer nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.

## 13. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur *in vitro* Diagnostik verwendet werden.
- Für die Qualitätskontrolle sind die für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- Die Testcharakteristika wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettiervolumina der verschiedenen Komponenten wurden vom Hersteller festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immundiagnostik AG übernimmt für die hierdurch entstandenen Schäden und Folgeschäden keine Haftung.
- Bei Gewährleistungsansprüchen ist das beanstandete Material mit schriftlicher Erklärung innerhalb von 14 Tagen zum Hersteller, der Immundiagnostik AG, zurück zu senden.

## 14. LITERATUR

Pfützner A, Kunt T, Hohberg C, Mondok A, Pahler S, Konrad T, Lübben G, Forst T (2004) Fasting intact proinsulin is a highly specific predictor of insulin resistance in type 2 diabetes. *Diabetes Care* **27**:682-687

Langenfeld MR, et al. (2004) IRIS II Study: Sensitivity and specificity of intact proinsulin, adiponectin and the proinsulin/adiponectin ratio as markers for insulin resistance. *Diabetes Technology & Therapeutics*. **6**:836-843

Pfützner A, et al. (2005) IRIS II Study: Intact proinsulin is confirmed as a highly specific indicator for insulin resistance in a large cross-sectional study design. *Diabetes Technology & Therapeutics*. **7**:478-486



**Verwendete Symbole:**



Temperaturbegrenzung



Bestellnummer



In-Vitro-Diagnostikum



Inhalt ausreichend für <n>  
Prüfungen



Hersteller



Verwendbar bis



Chargenbezeichnung

# Intact Proinsulin ELISA

*For the in vitro determination of intact Proinsulin in serum and plasma*

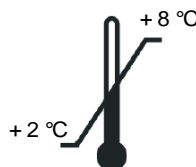
Gültig ab / Valid from 01.03.2011



K 7821



96



## 1. INTENDED USE

The Intact Proinsulin Assay is an immunometric assay for the quantitative measurement of intact proinsulin in human serum and plasma samples. Measurements of proinsulin are used in the diagnosis and treatment of patients with type 2 diabetes. For *in vitro* diagnostic use only.

## 2. INTRODUCTION

Proinsulin is a precursor molecule for insulin and is synthesized by the pancreatic  $\beta$ -cells. Under normal circumstances, virtually all proinsulin is cleaved at residues 32-33 and 65-66 to produce insulin during the formation of secretory granules. Some unmodified proinsulin is released into the circulation, though it is believed to have little or no biological activity. Increased concentrations of circulating proinsulin may occur in insulin-resistant syndromes such as type 2 diabetes and in patients with insulinoma. When used in conjunction with a highly specific insulin assay, it may provide useful information on changes in the processing of insulin in such situations.

### Indications

- Diabetes type I and II
- Insulinomas, functional hypoglycaemia, hyperinsulinemia
- Kidney dysfunction, cirrhosis and hyperthyreosis
- Cardiovascular diseases

### 3. MATERIAL SUPPLIED

Cat Nr.	Label	Kit components	quantity
K 7821MTP	PLATE	Microtiter plate, coated	12 x 8 wells
K 7821WP	WASHBUF	ELISA Wash buffer concentrate 10x	1 x 100 ml
K 7821AK	AB	Biotin conjugated Proinsulin Antibody	1 x 12 ml
K 7821PV	SAMPLEBUF	Sample buffer, ready to use	1 x 12 ml
K 7821K	CONJ	HRP-conjugate, ready to use	1 x 12 ml
K 7821ST	STD	Standards, each 1ml, lyophilized	5 vials
K 7821KO	CTRLA	Control A, 1ml, lyophilized	1 vial
K 7821KO	CTRLB	Control B, 1ml, lyophilized	1 vial
K 7821TMB	SUB	TMB Substrate (Tetramethylbenzidin), ready to use	1 x 15 ml
K 7821AC	STOP	ELISA Stop solution, ready to use	1 x 15 ml

The used standards have been calibrated on the WHO reference material IRR 84/611.

### 4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Bidistilled water (aqua bidest.)
- Precision pipettors and disposable tips to deliver 10-1000 µl
- Foil to cover the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker
- A multi-channel dispenser or repeating dispenser
- Vortex-Mixer
- Standard laboratory glass or plastic vials, cups, etc.
- Microtiter plate reader at 450 nm and 405nm (reference wave length 620 or 690 nm)

## 5. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

- To run assay more than once, ensure that reagents are stored at conditions stated on the label.
- The **WASHBUF** (wash buffer concentrate) should be diluted with aqua bidest. **1:10** before use (100 ml WASHBUF + 900 ml aqua bidest.), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the stock solutions. The crystals must be redissolved at 37°C using a water bath before dilution. The **buffer concentrate is stable at 2-8°C** until the expiry date stated on the label. **Diluted buffer solution** can be stored in a closed flask at **2-8°C for one month**.
- The **STD** (standards) and the **CTRL** (control A or B) must be reconstituted with 1 ml aqua bidest. before use. Allow these to stand for 5 minutes, then mix gently to ensure all solids are dissolved. Stability of the reconstituted Standards is four (4) weeks when stored at 2-8°C. The lyophilized STD and CTRL are stable at 2-8°C until the expiry date stated on the label.
- All other test reagents are ready to use. The test reagents are stable until the expiry date stated on the label when stored at **2-8°C**.

## 6. SAMPLE PREPARATION

### *Dilution of samples*

No sample dilution is necessary.

### **Sample matrices**

Serum, Heparin- or EDTA-Plasma can be used in this assay. Do not use severely hemolyzed specimens.

### **Plasma Collection**

Whole blood should be collected into a tube containing EDTA or heparin as anticoagulant, allowed to stand for maximal 20 min and then centrifuged for at least 15 min at 2000 to 3000 rpm. The clear cell-free supernatant should be immediately collected and used in the assay.

### **Serum Collection**

Serum should be collected into a tube without any anticoagulant, allowed to stand for maximal 20 min and then centrifuged for at least 15 min at 2000 to 3000 rpm. The clear cell-free supernatant should be immediately collected and used in the assay.

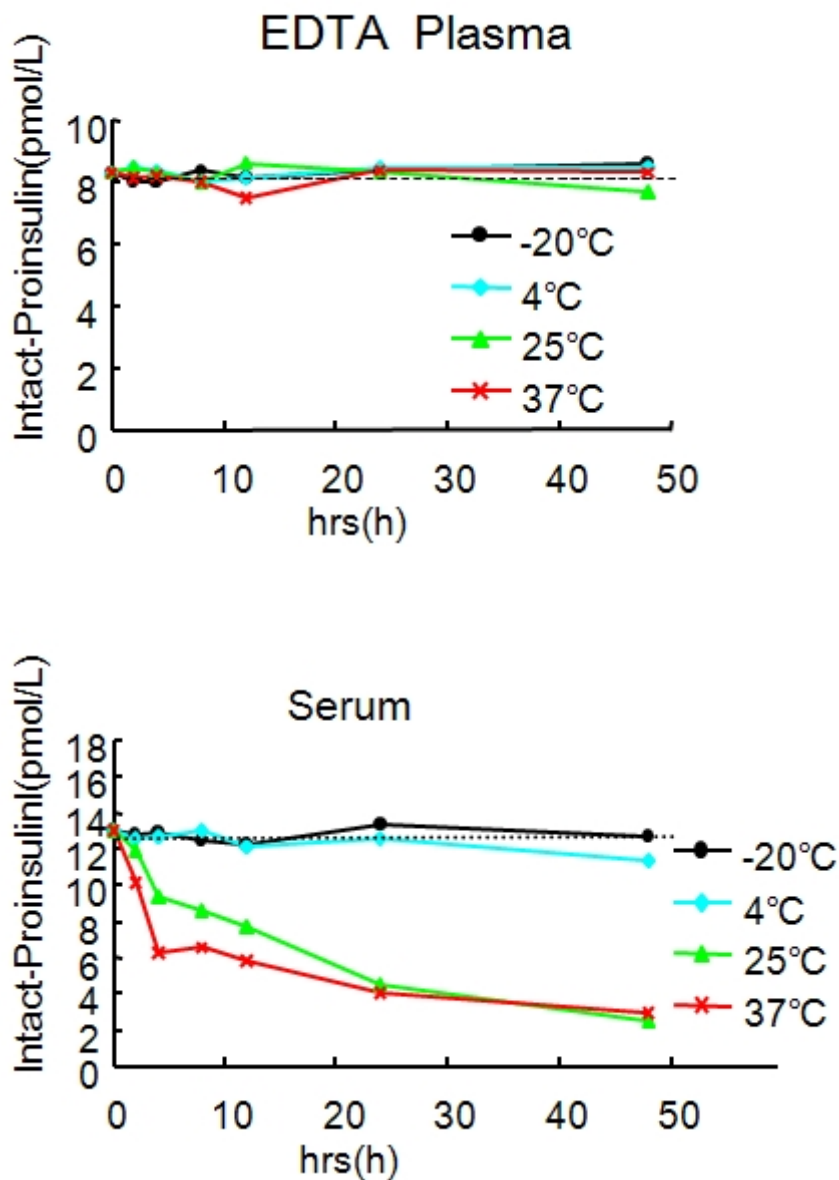
### Specimen Storage

After collection, the specimens should be capped and may be stored for up to 24 hours at 2-8°C prior to assaying. Specimens held for a longer time should be frozen only once at -20°C prior to assay. Thawed samples should be inverted several times prior to testing.

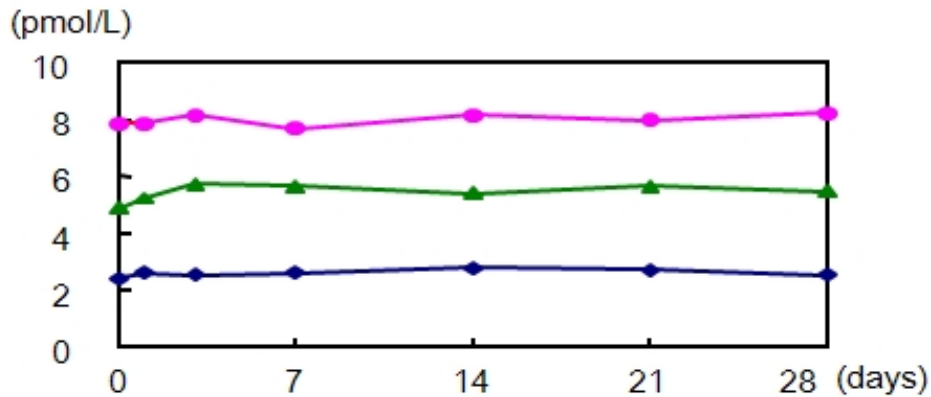
We recommend duplicate analyses for each sample.

### Sample Stability

Generally, freshly collected plasma or serum should be used. Samples can be stored for maximal 24 hours at 2-8°C prior to assaying. For a longer storage, the samples should be frozen at -20°C.



## long term stability at -20°C



## 7. ASSAY PROCEDURE

### *Principle of the test*

The Intact Proinsulin Assay is a two-site immunoassay, employing a specific solid phase antibody immobilized on microtiter wells and a soluble antibody labeled with biotin. The sample is incubated in the microtiter well together with a buffer and, after a wash step, the labeled antibody solution is added. After a second incubation and wash step, HRP labeled streptavidin is added. A third incubation and wash is followed by the addition of substrate solution. Following color development "stop reagent" is added and the color intensity measured in a 96-well ELISA reader.

### Test procedure

1.	Prior to use in the assay, allow all <b>reagents and samples</b> to come to <b>room temperature</b> (18-26 °C) and mix well
2.	Mark the <b>positions of STD</b> (Standard), <b>SAMPLE</b> (Sample) and <b>CTRL</b> (Control) on a protocol sheet
3.	<b>Take microtiter strips</b> out of the kit. Store unused strips covered at 2-8° C. Strips are stable until the expiry date stated on the label
4.	Add <b>50 µl of SAMPLEBUF</b> (sample buffer) into each well
5.	Add <b>50 µl of STD</b> (Standard), <b>SAMPLE</b> (Sample) and <b>CTRL</b> (Control) in duplicate into respective well
6.	Cover the plate tightly and incubate for <b>2 hours at room temperature</b> (18-26°C)
7.	Discard the contents of each well. Remove residual fluids by tapping the plate on absorbent paper. Fill Plate with <b>300 µl of diluted wash buffer</b> . Empty plate and remove residual buffer by tapping the plate on absorbent paper. <b>Repeat this step 2x</b> and make sure to remove residual buffer by tapping the plate on absorbent paper after each washing step
8.	Add <b>100 µl AB</b> (biotin conjugated antibody) into each well
9.	Cover the plate tightly and incubate for <b>1 hour at room temperature</b> (18-26°C)
10.	Discard the contents of each well. Remove residual fluids by tapping the plate on absorbent paper. Fill Plate with <b>300 µl of diluted wash buffer</b> . Empty plate and remove residual buffer by tapping the plate on absorbent paper. <b>Repeat this step 2x</b> and make sure to remove residual buffer by tapping the plate on absorbent paper after each washing step
11.	Add <b>100 µl CONJ</b> (HRP-Conjugate) into each well



12. Cover the plate tightly and incubate for <b>30 minutes at room temperature</b> (18-26°C)
13. Discard the contents of each well. Remove residual fluids by tapping the plate on absorbent paper. Fill Plate with <b>300 µl of diluted wash buffer</b> . Empty plate and remove residual buffer by tapping the plate on absorbent paper. <b>Repeat this step 2x</b> and make sure to remove residual buffer by tapping the plate on absorbent paper after each washing step
14. Add <b>100 µl of SUB</b> (substrate) into each well
15. Incubate for <b>30 minutes at room temperature</b> (18-26°C) in the dark
16. Add <b>100 µl of STOP</b> (stop solution) into each well
17. Determine <b>absorption</b> immediately with an ELISA reader at <b>450 nm</b> against 620 nm (or 690 nm). If no reference wavelength is available, read only at 450 nm

## 8. RESULTS

The following algorithms can be used alternatively to calculate the results. We recommend using the "cubic-spline-algorithm".

### 1. 4-Parameter-algorithm

It is recommended to use a linear ordinate for the optical density and a logarithmic abscissa for the concentration. When using a logarithmic abscissa, the zero calibrator must be specified with a value less than 1 (e. g. 0.01).

### 2. Point-to-point-calculation

We recommend a linear ordinate for the optical density and a linear abscissa for the concentration.

### 3. Spline-algorithm

The plausibility of the pairs of values should be examined before the automatic evaluation of the results. If this option is not available with the used program, a control of the paired values should be done manually.

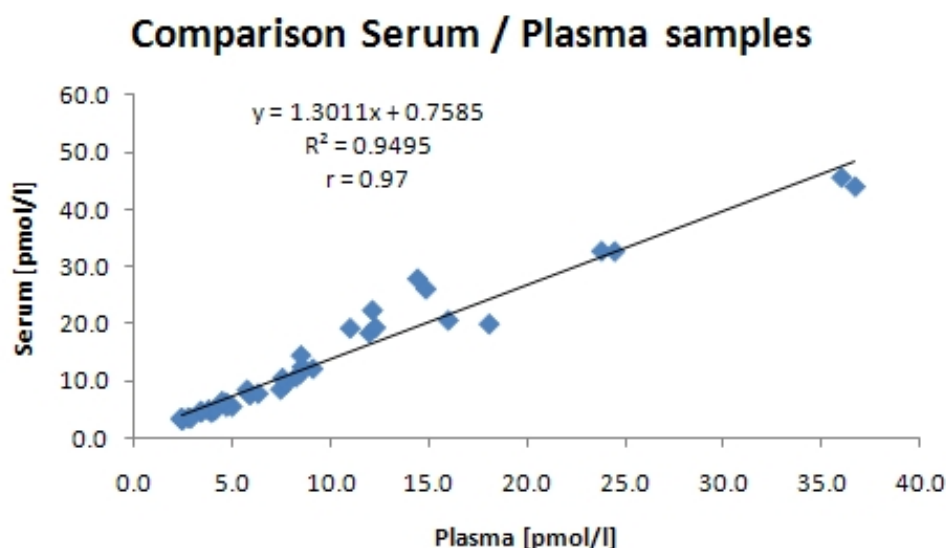
## Comparison of Serum and Plasma Samples

In general, plasma samples are recommended for determination of intact proinsulin, because the marker is more stable in plasma than in serum. However, measurement of intact proinsulin in serum samples is possible.

The comparison of the results for serum and plasma samples (n = 40) revealed the following regression equation:

$$Y (\text{plasma concentration}) = 1.3 * (\text{serum}) + 0.76$$

Therefore, to ensure comparability with data from the literature (see Point, 9. Expected Results), the above regression equation must always be considered by the evaluation of the results from measurements of intact proinsulin in serum samples.



## 9. QUALITY CONTROL

Immundiagnostik AG recommends the use of commercial control samples for internal quality control if available.

Control samples should be analyzed with each run. Results, generated from the analysis of control samples, should be evaluated for acceptability using appropriate statistical methods. The results for the patient samples may not be valid, if within the same assay one or more values of the quality control sample are outside the acceptable limits.

## Expected values

It is strongly recommended that each laboratory determines its own normal and abnormal values. Studies have been performed with the Intact Proinsulin Kit with adult males and females that had been diagnosed as having type 2 diabetes previously and were being treated with oral anti-diabetes drugs (1-3). Samples from patients with type 2 diabetes with oral medication or dietary treatment were collected from 149 sites that participated in the IRIS-II study. In total, 2,146 male and 2,124 female patients with type 2 diabetes without insulin therapy participated in the study. In an additional study 10 groups of 50 patients, each with incremental homeostasis model assessment (HOMA) scores, were randomly chosen out of a 4,265-person cohort in order to investigate intact proinsulin and adiponectin over a wide range of insulin resistance. Another study evaluated 48 patients with type 2 diabetes and on oral anti-diabetic treatment. Twenty women and 28 men, aged 60 ( $\pm$  9 years), were studied by means of an intravenous glucose tolerance test. Determinations of fasting values of intact proinsulin, insulin, resistin, adiponectin, and glucose were performed. The results of these studies showed that a fasting intact proinsulin concentration of  $\geq 10$  pmol/l predicts the presence of insulin resistance in patients with type 2 diabetes mellitus at a very high specificity and high sensitivity. Fasting proinsulin levels in normal subjects were found to be  $< 10$  pmol/l. To increase the specificity of the detection, and based on recent studies, fasting concentrations less than 11 pmol/L should be considered as normal.

In general, the measurement should be repeated within 3-6 months, if the values in patients with Type 2 Diabetes are in the upper normal range (7-11 pmol/L).

Type 2 Diabetes patients with values  $> 11$  pmol/L may have insulin resistance and insulin secretory dysfunction.

Patients with no Type 2 Diabetes and values  $> 11$  pmol/L should be examined for diabetes mellitus or insulinoma as well for cardiovascular risk factors.

(See also different laboratory service providers, e.g. [www.labor-limbach.de](http://www.labor-limbach.de), [www.bioscientia.de](http://www.bioscientia.de), [www.labor28.de](http://www.labor28.de))

## Limitations

- The values obtained from this assay are intended to aid in diagnosis only. As with all serological tests, interpretation of results obtained with this test must be used in conjunction with the patient's clinical symptoms, medical history and other clinical and/or laboratory findings.

- Only if test instructions are rigidly followed will optimum results be achieved.
- Use fresh plasma or specimens frozen and thawed no more than twice. Specimens that are improperly stored or are subjected to multiple freeze-thaw cycles may yield spurious results.
- Reproducible results depend on careful pipetting, observation of incubation periods and temperature, as well as thorough mixing of all prepared solutions.
- While rinsing, check that all wells are filled evenly with Washing Solution, and that there are no residues in the wells.
- Instructions for using appropriate luminometers are to be observed. Check that the instrument has the correct measurement protocol installed.

### *Interfering Substances*

Interferences were studied in accordance with CLSI recommendations (CLSI EP7-A2). To study the effect of lipaemia, test pools were prepared by spiking plasma samples with a commercial lipid emulsion (Intralipid Sigma). Test samples for investigating the effect of haemolysis were obtained by osmotic shock. Icteric samples were prepared by spiking plasma samples with commercial bilirubin (Sigma).

No effect of lipaemia was observed at a lipaemic index up to 975. Interference due to haemolysis was not apparent at a haemolysis index up to 467. Bilirubin produced no apparent interference up to an icterus index of 1065.

## **10. PERFORMANCE CHARACTERISTICS**

### *Precision and reproducibility*

#### **Intra-Assay-Variation**

Three plasma pools were analyzed in 5 individual assays, each in duplicate. The following results were obtained:

Intact Proinsulin (pmol/l)	CV%	n
3.38	2.61	5
27.6	4.47	5
57.2	3.57	5

## Recovery

Five plasma samples containing low endogenous intact proinsulin were spiked with recombinant proinsulin at 3 concentration levels. Recoveries are shown as percentages of the expected result for samples within the range of 9 to 22 pmol/l.

Sample	1	2	3	4	5
Spike 5%	102.4	107.5	100.4	98.8	97.6
Spike 10%	105.1	107.1	102.8	101.9	96.1
Spike 15%	104.4	107.5	102.1	101.3	100.4

Mean spiking recovery was 102.4%.

## Linearity

Four patient samples containing elevated proinsulin concentrations were diluted in Sample dilution buffer. The following table shows the measured intact proinsulin concentrations of the undiluted and diluted specimens.

Measured proinsulin (pmol/l)				
Dilution Factor	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4
0	46.1	46.7	22.8	48.6
1:2	24.1	26.6	12.6	27.5
1:4	11.0	12.7	6.3	12.4
1:8	5.4	5.3	3.3	6.0

## Sensitivity

Sensitivity was estimated as two standard deviations from the mean of 20 replicates of a zero standard. Calculated in this way, analytical sensitivity of the Intact Proinsulin Assay is 0.02 pmol/l. The dynamic range of the assay is 0.02-100 pmol/l.

## High Dose Hook Effect

Because of the assay architecture, which employs separate incubations with solid phase and labeled antibodies, no high dose hook effect is experienced.

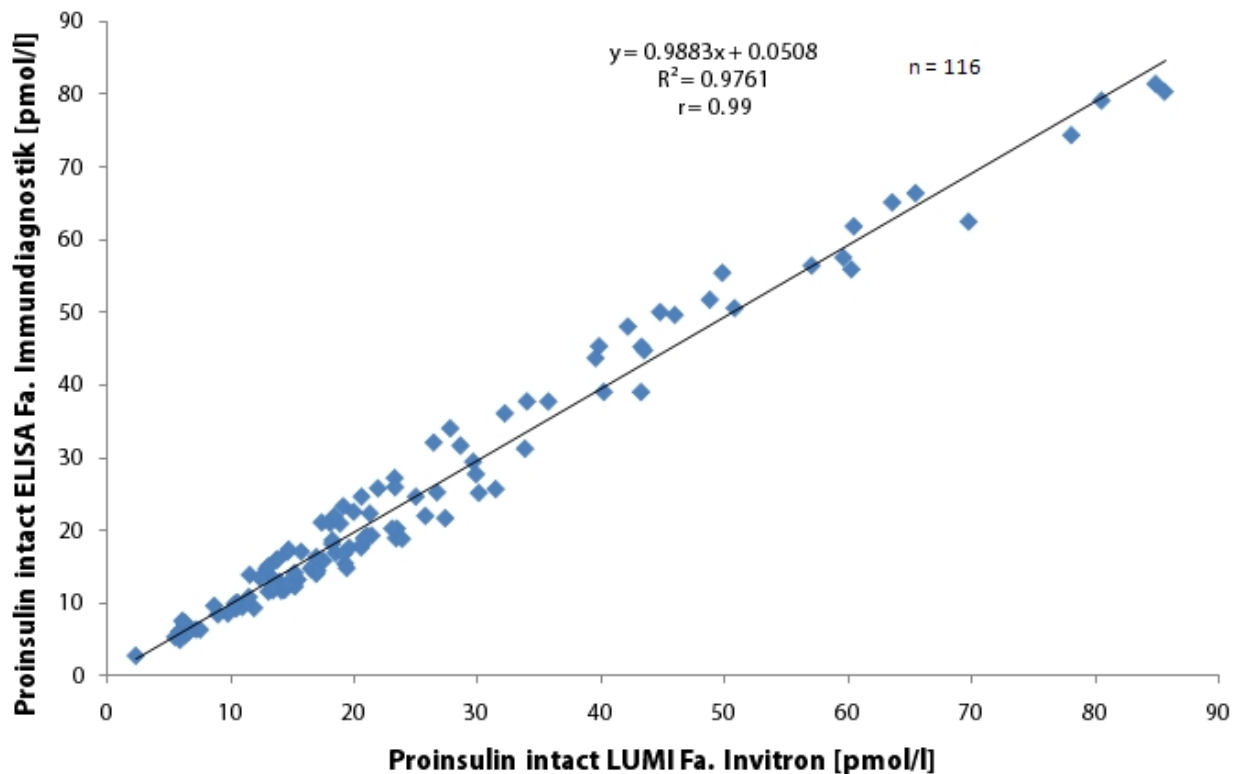
### Cross reactivity

Cross reactivities of related proteins were investigated at concentrations of 100 pmol/l. Results are expressed as percentages of the reactivity of an identical concentration of intact proinsulin.

Peptide	CR [%]
Intact proinsulin	100
Insulin	0.0
32-33 split proinsulin	5.6
Des 31-32 split proinsulin	1.4
65-66 split proinsulin	37
Des 65-66 split proinsulin	63
C-peptide	0.0

### Comparison with the Gold Standard Chemoluminescence

#### Correlation Proinsulin intact ELISA / LUMI



## 11. PRECAUTIONS

- For *in vitro* diagnostic use only.
- The quality control guidelines should be followed.
- Human material used in the kit components was tested and found to be negative for HIV, Hepatitis B and Hepatitis C. However, for safety reasons, all kit components should be treated as potentially infectious.
- Reagents of the kit package contain sodium azide or thimerosal as bactericides. Sodium azide and thimerosal are toxic. The substrates for the enzymatic color reactions are toxic and carcinogenic. Avoid contact with skin or mucous membranes.
- Stop solution is composed of sulphuric acid, which is a strong acid. Even diluted, it still must be handled with care. It can cause acid burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spill should be wiped out immediately with copious quantities of water.

## 12. TECHNICAL HINTS

- Do not mix different lot numbers of any kit component.
- Reagents should not be used beyond the expiration date shown on the kit label.
- Substrate solution should remain colorless until use.
- To ensure accurate results, proper adhesion of plate sealers during incubation steps is necessary.
- Avoid foaming when mixing reagents.
- The assay should always be performed according the enclosed manual.

## 13. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- This assay was produced and distributed according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- All reagents in the kit package are for *in vitro* diagnostic use only.
- The guidelines for medical laboratories should be followed.

- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the components are defined by the producer. Any variation of the test procedure, which is not coordinated with the producer, may influence the results of the test. Immundiagnostik AG can therefore not be held responsible for any damage resulting from wrong use.
- Warranty claims and complaints in respect of deficiencies must be lodged within 14 days after receipt of the product. The product should be send to Immundiagnostik AG together with a written complaint.








## 14. REFERENCES

Pfützner A, Kunt T, Hohberg C, Mondok A, Pahler S, Konrad T, Lübben G, Forst T (2004) Fasting intact proinsulin is a highly specific predictor of insulin resistance in type 2 diabetes. *Diabetes Care* **27**:682-687

Langenfeld MR, et al. (2004) IRIS II Study: Sensitivity and specificity of intact proinsulin, adiponectin and the proinsulin/adiponectin ratio as markers for insulin resistance. *Diabetes Technology & Therapeutics*. **6**:836-843

Pfützner A, et al. (2005) IRIS II Study: Intact proinsulin is confirmed as a highly specific indicator for insulin resistance in a large cross-sectional study design. *Diabetes Technology & Therapeutics*. **7**:478-486

### Used symbols:

	Temperature limitation		Catalogue Number
	In Vitro Diagnostic Medical Device		Contains sufficient for <n> tests
	Manufacturer		Use by
	Lot number		