

Intaktes Proinsulin ELISA

*Zur in-vitro-Bestimmung von intaktem Proinsulin
in humanem Plasma*

Intact Proinsulin ELISA

*For the in vitro determination of intact proinsulin
in human plasma*

Gültig ab / Valid from 2023-11-14

REF K 7821



IVD



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Inhalt

1. VERWENDUNGSZWECK	2
2. EINLEITUNG	2
3. INHALT DER TESTPACKUNG	2
4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	3
5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN	3
6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG	4
<i>Probenverdünnung</i>	4
<i>Probenmatrices</i>	4
<i>Probenentnahme</i>	4
<i>Probenlagerung</i>	5
<i>Probenstabilität</i>	5
7. TESTDURCHFÜHRUNG	6
<i>Testprinzip</i>	6
<i>Pipettierschema</i>	6
8. ERGEBNISSE	8
9. EINSCHRÄNKUNGEN	9
10. QUALITÄTSKONTROLLE	9
<i>Erwartete Ergebnisse</i>	9
<i>Anwendungsbeschränkungen</i>	10
<i>Substanzen, die das Ergebnis beeinträchtigen können</i>	11
11. TESTCHARAKTERISTIKA	11
<i>Präzision und Reproduzierbarkeit</i>	11
<i>Wiederfindungsrate</i>	12
<i>Hook-Effekt</i>	12
<i>Linearität</i>	12
<i>Sensitivität</i>	12
<i>Vergleich mit dem Goldstandard Chemolumineszenz</i>	13
<i>Kreuzreaktivität</i>	13
12. VORSICHTSMASSNAHMEN	14
13. TECHNISCHE MERKMALE	14
14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	15
15. LITERATUR	15

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay ist für die Bestimmung von intaktem Proinsulin aus humanen Serum- und Plasmaproben geeignet. Nur zur *in-vitro*-Diagnostik

2. EINLEITUNG

Die Bestimmung von Proinsulin wird bei der Diagnose und Behandlung von Patienten mit Typ-2-Diabetes angewendet.

Proinsulin ist eine Vorstufe von Insulin, die von den β -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 1 und 2
- Insulinome, funktionale Hypoglykaemie und Hyperinsulinaemie
- Nierenfunktionsstörungen, Zirrhosen und Hyperthyreose
- Erkrankung der Herzkranzgefäße

3. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 7821	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 0001.C.100	WASHBUF	Waschpufferkonzentrat, 10x	2 x 100 ml
K 7821	AB	Biotinmarkierter Proinsulin-Antikörper, gebrauchsfertig	1 x 12 ml
K 7821	SAMPLEBUF	Probenpuffer, gebrauchsfertig	1 x 12 ml
K 7821	CONJ	HRP-Konjugat, gebrauchsfertig	1 x 12 ml

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 7821	STD	Standards, lyophilisiert (Konzentrationen der Spezifikation entnehmen)	5 x 1 ml
K 7821	CTRL A	Kontrolle A, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entnehmen)	1 x 1 ml
K 7821	CTRL B	Kontrolle B, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entnehmen)	1 x 1 ml
K 0002.15	SUB	Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 0003.15	STOP	Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 15 ml

Die bei dem Test verwendeten Standards wurden am WHO-Referenzpräparat IRR 09/296 kalibriert.

4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Reinstwasser*
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 10–1000 µl
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Mikrotiterplattenschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Vortex-Mixer
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Mikrotiterplattenphotometer (benötigte Filter siehe Kapitel 7)

* Immundiagnostik AG empfiehlt die Verwendung von Reinstwasser nach ISO 3696. Es handelt sich dabei um Wasser des Typs 1, welches frei von ungelösten und kolloidalen Ionen und organischen Molekülen ist (frei von Partikeln > 0,2 µm) mit einer elektrischen Leitfähigkeit von 0,055 µS/cm bei 25 °C (≥ 18,2 MΩ cm).

5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz des Kits darauf, dass die Reagenzien wie auf dem Etikett angegeben gelagert und **nur die für den jeweiligen Ansatz benötigten Reagenzienmengen frisch angesetzt werden**. Der Kit kann so bis zu 4 x je nach Probenaufkommen bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.

- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner 100 µl** sollten vor Gebrauch kurz an-zentrifugiert werden, um Volumenverluste zu vermeiden.
- **Vorbereitung des Waschpuffers:** Das **Waschpufferkonzentrat (WASHBUF)** muss vor Gebrauch **1:10** in Reinstwasser verdünnt werden (100 ml WASH-BUF + 900 ml Reinstwasser), gut mischen. Aufgrund des hohen Salzgehalts im Konzentrat kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich bei Raumtemperatur bzw. im Wasserbad bei 37 °C auf. Das **WASHBUF** kann bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Der **Waschpuffer** (1:10 verdünntes WASHBUF) ist **1 Monat bei 2–8 °C** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- **Die lyophilisierten Standards (STD) und Kontrollen (CTRL)** sind bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. STD und CTRL werden mit **1000 µl Reinstwasser** rekonstituiert und kurz geschwenkt, um eine voll-ständige Rekonstitution zu gewährleisten. Sie werden zum Lösen 10 Minu-ten stehen gelassen und anschließend gründlich gemischt. **Standards und Kontrollen** (rekonstituierte STD und CTRL) **können 1 Monat bei 2–8 °C oder mindestens 8 Wochen bei -20 °C gelagert werden mit bis zu 3 Einfrier-/ Auftauzyklen.**
- Alle anderen Testreagenzien sind gebrauchsfertig und, bei **2–8 °C** gelagert, bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG

Probenverdünnung

Es ist keine Vorverdünnung der Proben notwendig.

Probenmatrices

Es wird die Verwendung von Heparin- oder EDTA-Plasma empfohlen, da für Serum nicht die volle Wiederfindung gewährleistet werden kann. Keine stark hämolysierten Proben verwenden.

Probenentnahme

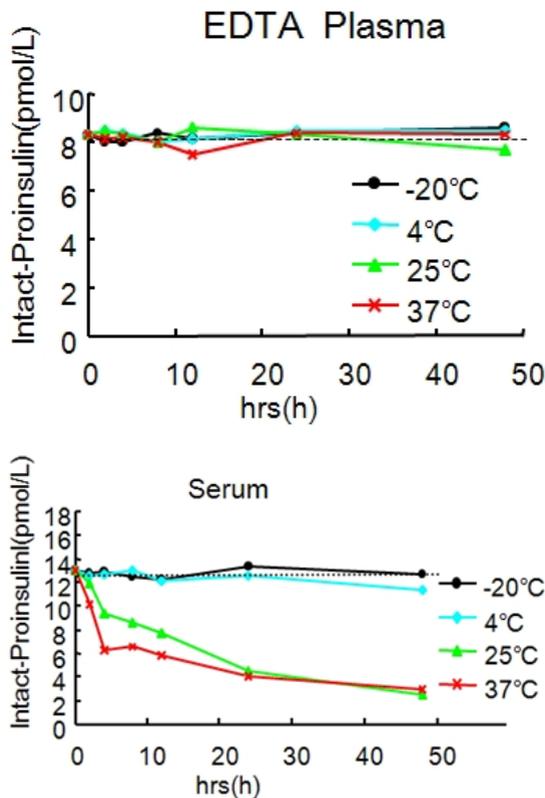
Vollblut sollte in ein Röhrchen aufgenommen werden, das EDTA oder Heparin als Antikoagulans enthält, maximal 20 Minuten stehen gelassen werden und dann min-destens 15 Minuten bei 2000 bis 3000 rpm zentrifugiert werden. Der klare, zellfreie Überstand sollte dann sofort abgenommen und verwendet werden.

Probenlagerung

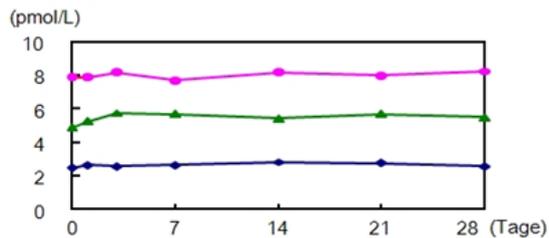
Proben sollten nach Abnahme verschlossen werden und können vor dem Test bis zu 24 Stunden bei 2-8°C gelagert werden. Zur längeren Lagerung vor dem Test können Proben einmal bei -20°C eingefroren werden. Auftaute Proben sollten vor dem Test zum Durchmischen mehrere Male umgedreht werden.

Probenstabilität

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

Dieser ELISA dient zur quantitativen Bestimmung von intaktem Proinsulin in humanen Serum- und Plasmaproben.

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. Anhand einer mitgeführten Standardkurve – optische Dichte (Absorption bei 450 nm) versus Standardkonzentration – lässt sich die Konzentration der Probe ermitteln.

Pipettierschema

Vor Gebrauch **alle Reagenzien und Proben** auf **Raumtemperatur** (15–30°C) bringen, gut mischen.

Markieren Sie die Positionen für Standards/Proben/Kontrollen im Protokollblatt.

Die benötigten Mikrotiterstreifen aus dem Kit nehmen. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen müssen zusammen mit dem Trockenmittelbeutel in der verschlossenen Aluminiumverpackung bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum bei 2–8°C gelagert werden.

Im Fall einer automatisierten Abarbeitung des Tests können automaten-spezifische Anpassungen der Prozedur notwendig sein, um den jeweiligen technischen Gegebenheiten gerecht zu werden. Für Unterstützung und Rückfragen wenden Sie sich bitte an Ihren Anbieter oder Immundiagnostik AG.

Wir empfehlen, die Bestimmungen in Doppelwerten durchzuführen.

1.	50 µl Probenpuffer (SAMPLEBUF) in jede Vertiefung pipettieren.
2.	Je 50 µl Standards/Kontrollen/Proben in die jeweiligen Vertiefungen pipettieren.
3.	Streifen abdecken und 2 Stunden bei Raumtemperatur (15–30 °C) inkubieren.
4.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und Flüssigkeitsreste durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen. Dann mit je 300 µl Waschpuffer befüllen und die Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen. Diesen Vorgang weitere 2x wiederholen und nach jedem Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
5.	100 µl Biotin-Antikörper (AB) in jede Vertiefung pipettieren.
6.	Streifen abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (15–30 °C) inkubieren.
7.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und Flüssigkeitsreste durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen. Dann mit je 300 µl Waschpuffer befüllen und die Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen. Diesen Vorgang weitere 2x wiederholen und nach jedem Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
8.	100 µl Konjugat (CONJ) in jede Vertiefung pipettieren.
9.	Streifen abdecken und 30 Minuten bei Raumtemperatur (15–30 °C) inkubieren.

10.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und Flüssigkeitsreste durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen. Dann mit je 300 µl Waschpuffer befüllen und die Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen. Diesen Vorgang weitere 2x wiederholen und nach jedem Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
11.	100 µl Substrat (SUB) in jede Vertiefung pipettieren.
12.	10–20 min* bei Raumtemperatur (15–30°C) im Dunkeln inkubieren.
13.	100 µl Stopplösung (STOP) in jede Vertiefung pipettieren, gut mischen.
14.	Extinktion sofort im Mikrotiterplattenphotometer bei 450 nm gegen die Referenzwellenlänge 620 nm (oder 690 nm) messen. Ist keine Referenzwellenlänge vorhanden, wird nur bei 450 nm gemessen. Falls die Extinktion des höchsten Standards den Messbereich des Photometers übersteigt, sollte sofort bei 405 nm gegen 620 nm (690 nm) gemessen werden.

* Die Intensität der Farbentwicklung ist temperaturabhängig. Es wird empfohlen, den Farbumschlag während der Inkubationszeit zu beobachten und entsprechend der Farbentwicklung die Reaktion zu stoppen.

8. ERGEBNISSE

Wir empfehlen die kubische Spline-Funktion zur Auswertung der Ergebnisse. Die unten beschriebenen mathematischen Modelle können alternativ zur Auswertung benutzt werden.

1. Spline-Funktion

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

2. 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. 0,001).

3. Punkt-zu-Punkt-Auswertung

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

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.

9. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben, deren OD höher ist als die des höchsten Standards, sollten verdünnt und nochmals im Assay eingesetzt werden. Bei der folgenden Auswertung ist der veränderte Verdünnungsfaktor zu beachten.

10. QUALITÄTSKONTROLLE

Immundiagnostik AG empfiehlt den Einsatz von externen Kontrollen für die interne Qualitätskontrolle, wenn möglich.

Wir empfehlen, bei jedem Testansatz Kontrollen mitzumessen. Die Ergebnisse der Kontrollen müssen auf Richtigkeit überprüft werden. Liegen eine oder mehrere Kontrollen außerhalb des angegebenen Bereiches, kann Immundiagnostik die Richtigkeit der Messergebnisse 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 (1–2).

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.

Diese Studien wurden vor der Umstellung des Internationalen Referenz Reagenzien Standards IRR 84/611 auf den Standard IRR 09/296 durchgeführt. Basierend auf der Messung von Proben, konnte festgestellt werden, dass mit dem neuen Standard IRR 09/296 eine Wiederfindung von 72,5 % im Vergleich zum alten Standard erzielt wird. Die Nüchternwerte für intaktes Proinsulin von gesunden Probanden liegen daher mit IRR 09/296 $< 7,25$ pmol/l.

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.

11. TESTCHARAKTERISTIKA

Präzision und Reproduzierbarkeit

Zwei verschiedene Plasma-Pools wurden in 20 getrennten Assays jeweils in Duplikaten getestet und lieferten folgende Ergebnisse:

Intra-Assay

Intaktes Proinsulin [pmol/l]	Standardabweichung [pmol/l]	VK [%]
3,8	0,19	4,9
70	1,84	2,6

Inter-Assay

Intaktes Proinsulin [pmol/l]	Standardabweichung [pmol/l]	VK [%]
3,8	0,33	8,8
70	3,82	5,5

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.

Probe	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%.

Hook-Effekt

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

Linearität

Fünf 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 in pmol/l.

Verdünnungs-faktor	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5
0	69,6	56,4	18,7	26,2	6,8
1:2	38,3	27,4	10,1	14,5	3,6
1:4	18,9	13,7	5,6	7,1	1,7
1:8	10,0	7,0	2,7	3,6	0,9
1:16	5,2	3,7	1,3	2,0	0,5

Sensitivität

Leerwert (*limit of blank*, LoB)

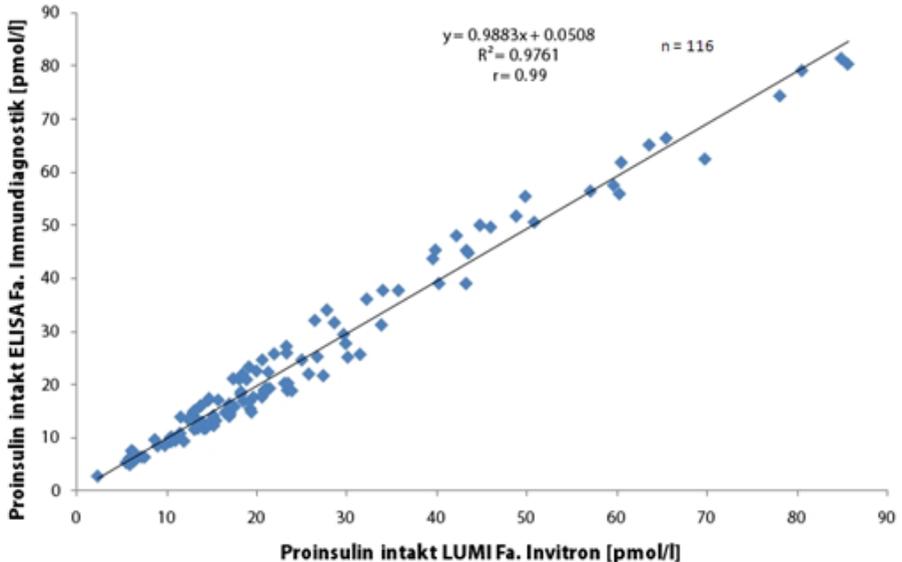
0,02 pmol/l

Nachweisgrenze (*limit of detection*, LoD)

0,36 pmol/l

Vergleich mit dem Goldstandard Chemolumineszenz

Korrelation Proinsulin intakt ELISA / LUMI



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.

- | | |
|------------------------------|-------|
| • 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 % |

12. VORSICHTSMASSNAHMEN

- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur *in-vitro*-Diagnostik verwendet werden.
- Das für Kitkomponenten verwendete humane Material wurde auf HIV, Hepatitis B und Hepatitis C getestet und für negativ befunden. Dennoch wird empfohlen, die Kitkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material zu behandeln.
- Die Kitkomponenten enthalten zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen Natriumazid oder ProClin. Natriumazid bzw. ProClin sind gesundheitsgefährdend und umweltschädlich. Auch Substrate für enzymatische Farbreaktionen können zu Haut- und/oder Atemwegsreizungen führen. Jeder Kontakt mit den Substanzen ist zu vermeiden. Weiterführende Sicherheitsinformationen sind dem Sicherheitsdatenblatt zu entnehmen, welches Sie auf Anfrage bei der Immundiagnostik AG erhalten.
- Das 10x Waschpufferkonzentrat (WASHBUF) enthält Tenside, welche bei Augenkontakt zu schweren Augenreizungen führen können.

Achtung: Verursacht schwere Augenreizung. **BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN:** Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen. Bei anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.

- Die Stopplösung besteht aus verdünnter Schwefelsäure (H_2SO_4). H_2SO_4 ist eine starke Säure und muss auch in verdünnter Form mit Vorsicht benutzt 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 Säure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden. Dämpfe nicht einatmen und Inhalation vermeiden.

13. TECHNISCHE MERKMALE

- Reagenzien der Testpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden. Ferner dürfen Kavitäten unterschiedlicher Mikrotiterplatten, selbst der gleichen Charge, nicht zusammengefügt und zur Analyse verwendet werden.
- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des auf der Kitverpackung angegebenen Haltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.

- Substratlösung muss vor Gebrauch farblos sein.
- Mikrotiterstreifen müssen während der Inkubationen mit Folie abgedeckt sein.
- Vermeiden Sie Schaumbildung beim Mischen der Reagenzien.
- Stopfen und Verschlüsse verschiedener Reagenzien dürfen nicht vertauscht werden.
- Der Assay ist immer nach der dem Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.

14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD-Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Für die Qualitätskontrolle sind die für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- Die Testcharakteristika wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettierolumina 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, zurückzusenden.

15. LITERATUR

1. 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
2. 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
	<i>In-Vitro</i> -Diagnostikum		Zu verwenden mit
	Hersteller		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
	Chargenbezeichnung		Verwendbar bis
	Achtung		Gebrauchsanweisung beachten
	Spezifikationsdatenblatt beachten		Reizend

Intact Proinsulin

*For the in vitro determination of intact proinsulin
in human plasma*

Valid from 2023-11-14

REF K 7821



IVD **CE**



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Table of Contents

1. INTENDED USE	19
2. INTRODUCTION	19
3. MATERIAL SUPPLIED	19
4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	20
5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS	20
6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES	21
<i>Dilution of samples</i>	21
<i>Sample matrices</i>	21
<i>Sample collection</i>	21
<i>Specimen storage</i>	21
<i>Sample stability</i>	22
7. ASSAY PROCEDURE	23
<i>Principle of the test</i>	23
<i>Test procedure</i>	23
8. RESULTS	25
9. LIMITATIONS	25
10. QUALITY CONTROL	26
<i>Expected values</i>	26
<i>Limitations</i>	27
<i>Interfering substances</i>	27
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	27
<i>Precision and reproducibility</i>	27
<i>Spiking recovery</i>	28
<i>Linearity</i>	28
<i>Cross reactivity</i>	28
<i>Sensitivity</i>	29
<i>High dose hook effect</i>	29
<i>Comparison with the gold standard chemoluminescence</i>	29
12. PRECAUTIONS	30
13. TECHNICAL HINTS	30
14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	31
15. REFERENCES	31

1. INTENDED USE

This Immundiagnostik AG assay is an enzyme immunoassay intended for the quantitative determination of intact proinsulin in serum and plasma. For *in vitro* diagnostic use only.

2. INTRODUCTION

Measurements of proinsulin are used in the diagnosis and treatment of patients with type 2 diabetes

Proinsulin is a precursor molecule for insulin and is synthesised by the pancreatic β -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 1 and 2
- Insulinomas, functional hypoglycaemia, hyperinsulinemia
- Kidney dysfunction, cirrhosis and hyperthyreosis
- Cardiovascular diseases

3. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 7821	PLATE	Microtiter plate, pre-coated	12 x 8 wells
K 0001.C.100	WASHBUF	Wash buffer concentrate, 10x	2 x 100 ml
K 7821	AB	Biotin-conjugated proinsulin antibody, ready-to-use	1 x 12 ml
K 7821	SAMPLEBUF	Sample buffer, ready-to-use	1 x 12 ml
K 7821	CONJ	HRP-conjugate, ready-to-use	1 x 12 ml
K 7821	STD	Standards, lyophilised (see specification for concentrations)	5 x 1 ml

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 7821	CTRL A	Control, lyophilised (see specification for range)	1 x 1 ml vial
K 7821	CTRL B	Control, lyophilised (see specification for range)	1 x 1 ml vial
K 0002.15	SUB	Substrate (tetramethylbenzidine), ready-to-use	1 x 15 ml
K 0003.15	STOP	Stop solution, ready-to-use	1 x 15 ml

The used standards have been calibrated on the WHO reference material IRR 09/296.

4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Ultrapure water*
- Calibrated precision pipettors and 10–1000 µl single-use tips
- Foil to cover the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker
- Multi-channel pipets or repeater pipets
- Vortex
- Standard single-use laboratory glass or plastic vials, cups, etc.
- Microtiter plate reader (required filters see chapter 7)

* Immundiagnostik AG recommends the use of ultrapure water (water type 1; ISO 3696), which is free of undissolved and colloidal ions and organic molecules (free of particles > 0.2 µm) with an electrical conductivity of 0.055 µS/cm at 25 °C (≥ 18.2 MΩ cm).

5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS

- To run the assay more than once, ensure that reagents are stored at the conditions stated on the label. **Prepare only the appropriate amount necessary for each run.** The kit can be used up to 4 times within the expiry date stated on the label.
- **Preparation of the wash buffer:** The **wash buffer concentrate (WASHBUF)** has to be diluted with ultrapure water **1:10** before use (100 ml WASHBUF + 900 ml ultrapure water), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the concentrate. Before dilution, the crystals have to be redissolved at room temperature or in a water bath at 37 °C. The **WASHBUF** is stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. **Wash buffer** (1:10 diluted WASHBUF) can be stored in a closed flask at **2–8 °C for 1 month**.

- The **lyophilised standards** (STD) and **controls** (CTRL) are stable at **2–8°C** until the expiry date stated on the label. Before use, the STD and CTRL have to be reconstituted with **1000 µl of ultrapure water**. Allow the vial content to dissolve for 5 minutes and mix thoroughly by gentle inversion to ensure complete reconstitution. **Standards and controls** (reconstituted STD and CTRL) **can be stored at 2–8°C for 1 month or at least for 8 weeks at -20°C with up to 3 freeze-thaw-cycles**.
- All other test reagents are ready-to-use. Test reagents are stable until the expiry date (see label) when stored at **2–8°C**.

6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES

Dilution of samples

No sample dilution is necessary.

Sample matrices

It is recommended to use heparin or EDTA Plasma for intact proinsulin measurements. Full recovery of intact proinsulin cannot be achieved from serum samples. Do not use severely hemolysed specimens.

Sample 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.

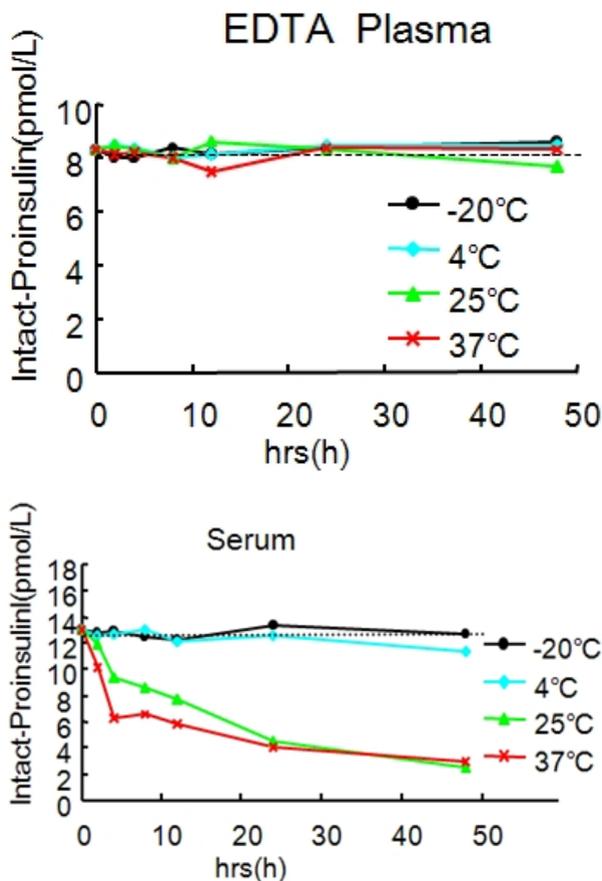
Specimen storage

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.

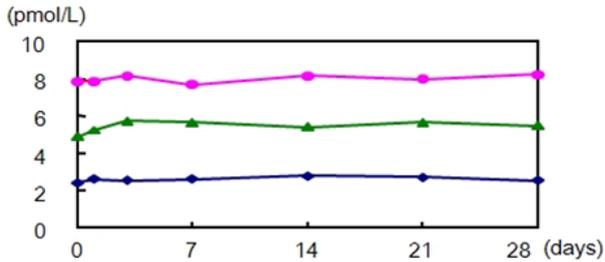
We recommend duplicate analysis for each sample.

Sample stability

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

This ELISA is designed for the quantitative determination of intact proinsulin.

The intact proinsulin assay is a two-site immunoassay, employing a specific solid phase antibody immobilised on microtiter wells and a soluble antibody labelled with biotin. The sample is incubated in the microtiter well together with a buffer and, after a wash step, the labelled antibody solution is added. After a second incubation and wash step, HRP-labelled streptavidin is added. A third incubation and wash is followed by the addition of substrate solution. Following colour development, stop reagent is added and the colour intensity measured in a 96-well ELISA reader. A dose response curve of the absorbance unit (optical density, OD at 450 nm) vs. concentration is generated, using the values obtained from the standard. Intact proinsulin, present in the samples, is determined directly from this curve.

Test procedure

Bring all **reagents and samples to room temperature** (15–30°C) and mix well.

Mark the positions of standards/samples/controls on a protocol sheet.

Take as many microtiter strips as needed from the kit. Store unused strips together with the desiccant bag in the closed aluminium packaging at 2–8°C. Strips are stable until expiry date stated on the label.

For automated ELISA processors, the given protocol may need to be adjusted according to the specific features of the respective automated platform. For further details please contact your supplier or Immundiagnostik AG.

We recommend to carry out the tests in duplicate.

1.	Add 50 µl sample buffer (SAMPLEBUF) into each well.
2.	Add each 50 µl standards/samples/controls into the respective wells.
3.	Cover the strips tightly and incubate for 2 hours at room temperature (15–30 °C).
4.	Discard the content of each well. Remove residual fluids by tapping the inverted microtiter plate on absorbent paper. Fill wells with 300 µl wash buffer . Empty wells and remove residual buffer by tapping the inverted microtiter plate on absorbent paper. Repeat this step 2x and make sure to remove residual buffer by tapping the inverted microtiter plate on absorbent paper after each washing step.
5.	Add 100 µl biotin conjugated antibody (AB) into each well.
6.	Cover the strips tightly and incubate for 1 hour at room temperature (15–30 °C).
7.	Discard the content of each well. Remove residual fluids by tapping the inverted microtiter plate on absorbent paper. Fill wells with 300 µl wash buffer . Empty wells and remove residual buffer by tapping the inverted microtiter plate on absorbent paper. Repeat this step 2x and make sure to remove residual buffer by tapping the inverted microtiter plate on absorbent paper after each washing step.
8.	Add 100 µl HRP-conjugate (CONJ) into each well.
9.	Cover the strips tightly and incubate for 30 minutes at room temperature (15–30 °C).
10.	Discard the content of each well. Remove residual fluids by tapping the inverted microtiter plate on absorbent paper. Fill wells with 300 µl wash buffer . Empty wells and remove residual buffer by tapping the inverted microtiter plate on absorbent paper. Repeat this step 2x and make sure to remove residual buffer by tapping the inverted microtiter plate on absorbent paper after each washing step.
11.	Add 100 µl TMB substrate (SUB) into each well.

12.	Incubate for 10–20 minutes* at room temperature (15–30°C) in the dark.
13.	Add 100 µl ELISA stop solution (STOP) and mix well.
14.	Determine absorption immediately with an ELISA reader at 450 nm against 620 nm (or 690 nm) as a reference. If no reference wavelength is available, read only at 450 nm.

* The intensity of the colour change is temperature sensitive. We recommend observing the colour change and stopping the reaction upon good differentiation.

8. RESULTS

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

1. Spline algorithm

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

2. 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).

3. Point-to-point calculation

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

The plausibility of the duplicate values should be examined before the automatic evaluation of the results. If this option is not available with the programme used, the duplicate values should be evaluated manually.

9. LIMITATIONS

Samples with an OD higher than the OD of the highest standard can be further diluted and re-assayed. For the following analysis, the changed dilution factor has to be taken into consideration.

10. QUALITY CONTROL

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

Control samples should be analysed 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 (1-2).

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 (± 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 > 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.

These studies were conducted prior to WHO International Reference Reagent IRR 84/611 being replaced by IRR 09/296. Based on the value assignment of the new preparation samples measured against IRR 09/296 read 72.5% of the value measured against 84/611. The equivalent fasting plasma concentration in normal subjects when measured against the new reference reagent (IRR 09/296) used in this kit would be < 7.25 pmol/l.

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 microtiter plater reader 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.

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision and reproducibility

A study was performed using 2 control samples assayed in 20 individual assays in duplicate. The following results were obtained:

Intra-Assay

Intact Proinsulin [pmol/l]	SD [pmol/l]	CV [%]
3.8	0.19	4.9
70	1.84	2.6

Inter-Assay

Intact Proinsulin [pmol/l]	SD [pmol/l]	CV [%]
3.8	0.33	8.8
70	3.82	5.5

Spiking 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	101.9	101.9	96.1
Spike 15 %	104.4	107.5	101.3	101.3	100.4

Mean spiking recovery was 102.4%.

Linearity

Five 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 in pmol/l.

Dilution factor	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5
0	69,6	56,4	18,7	26,2	6,8
1:2	38,3	27,4	10,1	14,5	3,6
1:4	18,9	13,7	5,6	7,1	1,7
1:8	10,0	7,0	2,7	3,6	0,9
1:16	5,2	3,7	1,3	2,0	0,5

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.

- Intact Proinsulin 100.0%
- 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%

Sensitivity

Limit of blank, LoB

0,02 pmol/l

Limit of detection, LoD

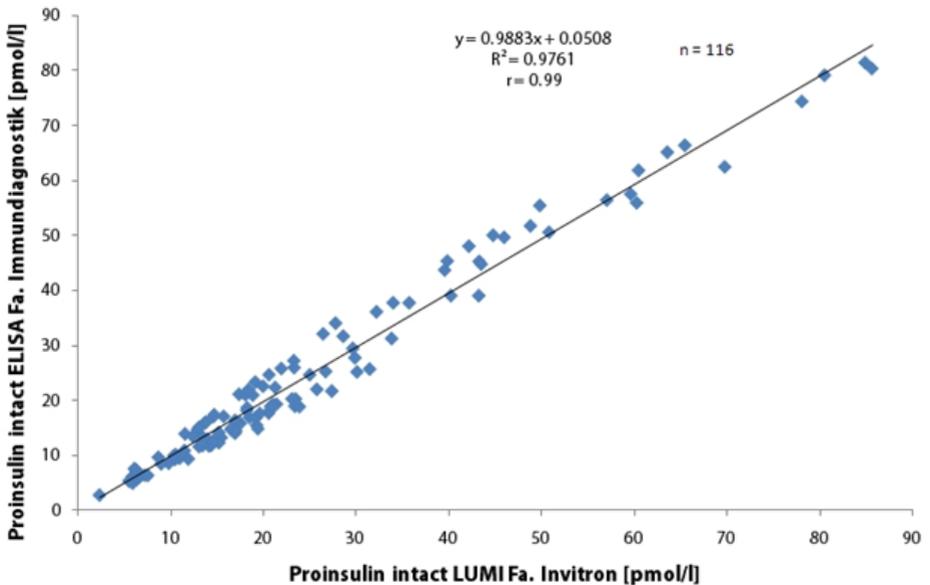
0,36 pmol/l

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.

Comparison with the gold standard chemoluminescence

Correlation Proinsulin intact ELISA / LUMI



12. PRECAUTIONS

- All reagents in the kit package are for *in vitro* diagnostic use only.
- Human materials used in kit components were 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.
- Kit reagents contain sodium azide or ProClin as bactericides. Sodium azide or ProClin are hazardous to health and the environment. Substrates for enzymatic colour reactions may also cause skin and/or respiratory irritation. Any contact with the substances must be avoided. Further safety information can be found in the safety data sheet, which is available from Immundiagnostik AG on request.
- The 10x Wash buffer concentrate (WASHBUF) contains surfactants which may cause severe eye irritation in case of eye contact.
Warning: Causes serious eye irritation. **IF IN EYES:** Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing. If eye irritation persists: get medical Advice/attention.
- The stop solution consists of diluted sulphuric acid, a strong acid. Although diluted, it still must be handled with care. It can cause burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spill should be wiped up immediately with copious quantities of water. Do not breath vapour and avoid inhalation.

13. TECHNICAL HINTS

- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay. Furthermore we recommend not assembling wells of different microtiter plates for analysis, even if they are of the same batch.
- Control samples should be analysed with each run.
- Reagents should not be used beyond the expiration date stated on kit label.
- Substrate solution should remain colourless until use.
- To ensure accurate results, proper adhesion of plate sealers during incubation steps is necessary.
- Avoid foaming when mixing reagents.

- Do not mix plugs and caps from different reagents.
- The assay should always be performed according to the enclosed manual.

14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- This assay was produced and distributed according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- 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 incorrect use.
- Warranty claims and complaints regarding deficiencies must be logged within 14 days after receipt of the product. The product should be sent to Immundiagnostik AG along with a written complaint.

15. REFERENCES

1. 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
2. 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		To be used with
	Manufacturer		Contains sufficient for <n> tests
	Lot number		Use by
	Attention		Consult instructions for use
	Consult specification data sheet		Irritant