



***English***

Invitron Intact Proinsulin Kit 1  
For in-vitro diagnostic use only

***Français***

Kit de la Proinsuline Intacte Invitron 10  
Pour les tests de diagnostic in-vitro uniquement

***Deutsch***

Invitron Intaktes Proinsulin testsystem 20  
Nur zur in-vitro Diagnostik



IV2-002



480



**Invitron Ltd**  
Wyastone Business Park  
Monmouth NP25 4QS, UK  
[www.invitron.com](http://www.invitron.com)



## Definitions/ Définitions/ Definitionen



Catalogue number  
Numéro de référence  
Bestellnummer



Use by  
Utiliser jusque  
Verwendbar bis



Batch Code  
Code du lot  
Chargenbezeichnung



Storage temperature limitations  
Limites de température de conservation  
Zulässiger Lagertemperaturbereich



In vitro diagnostic medical device  
Dispositif médical de diagnostic in vitro  
In Vitro Diagnostikum



Contains sufficient for <N> tests  
Contenu suffisant pour <N> tests  
Ausreichend für „N“ Ansätze

N



Manufactured by  
Fabriqué par  
Hersteller

## English

### Invitron Intact Proinsulin Kit

#### Intended Use

The Invitron Intact Proinsulin Assay is an immunometric assay for the quantitative measurement of intact proinsulin in human plasma samples. Measurements of proinsulin are used in the diagnosis and treatment of patients with type 2 diabetes.

#### Summary and Explanation

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.

#### Principle

The Invitron Intact Proinsulin Assay is a two-site immunoassay, employing a specific solid phase antibody immobilised on microtitre wells and a soluble antibody labelled with a chemiluminescent acridinium ester. The sample is incubated in the microtitre well together with a buffer and, after a wash step, the labelled antibody solution is added. A second incubation is followed by a further wash step to remove unbound labelled antibody before measurement. The bound luminescence is quantified by a microtitre plate luminometer capable of *in situ* reagent addition. The luminescent reaction is a rapid flash type (>95% complete in 1 second) which permits the entire plate to be read in approximately 5 minutes.

## Materials Provided

- Coated Microtitre Plate (a)  
(5 x 96 wells) stripwells coated with a specific monoclonal antibody. The plate is sealed inside a foil pouch with a desiccant to maintain a moisture-free environment.
- Labelled Antibody Concentrate (b)  
(1 x 5.5ml) Chemiluminescent labelled antibody in a protein matrix including preservatives and 0.05% sodium azide.
- Labelled Antibody Diluent (c)  
(5 x 14.1ml) Ready to use for diluting the labelled antibody to its working strength. Protein matrix including preservatives and 0.05% sodium azide.
- Standards (d) - (h)  
(5 x 1ml lyophilized) of 5 concentrations – (typically) 0.0, 1.5, 5.0, 25.0, 110 pmol/l – Recombinant intact proinsulin in a buffer matrix, lyophilized and sealed under vacuum for stability. See label for each lot of kits for actual concentrations.  
***The standards are calibrated against WHO 1st International Standard for Proinsulin (IRP 84/611).***
- Sample Buffer (i)  
(5 x 12ml) Ready to use for sample dilution. Protein matrix including preservatives and 0.05% sodium azide.
- Wash Buffer Concentrate (IV1-005)  
(1 x 50ml) phosphate buffered saline containing detergent and preservative.
- Plate sealers – 10 each
- Product Insert

## Materials Required But Not Provided

- Detection reagents. Invitron Cat. No. IV1-001.
- Deionised water
- Uncoated strips
- Microtitre plate Luminometer capable of direct injection and of measuring flash kinetics.
- Calibrated Precision Micropipettes with disposable tips.

## Warnings and Precautions

- For *in-vitro* diagnostic use only. For professional use only.
- For information on hazardous substances included in the kit please refer to Material Safety Data Sheets.
- Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics in areas where specimens or kit reagents are handled.
- Wear disposable latex gloves and appropriate protective clothing when handling specimens and reagents. Microbial contamination of reagents or specimens may give false results.
- Handling should be in accordance with the procedures defined by an appropriate national biohazard safety guideline or regulation.
- Do not use reagents beyond expiry date as shown on the kit labels.
- Once components have been opened or reconstituted, they can be used within a two-week period, provided they have been stored at 2-8°C.
- Optimal test results are only obtained when using calibrated pipettes and luminometer.
- Do not mix or use components from kits with different lot numbers.
- This kit contains no human-derived material.

## Preparation, Storage & Stability of Reagents

When stored at 2-8°C unopened reagents will retain reactivity until expiration date. Do not use reagents beyond this date. Opened reagents must be stored at 2-8°C. Microtitre wells must be stored at 2-8°C. Once the foil bag has been opened, care should be taken to close it tightly again. Opened kits retain activity for two months if stored as described above. Reconstituted/diluted reagents are stable for 2 weeks when stored at 2-8°C.

### **Standards**

Reconstitute each of the standards by the addition of 1 ml of deionised water. Allow these to stand for 5 minutes, then mix gently to ensure all solids are dissolved. Stability of the reconstituted Standards is two (2) weeks when stored at 2-8°C.

### **Labelled Antibody Concentrate**

Pipette 900 µL of labelled antibody concentrate into one bottle of Labelled Antibody Diluent and mix thoroughly. Diluted Labelled Antibody is stable for two (2) weeks when stored at 2-8°C.

### **Wash Buffer**

Make up working strength Wash Buffer by diluting 1 part of Wash Buffer concentrate with 29 parts of deionised water.

## Luminometer Set-up

The microtitre plate luminometer must be fitted with 2 injectors and it is important to check that the instrument is capable of measuring "flash" type kinetics. The measurement protocol should be set as follows:

1. Set injector 1 to deliver 100 µl of Detection Reagent 1
2. Set injector 2 to deliver 100 µl of Detection Reagent 2
3. Set a delay of 2 seconds between injection 1 and injection 2.
4. Light measurement must start at the time of the second injection (i.e. there is no delay between injection 2 and measurement).
5. Measurement time is 1 second.

## Specimen Collection & Storage

Heparin or EDTA Plasma can be used in this assay. Do not use severely haemolysed specimens.

### **Specimen Collection**

**Plasma:** Whole blood should be collected into a tube containing EDTA or heparin anticoagulant and centrifuged immediately after collection.

### **Specimen Storage**

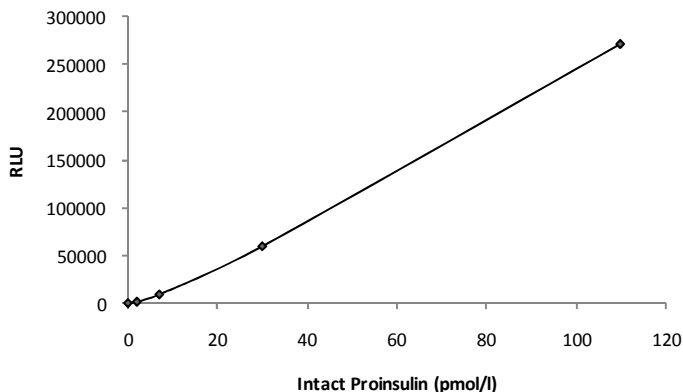
Specimens should be capped and may be stored for up to 24 hours at 2-8°C prior to assaying. Specimens held for a longer time should be frozen only once at -20°C prior to assay. Thawed samples should be inverted several times prior to testing.

## Assay Procedure

1. Bring all kit components and samples to room temperature before use.
2. Assemble the required number of coated strips in the plate holder. Any strips not used immediately may be stored inside a sealed polythene bag with silica gel desiccant. Make sure to fill remaining spaces in the plate holder with uncoated strips to ensure uniform heat transfer during incubation.
3. Pipette **50 µl Sample Buffer** into each well.
4. Pipette **50 µl each of Standard or sample** into the respective wells. Standards must be run in duplicate.
5. Attach the plate sealer and incubate for **2 hours at 37°C**.
6. Remove the plate sealer and perform **3 wash cycles** with working strength Wash Buffer (300 µl each cycle) using an automatic plate washer.
7. Pipette **100 µl labelled antibody** solution into each well.
8. Attach the plate sealer and incubate for a further **1 hr at 37°C**.
9. Remove the plate sealer and perform **3 wash cycles** with working strength Wash Buffer using an automatic plate washer.
10. Measure the light output from each well in a plate luminometer within 15 minutes.

## Typical Standard Curve

This curve is for illustration only and must not be used for result calculation.  
RLU = Relative Light Units.



## Calculation of Results

The results may be calculated automatically using a cubic spline curve fit. Other data reduction functions may give slightly different results. The concentration of the samples can be read directly from this standard curve. Samples with concentrations higher than that of the highest standard should be further diluted. For the calculation of the concentrations this dilution factor has to be taken into account.

## **Expected Values**

It is strongly recommended that each laboratory determines its own normal and abnormal values. Studies have been performed with the Invitron 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. Based on these studies, a fasting plasma

concentration  $<10$  pmol/l is considered normal while a concentration  $\geq 10$  pmol/l is suggestive of insulin resistance.

## Quality Control

The use of control samples is advised to assure the day to day validity of results. Use controls at both normal and pathological levels. It is also recommended to make use of national or international Quality Assessment programs in order to ensure the accuracy of the results. Employ appropriate statistical methods for analyzing control values and trends. If the results of the assay do not fit to the established acceptable ranges of control materials patient results should be considered invalid. In this case, please check the following technical areas: Pipetting and timing devices; luminometer, expiration dates of reagents, storage and incubation conditions, aspiration and washing methods. After checking the above mentioned items without finding any error contact your distributor directly.

## 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.

## Performance Characteristics

### **Between Assay Precision**

Three plasma pools were measured in duplicate in 5 individual assays. 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 levels. Recoveries are shown as percentages of the expected result for samples falling 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 Diluent 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 labelled 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
C-peptide	0.0
32-33 split proinsulin	5.6
Des 31-32 split proinsulin	1.4
65-66 split proinsulin	37
Des 64-65 split proinsulin	63

## References

Pfützner A, *et al.* Fasting intact proinsulin is a highly specific predictor of insulin resistance in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2004; 27, 682-687.

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

Pfützner A, *et al.* 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* 2005; 7, 478-486.

## For additional information and product support please contact:

Invitron Limited

Wyastone Business Park, Wyastone Leys, Monmouth NP25 3SR, UK

Tel: +44 (0)1600 891536

Fax: +44 (0)1600 891537

info@invitron.com

www.invitron.com

## *Français*

### Kit de la Proinsuline Intacte Invitron

#### Usage prévu

Le dosage de la proinsuline intacte Invitron est un dosage immunologique destiné à la mesure quantitative de la proinsuline intacte sur des échantillons de sujets atteints d'un diabète de type 2.

#### Résumé et explications

La proinsuline est une molécule précurseur de l'insuline, synthétisée par les cellules  $\beta$  du pancréas. Dans les conditions normales, pratiquement toute la proinsuline est clivée en résidus de 32-33 et 65-66 acides aminés pour produire l'insuline lors de la formation des granules de sécrétion. Une partie de la proinsuline non modifiée est libérée dans la circulation, bien qu'elle soit supposée n'avoir aucune activité biologique ou qu'une faible activité biologique. De fortes concentrations de proinsuline circulante peuvent se voir au cours des syndromes de résistance à l'insuline, comme ceux observés chez les diabétiques de type 2 ou chez les patients porteurs d'un insulinome. Dans de telles situations, lorsque la proinsuline est recherchée et dosée en même temps qu'un dosage hautement spécifique de l'insuline, elle peut apporter des informations très utiles sur les modifications de la fabrication de l'insuline.

#### Principes

Le dosage de la proinsuline intacte Invitron est un dosage immunologique en deux étapes, recourant à une phase solide d'anticorps spécifiques immobilisés dans des puits de microtitration et à un anticorps soluble marqué par un ester d'acridinium chimiluminescent. L'échantillon est incubé dans le puits de microtitration en même temps qu'un tampon, et après une étape de lavage la solution d'anticorps marqué est ajoutée. Une seconde incubation est suivie par une autre étape de lavage pour retirer l'anticorps marqué non lié avant la mesure. L'anticorps marqué luminescent lié est quantifié grâce à un luminomètre pour plaques de microtitration, capable de recevoir l'addition de réactifs *in situ*. La réaction de luminescence est rapide, de type flash (terminée pour > 95 % en 1 seconde); elle permet que la plaque soit lue dans sa totalité en approximativement 5 minutes.

## Matériels fournis

- Plaque revêtue de microtitration (a)  
(5 x 96 puits) sont revêtus d'un anticorps monoclonal spécifique. La plaque est enfermée à l'intérieur d'un étui en papier en aluminium avec un siccatif qui absorbe toute humidité.
- Concentré d'anticorps marqué (b)  
(1 x 5,5 ml) anticorps marqué chimiluminescent dans une matrice protéique comportant un conservateur et de l'azide de sodium à 0,05%.
- Diluant de l'anticorps marqué (c)  
(5 x 14,1ml) prêt à l'emploi pour diluer l'anticorps marqué à sa concentration efficace. Une matrice protéique comportant un conservateur et de l'azide de sodium à 0,05 %.
- Standards (d) - (h)  
(5 x 1 ml lyophilisés) 5 concentrations – (habituellement) 0,0 - 1,5 - 5,0 - 25,0 - 110 pmol/l – Proinsuline intacte recombinante dans une matrice tamponnée, lyophilisée et scellée sous vide pour assurer la stabilité. Voir l'étiquette de chaque lot de trousse pour connaître les concentrations réelles. **Les standards sont calibrés par rapport au 1<sup>er</sup> standard international de la proinsuline de l'OMS (IRP 84/611).**
- Tampon des échantillons (i)  
( 5x 12ml) prêt à l'emploi pour la dilution des échantillons. Matrice protéique contenant des conservateurs et de l'azide de sodium à 0,05%.
- Concentré de tampon de lavage ( IV1-005)  
(1 x 50 ml) solution de tampon phosphate contenant un détergent et un conservateur.
- Systèmes de fermeture hermétique pour plaques – 10 par t rousse.
- Notice du produit.

## Matériels nécessaires, mais non fournis

- Réactifs de détection. Invitron n° IV1-001.
- Eau déminéralisée
- Plaques non revêtues
- Luminomètre pour plaque de microtitration capable d'injections directes et de mesures de cinétiques flashes.
- Micropipettes de précision calibrées à embouts jetables.

## Avertissements et précautions

- Réservé au diagnostic *in-vitro*. Uniquement pour un usage professionnel.
- Pour des informations sur les substances dangereuses incluses dans la trousse, se reporter aux fiches de renseignements sur la sécurité du matériel.
- Ne pas fumer, manger, boire ou s'appliquer des cosmétiques dans les zones où les échantillons ou les réactifs des trousse sont manipulés.
- Porter des gants jetables en latex et des vêtements de protection appropriés lors de la manipulation des échantillons et des réactifs. Une contamination microbienne des réactifs ou des échantillons peut donner de faux résultats.
- Les manipulations se feront conformément aux procédures définies par les directives ou la réglementation en vigueur pour la sécurité concernant les risques biologiques.
- Ne pas utiliser les réactifs au-delà des dates d'expiration figurant sur les étiquettes des trousse.
- Une fois les composants ouverts ou reconstitués, ils peuvent être utilisés pendant une période de deux semaines pourvu qu'ils soient conservés à 2-8 °C.
- Les résultats optimaux d'analyse ne sont obtenus que si des pipettes calibrées et un luminomètre sont utilisés.
- Ne pas mélanger ni utiliser en même temps des composants provenant de trousse dont les numéros de lot sont différents.
- Cette trousse ne contient aucun produit dérivé d'un matériau humain.

## Préparation, stockage & stabilité des réactifs

Lorsqu'ils sont conservés entre 2 et 8 °C, les réactifs non ouverts conservent leur réactivité jusqu'à la date d'expiration. Ne pas utiliser les réactifs au-delà de cette date.

Les réactifs ouverts doivent être conservés à 2-8 °C. Les puits de microtitration doivent être conservés à 2-8 °C. Une fois que l'étui en aluminium est ouvert, il faut veiller à bien le refermer. Les trousse ouvertes conservent leur réactivité pendant deux mois si elles sont stockées comme indiqué ci-dessus. Les réactifs reconstitués ou dilués restent stables pendant deux semaines s'ils sont conservés à 2-8 °C.

### **Standards**

Reconstituer chacun des standards en ajoutant 1 ml d'eau déminéralisée. Laisser reposer ces standards pendant 5 minutes, puis les mélanger doucement pour s'assurer que toutes les phases solides sont dissoutes. Une fois reconstitués, les standards ont une stabilité de deux (2) semaines lorsqu'ils sont conservés à 2-8 °C.

### **Concentré d'anticorps marqué**

Déposer avec une pipette 900 µl du concentré d'anticorps marqué dans la bouteille de diluant de l'anticorps marqué, et mélanger soigneusement. Une fois dilué, l'anticorps marqué est stable pendant deux (2) semaines lorsqu'il est conservé à 2-8 °C.

### **Tampon de lavage**

Porter le tampon de lavage à sa concentration efficace en diluant 1 partie du concentré du tampon de lavage dans 29 parties d'eau déminéralisée.

### **Réglage du luminomètre**

Le luminomètre pour plaques de microtitration doit être adapté à deux injecteurs, et il est important de vérifier que l'instrument est capable de mesurer des cinétiques de type "flash". Le protocole de mesure doit s'exécuter comme suit :

1. Régler l'injecteur 1 pour qu'il délivre 100µl du réactif de détection 1
2. Régler l'injecteur 2 pour qu'il délivre 100µl du réactif de détection 2
3. Prévoir un délai de 2 secondes entre l'injection 1 et l'injection 2.
4. La lumière de mesure doit commencer au moment même de la seconde injection (il n'y a donc aucun délai entre l'injection 2 et la mesure).
5. La durée de la mesure est de 1 seconde.

### **Recueil des échantillons et conservation**

Du plasma hépariné ou du plasma sur EDTA peut être utilisé pour les dosages. Ne pas utiliser d'échantillons fortement hémolysés.

#### **Recueil des échantillons**

**Plasma** : le sang total sera recueilli dans des tubes contenant comme anticoagulant, de l'EDTA ou de l'héparine, puis après son recueil ce sang total sera immédiatement centrifugé.

#### **Conservation des échantillons**

Les tubes échantillons seront bouchonnés et pourront être conservés jusqu'à 24 heures à 2-8 °C avant d'être dosés. Les échantillons qui devront être conservés plus longtemps seront congelés, une fois seulement, à -20 °C avant dosage. Les échantillons décongelés devront être agités et renversés plusieurs fois avant le dosage.

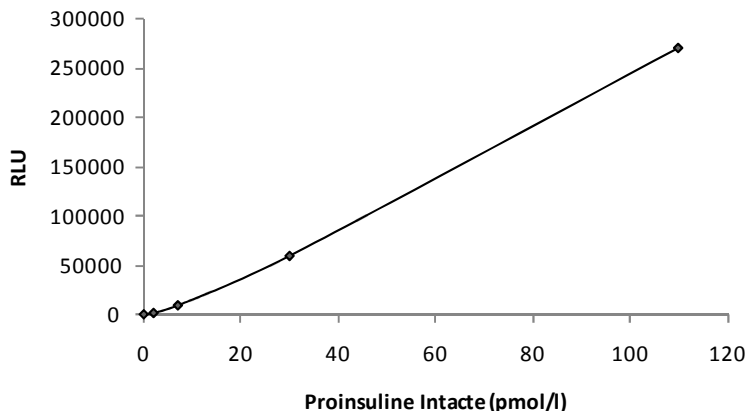
## Procédure de test

1. Amener tous les composants de la trousse et les échantillons à la température de la pièce avant utilisation.
2. Assembler le nombre voulu de plaques revêtues dans leur support. Toute plaque qui n'est pas utilisée immédiatement sera conservée dans une poche en polyéthylène hermétiquement fermée et contenant un siccatif de gel de silicate. S'assurer de remplir tous les espaces vides restant sur le support de plaques par des plaques non revêtues pour permettre un transfert uniforme de chaleur durant l'incubation.
3. Avec une pipette, déposer 50 µl de tampon d'échantillon dans chaque puits.
4. Déposer 50 µl de chacun des standards et échantillons dans leurs puits respectifs. Les standards doivent être dosés en double.
5. Fermer le système hermétique des plaques et incuber pendant 2 heures à 37 °C.
6. Retirer le système hermétique des plaques et procéder à 3 cycles de lavage avec le tampon phosphate à sa concentration efficace (300 µl pour chaque cycle) en utilisant une machine à laver automatique.
7. Déposer 100 µl de la solution d'anticorps marqué dans chaque puits.
8. Fermer le système hermétique des plaques et incuber 1 heure de plus à 37 °C.
9. Retirer le système hermétique et procéder à 3 cycles de lavage avec le tampon à sa concentration efficace en utilisant une machine à laver automatique.
10. Dans un délai de 15 minutes, mesurer l'émission lumineuse de chaque puits dans le luminomètre à plaque.

## Courbe standard type

Cette courbe ne figure ici que dans un but d'illustration, et ne doit pas être utilisée pour le calcul de résultats.

RLU = Relative Light Units (unités relatives de lumière).



## Calcul des résultats

Les résultats doivent être calculés automatiquement en utilisant l'ajustement d'une courbe du 3<sup>ème</sup> degré. D'autres fonctions de régression des données donneraient des résultats légèrement différents. La concentration des échantillons peut être lue directement à partir de la courbe standard. Les échantillons dont les concentrations sont plus élevées que le standard le plus élevé, seront dilués. Dans le calcul des concentrations, le facteur de dilution doit être pris en compte.

## **Valeurs attendues**

Il est fortement recommandé que chaque laboratoire détermine ses propres valeurs normales et anormales. Des dosages de la proinsuline intacte ont été réalisés avec la trousse Invitron chez des hommes et des femmes déjà étiquetés diabétiques de type 2 et traités par des antidiabétiques oraux (1-3). Des échantillons de patients ayant un diabète de type 2 et sous médication orale ou régime, ont été recueillis dans 149 sites participant à l'étude IRIS-II. Au total, 2.146 hommes et 2.124 femmes atteints d'un diabète de type 2, sans traitement par insuline, ont participé à l'étude. Dans une étude complémentaire, 10 groupes de 50 patients, chacun avec des scores progressifs dans le cadre de l'évaluation de leur modèle d'homéostasie HOMA (*homeostasis model assessment*), ont été choisis au hasard au sein d'une cohorte de 4.265 sujets, afin d'explorer la proinsuline intacte et l'adiponectine parmi un large éventail de résistances à l'insuline. Une autre étude a évalué 48 patients atteints d'un diabète de type 2 et sous traitement antidiabétique oral. Vingt femmes et 28 hommes, âgés de 60 ( $\pm$  9 ans), ont été étudiés par un test de la tolérance au glucose intraveineux. Les déterminations des

valeurs à jeun de la proinsuline intacte, de l'insuline, de la résistine, de l'adiponectine et du glucose ont été effectuées. Les résultats de ces études montrent qu'une concentration à jeun de proinsuline  $\geq 10$  pmol/l permet de prédire avec des spécificités et sensibilités très élevées l'existence d'une résistance à l'insuline chez les patients ayant un diabète sucré de type 2. Le taux de proinsuline à jeun chez les sujets normaux étaient  $< 10$  pmol/l. Sur la base de ces études, une concentration plasmatique à jeun  $< 10$  pmol/l est considérée normale, alors qu'une concentration  $\geq 10$  pmol/l suggère une résistance à l'insuline.

## Contrôle de la qualité

L'utilisation d'échantillons de contrôle est conseillée pour assurer la validité des résultats au jour le jour. Il convient d'utiliser des contrôles ayant des concentrations normales et pathologiques. Il est également recommandé d'adhérer à un programme national ou international d'évaluation de la qualité afin de s'assurer de l'exactitude des résultats. Il faut recourir à des méthodes statistiques appropriées pour analyser les valeurs des contrôles et les tendances. Si les résultats des contrôles ne coïncident pas avec les intervalles de précision établis, les résultats des patients devront être considérés comme invalides. Dans ce cas, il faut vérifier les étapes techniques suivantes : les instruments de pipetage et de chronométrage, le luminomètre, les dates d'expiration des réactifs, les conditions de stockage et d'incubation, les méthodes d'aspiration et de lavage. Après avoir vérifié les manipulations et instruments énoncés sans avoir relevé d'erreurs, contacter directement votre distributeur.

## Limites

- Les résultats obtenus par ce dosage ne sont que des aides au diagnostic. Comme pour tous les autres tests sérologiques, l'interprétation des résultats doit tenir compte des signes cliniques, des antécédents et des autres résultats cliniques et de laboratoire.
- Des résultats optimaux ne peuvent être obtenus que si les directives du dosage sont strictement respectées.
- N'utiliser que du plasma frais ou des échantillons congelés et décongelés pas plus de deux fois. Les échantillons incorrectement conservés ou qui ont subis plusieurs cycles de congélation, peuvent donner de faux résultats.
- Pour être reproductibles, les résultats dépendent d'un pipetage rigoureux, du respect des temps et des températures d'incubation, ainsi que du mélange soigneux de toutes les solutions préparées.
- Lors des rinçages, s'assurer que tous les puits sont remplis de façon homogène avec la solution de lavage, et qu'il n'y a pas de résidus dans les puits.
- Les instructions d'utilisation de luminomètres appropriés doivent être respectées. S'assurer que les protocoles de mesure installés sur les instruments sont corrects.

## Substances interférentes

Les interférences ont été étudiées conformément aux recommandations du CLSI (CLSI EP7-A2). Pour étudier l'effet de la lipidémie, des pools tests ont été préparés en surchargeant des échantillons de plasma avec une émulsion commerciale de lipides (Intralipid Sigma). Les échantillons tests permettant d'étudier l'effet de l'hémolyse ont été obtenus par choc osmotique. Des échantillons ictériques ont été préparés en surchargeant des échantillons de plasma avec de la bilirubine commerciale (Sigma). Aucun effet de la lipidémie n'a été observé jusqu'à un index lipidémique de 975. L'interférence due à l'hémolyse n'est pas apparente jusqu'à un index hémolytique atteignant 467. La bilirubine ne provoque pas d'interférence apparente jusqu'à un index ictérique de 1065.

## Caractéristiques des performances

### **Précision inter-séries**

Une étude a été réalisée en utilisant 3 pools de plasma testés en double dans 5 séries séparées, avec les résultats qui suivent.

Proinsuline Intacte (pmol/l)	CV%	n
3.38	2.61	5
27.6	4.47	5
57.2	3.57	5

### **Récupération**

Cinq échantillons de plasma contenant de faibles concentrations de proinsuline intacte endogène ont été surchargés avec trois concentrations de proinsuline recombinante. Les récupérations apparaissent sous forme de pourcentages du résultat attendu pour des échantillons se situant dans l'intervalle de 9 à 22 pmol/l.

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

La récupération moyenne de la surcharge ressort à 102,4 %.

### Linéarité

Quatre échantillons de patients contenant des concentrations élevées de proinsuline ont été dilués dans du tampon pour échantillon. Le tableau suivant montre les concentrations mesurées de proinsuline intacte dans les échantillons dilués et non dilués.

Proinsuline (pmol/l)				
Dilution	échantillon	échantillon	échantillon	échantillon
Factor	1	2	3	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

### Sensibilité

La sensibilité a été estimée avec deux écarts types de part et d'autre de la moyenne de 20 répliques du standard zéro. Calculée de cette façon, la sensibilité analytique du dosage de la proinsuline intacte ressort à 0,02 pmol/l. L'intervalle dynamique du dosage est de 0,02 à 100 pmol/l.

### L'effet crochet à fortes doses

Du fait de l'architecture du dosage, qui recourt à des incubations séparées pour la phase solide et les anticorps marqués, on ne constate aucun effet crochet aux fortes doses.

### Réactivité croisée

Les réactivités croisées de protéines apparentées ont été explorées aux concentrations de 100 pmol/l. Les résultats sont exprimés sous forme de pourcentages de réactivité d'une concentration identique de proinsuline intacte.

Peptide	CR (%)
Intact proinsulin	100
Insulin	0.0
C-peptide	0.0
32-33 split proinsulin	5.6
Des 31-32 split proinsulin	1.4
65-66 split proinsulin	37
Des 64-65 split proinsulin	63

## Références

Pfützner A, *et al.* Fasting intact proinsulin is a highly specific predictor of insulin resistance in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2004; 27, 682-687.

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

Pfützner A, *et al.* 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* 2005; 7, 478-486.

### **Pour toute assistance technique/soutien supplémentaire contacter:**

Invitron Limited

Wyastone Business Park, Wyastone Leys, Monmouth, NP25 3SR, UK

Tel: +44 (0)1600 891536

Fax: +44 (0)1600 891537

info@invitron.com

www.invitron.com

## Deutsch

### Invitron Intaktes Proinsulin testsystem

#### Anwendungsbereich

Der Proinsulin-Assay von Invitron ist ein immunometrischer Assay zur quantitativen Bestimmung von intaktem Proinsulin in humanen Plasmaproben. Die Bestimmung von Proinsulin wird bei der Diagnose und Behandlung von Patienten mit Typ-2-Diabetes angewendet.

#### Zusammenfassung und Erläuterung des Testverfahrens

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.

#### Testprinzip

Der Proinsulin-Assay von Invitron ist ein zweiseitiger Immunoassay, bei dem ein spezifischer Festphasenantikörper eingesetzt wird, der auf dem Boden einer Mikrotiterplatte immobilisiert ist, sowie ein löslicher Antikörper, der mit einem chemilumineszierenden Acridiniumester 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 folgt ein weiterer Waschschrift zur Entfernung von ungebundenem markierten Antikörper vor der Messung. Das gebundene Lumineszenzsignal wird durch ein Mikrotiterplatten-Luminometer quantifiziert, das für die Zugabe von Reagenzien in situ geeignet ist. Die Lumineszenzreaktion ist eine Art schneller Lichtblitz (innerhalb von 1 s zu > 95% abgeschlossen). Dadurch kann die gesamte Platte in ca. 5 Minuten gelesen werden.

## Mitgeliefertes Material

- Beschichtete Mikrotiterplatte (a)  
(5 x 96 Vertiefungen) mit Stripwells, beschichtet mit einem spezifischen monoklonalen Antikörper. Die Platte ist in einem Folienbeutel versiegelt, der ein Trocknungsmittel enthält, um eine wasserfreie Atmosphäre zu erhalten.
- Markierter Antikörper, Konzentrat (b)  
(1 x 5,5 ml) Chemilumineszenzmarkierter Antikörper in einer Proteinmatrix. Enthält Konservierungsstoffe und 0,05% Natriumazid.
- Verdünnungsmittel für markierten Antikörper (c)  
(5 x 14,1 ml) Gebrauchsfertige Lösung zur Verdünnung des markierten Antikörpers auf die Einsatzkonzentration. Enthält eine Proteinmatrix, Konservierungsstoffe und 0,05% Natriumazid.
- Proteinstandards (d) - (h)  
(5 x 1 ml lyophilisiert) In 5 Konzentrationen – typischerweise 0,0; 1,5; 5,0; 25,0; 110 pmol/l – Rekombinantes intaktes Proinsulin in einer Puffermatrix, zur längeren Haltbarkeit lyophilisiert und im Vakuum versiegelt. Die tatsächlichen Konzentrationen für die jeweilige Charge des Testkits sind auf dem Etikett angegeben. **Die Proteinstandards sind gegen den 1. internationalen WHO-Standard für Proinsulin (IRP 84/611) kalibriert.**
- Probenpuffer (i)  
(5 x 12 ml) Gebrauchsfertige Lösung zur Probenverdünnung. Enthält eine Proteinmatrix, Konservierungsstoffe und 0,05% Natriumazid.
- Waschpuffer, Konzentrat (IV1-005)  
(1 x 50 ml) Phosphatgepufferte Saline (PBS). Enthält ein Detergens und Konservierungsstoffe.
- Plattenversiegelung – je 10 Stück
- Produktbeilage

## Benötigte Materialien, die nicht im Lieferumfang

- enthalten sind
- Detektionsreagenzien. Invitron-Katalognr. IV1-001
- Deionisiertes Wasser
- Unbeschichtete Mikrotiterstreifen
- Mikrotiterplatten-Luminometer geeignet für die direkte Injektion und zur Messung von Blitzkinetik-Reaktionen
- Kalibrierte Präzisionsmikropipetten mit Einwegspitzen

## Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

- Nur für die Anwendung in der In-vitro-Diagnostik. Nur für die professionelle Anwendung.
- Angaben zu in dem Testkit enthaltenen Gefahrstoffen entnehmen Sie bitte den Sicherheitsdatenblättern.
- In Bereichen, in denen Proben bzw. Reagenzien gehandhabt werden, darf nicht geraucht, gegessen oder getrunken und kein Make-up aufgetragen werden.
- Während der Handhabung von Proben und Reagenzien sind Einweg-Latexhandschuhe und geeignete Schutzkleidung zu tragen. Die mikrobielle Kontamination von Reagenzien oder Proben kann zu einer Verfälschung der Testergebnisse führen.
- Die Handhabung sollte in Übereinstimmung mit den Verfahren erfolgen, die in den entsprechenden nationalen Richtlinien oder Vorschriften für biologische Sicherheit festgelegt sind.
- Reagenzien nicht nach Ablauf des auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum verwenden.
- Bereits geöffnete oder rekonstituierte Komponenten des Testkits können innerhalb eines Zeitraums von zwei Wochen verwendet werden, wenn sie bei 2–8 °C gelagert werden.
- Optimale Testergebnisse können nur bei Verwendung von kalibrierten Pipetten und Luminometern erzielt werden.
- Bitte nicht Komponenten aus Testkits verschiedener Packungsladungen mischen oder kombinieren.
- Dieses Testkit enthält kein Humanmaterial.

## Vorbereitung, Lagerung und Haltbarkeit der Reagenzien

Bei Lagerung bei 2–8 °C behalten ungeöffnete Reagenzien ihre Aktivität 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. Bei sachgerechter Lagerung wie oben beschrieben behalten geöffnete Testkits ihre Aktivität für zwei Monate. Rekonstituierte bzw. verdünnte Reagenzien sind bei Lagerung bei 2–8 °C zwei Wochen haltbar.

### **Proteinstandards**

Jeder der Proteinstandards ist durch die Zugabe von 1 ml deionisiertem Wasser zu rekonstituieren. Die rekonstituierten Standards 5 Minuten stehen lassen, dann sanft mischen, um zu gewährleisten, dass sich alle Feststoffe lösen. Die rekonstituierten Standards sind bei 2–8 °C zwei (2) Wochen haltbar.

### **Markierter Antikörper, Konzentrat**

Zur Verdünnung des markierten Antikörpers 900 µl des Antikörperkonzentrats in ein Fläschchen Antikörperverdünnungsmittel pipettieren und gründlich mischen. Der verdünnte markierte Antikörper ist bei 2–8 °C zwei (2) Wochen haltbar.

### **Waschpuffer**

Zur Herstellung von einfach konzentriertem Waschpuffer 1 Teil Waschpufferkonzentrat mit 29 Teilen deionisiertem Wasser verdünnen.

### **Einstellung des Luminometers**

Das Mikrotiterplatten-Luminometer muss mit 2 Injektoren ausgestattet sein. Es ist wichtig, sicherzustellen, dass das Gerät zur Messung von Reaktionen mit „Blitzkinetik“ geeignet ist. Für das Messprotokoll sollten die folgenden Einstellungen vorgenommen werden:

1. Injektor 1 auf die Abgabe von 100 µl Detektionsreagens 1 einstellen.
2. Injektor 2 auf die Abgabe von 100 µl Detektionsreagens 2 einstellen.
3. Wählen Sie eine Verzögerung von 2 Sekunden zwischen der 1. und der 2. Injektion.
4. Die Lichtmessung muss zum Zeitpunkt der zweiten Injektion beginnen (d. h. es sollte keine Verzögerung zwischen der 2. Injektion und dem Beginn der Messung geben).
5. Die Messdauer beträgt 1 Sekunde.

### **Probenentnahme und -lagerung**

Für diesen Assay kann 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, und unmittelbar nach der Entnahme zentrifugiert werden.

#### **Probenlagerung**

Proben sollten 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.

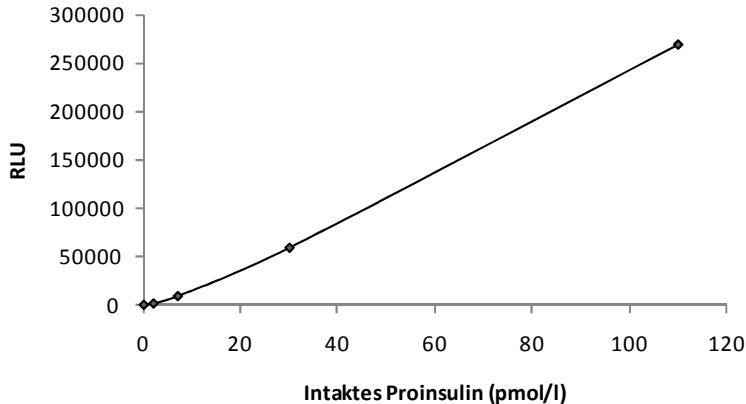
## Testverfahren

1. Sämtliche Komponenten des Testkits sowie die Proben vor der Verwendung auf Raumtemperatur bringen.
2. Die benötigte Anzahl beschichteter Mikrotiterstreifen in den Plattenhalter einsetzen. Nicht verwendete Streifen können in einem dicht verschlossenen Plastikbeutel mit Silikagel als Trocknungsmittel gelagert werden. Unbesetzt gebliebene Plätze im Plattenhalter müssen mit unbeschichteten Streifen besetzt werden, um eine gleichmäßige Wärmeübertragung während der Inkubation zu gewährleisten.
3. In jede Vertiefung 50 µl Probenpuffer pipettieren.
4. Jeweils 50 µl Proteinstandard oder Probe in die entsprechenden Vertiefungen pipettieren. Proteinstandards sollten in Duplikaten gemessen werden.
5. Die Plattenversiegelung anbringen und für 2 Stunden bei 37 °C inkubieren.
6. Die Plattenversiegelung entfernen und mit einem Mikrotiterplatten-Waschautomat 3 Waschgänge mit einfach konzentriertem Waschpuffer durchführen (300 µl pro Waschgang).
7. In jede Vertiefung 100 µl der Lösung mit markiertem Antikörper pipettieren.
8. Die Plattenversiegelung anbringen und für eine weitere Stunde bei 37 °C inkubieren.
9. Die Plattenversiegelung entfernen und mit einem Mikrotiterplatten-Waschautomat 3 Waschgänge mit einfach konzentriertem Waschpuffer durchführen.
10. Innerhalb von 15 Minuten das Lichtsignal aus jeder Vertiefung mit einem Mikrotiterplatten-Luminometer messen.

## Typische Standardkurve

Hinweis: Diese Kurve dient ausschließlich der Illustration und darf nicht zur Berechnung der Ergebnisse verwendet werden.

RLU = Relative Lichteinheiten (Relative Light Units)



## Berechnung der Ergebnisse

Die Ergebnisse können unter Verwendung einer Kurvenanpassung durch kubische Splines automatisch berechnet werden. Andere Datenreduktionsfunktionen können zu leicht abweichenden Ergebnissen führen. Die Konzentration der Proben kann aus dieser Standardkurve direkt abgelesen werden. Proben, die höher konzentriert sind als der Standard mit der höchsten Konzentration, sollten weiter verdünnt werden. Bei der Berechnung der Konzentration dieser Proben muss der Verdünnungsfaktor berücksichtigt werden.

## **Erwartete Werte**

Es wird dringend empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen Referenzwerte für den normalen und den pathologischen Bereich bestimmt. Mit dem Proinsulin-Assay von Invitron 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  $\geq 10$  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. Aufgrund dieser Studien wird ein Nüchternwert im Plasma unterhalb von 10 pmol/l als normal betrachtet, während eine Konzentration von  $\geq 10$  pmol/l auf Insulinresistenz hinweist.

## Qualitätskontrolle

Es wird die Verwendung von Kontrollproben empfohlen, um die laufende Validität der Ergebnisse zu gewährleisten. Es sollten Kontrollproben mit normalem und solche mit pathologischem Proinsulingehalt verwendet werden. Es wird außerdem empfohlen, nationale oder internationale Qualitätsbewertungsprogramme zu nutzen, um die Genauigkeit der Ergebnisse zu gewährleisten. Zur Analyse von Kontrollwerten und Tendenzen sollten geeignete statistische Methoden angewendet werden. Wenn die Testergebnisse für das Kontrollmaterial nicht in dem als akzeptabel etablierten Bereich liegen, sind die Ergebnisse für Patientenproben als nicht auswertbar zu betrachten. In diesem Fall sollten die folgenden technischen Parameter überprüft werden: Pipettiergeräte und Stoppuhren, Luminometer, Verfallsdatum der Reagenzien, Lagerungs- und Inkubationsbedingungen, Absaug- und Waschverfahren. Sollten Sie bei der Überprüfung der genannten Punkte keinen Fehler finden, setzen Sie sich bitte direkt mit Ihrem Händler in Verbindung.

## 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 Spülvorgangs ist darauf zu achten, dass alle Vertiefungen gleichmäßig mit Waschpuffer gefüllt sind und keine Rückstände in den Vertiefungen zurückbleiben.
- Beachten Sie die Hinweise zur Verwendung geeigneter Luminometer. Stellen Sie sicher, dass auf dem Gerät das richtige Messprotokoll installiert ist.

## 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.

## Leistungsmerkmale

### **Inter-Assay-Präzision**

Eine Untersuchung, die mit 3 Plasma-Pools durchgeführt wurde, die in 5 getrennten Assays jeweils in Duplikaten getestet wurden, lieferte die folgenden 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.

Proben	1	2	3	4	5
5%	102.4	107.5	100.4	98.8	97.6
10%	105.1	107.1	102.8	101.9	96.1
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	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 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.

Peptide	Kreuzreaktivität (%)
Intact proinsulin	100
Insulin	0.0
C-peptide	0.0
32-33 split proinsulin	5.6
Des 31-32 split proinsulin	1.4
65-66 split proinsulin	37
Des 64-65 split proinsulin	63

## Literatur

Pfützner A, *et al.* Fasting intact proinsulin is a highly specific predictor of insulin resistance in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2004; 27, 682-687.

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

Pfützner A, *et al.* 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* 2005; 7, 478-486.

### **Für weitere Unterstützung wenden Sie sich bitte an:**

Invitron Limited

Wyastone Business Park, Wyastone Leys, Monmouth NP25 3SR, UK

Tel: +44 (0)1600 891536

Fax: +44 (0)1600 891537

[info@invitron.com](mailto:info@invitron.com)

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



Invitron Limited  
Wyastone Business Park  
Wyastone Leys  
Monmouth NP25 3SR  
United Kingdom

Tel: +44 (0)1600 891536  
Fax: +44 (0)1600 891537  
Email: [info@invitron.com](mailto:info@invitron.com)  
[www.invitron.com](http://www.invitron.com)