

ZenTech



# ELIZEN Proinsulin

DEUTSCH (de)

ENGLISH (en)

FRANÇAIS (fr)

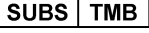
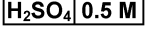
ESPAÑOL (es)

**ZenTech s.a.**

Liège Science Park  
Avenue du Pré-Aily 10,  
4031 ANGLEUR, Belgium  
Tel. : + 32-(0)4-361.42.32  
Fax : + 32-(0)4-367.00.63

[info@zentech.be](mailto:info@zentech.be)  
[www.zentech.be](http://www.zentech.be)

| ISO15223                                                                          | SYMBOLE FÜR MEDIZINPRODUKTE          | MEDICAL DEVICES SYMBOL         | SYMBLES APPLIQUES AUX DISPOSITIFS MEDICAUX | SÍMBOLOS PARA APARATOS DE USO EN MEDICINA              |
|-----------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
|  | Limitierung der Lagertemperatur      | STORAGE TEMPERATURE LIMITATION | LIMITES DE TEMPERATURES                    | LIMITES DE TEMPERATURA DE ALMACENAMIENTO               |
|  | Chargencode                          | BATCH CODE                     | NUMERO DE LOT                              | CÓDIGO DE LOTE                                         |
|  | Verwendbar bis                       | USE BY                         | DATE D'EXPIRATION                          | CONSUMIR ANTES DE                                      |
|  | Das Handbuch zu Rate ziehen          | CONSULT OPERATING INSTRUCTIONS | LIRE LES INSTRUCTIONS                      | CONSULTAR LAS INSTRUCCIONES DE MANEJO O FUNCIONAMIENTO |
|  | Für in-vitro-diagnostische Anwendung | IN VITRO DIAGNOSTIC DEVICE     | IN VITRO DIAGNOSTIC                        | DISPOSITIVO DE DIAGNÓSTICO IN VITRO                    |
|  | Hergestellt von                      | MANUFACTURED BY                | FABRIQUE PAR                               | FABRICADO POR                                          |
|  | Katalog Nr.                          | CATALOGUE NUMBER               | REFERENCE                                  | NÚMERO DE CATÁLOGO                                     |

|                                                                                     | SYMBOLE (empfohlen von der EDMA )    | SYMBOLS (EDMA recommendations)          | SYMBLES (recommandations EDMA)       | SÍMBOLOS (RECOMENDACIONES DE LA EDMA)          |
|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------------------|--------------------------------------|------------------------------------------------|
|    | Anzahl der Bestimmungen (96)         | number of determinations (96)           | Nombre de déterminations (96)        | Número de determinaciones                      |
|    | Kalibratoren                         | Calibrators                             | Calibrateurs                         | Calibradores                                   |
|   | Kontollserum                         | Control serum                           | Sérum de contrôle                    | Suero de control                               |
|  | Mikrotiterplatte                     | Microtiterplate                         | Plaque de microtitration             | Placa de microvaloración                       |
|  | Blockierungspuffer                   | Blocking buffer                         | Tampon de blocage                    | Tampón de bloqueo                              |
|  | HRP- Konjugat                        | HRP Conjugate                           | Conjugué HRP                         | HRP conjugado                                  |
|  | Chromogenes Substrat                 | Chromogenic substrate                   | Substrat chromogène                  | Sustrato cromogénico                           |
|  | Waschlösung zum 10-maligen verdünnen | Washing solution to be diluted ten-fold | Solution de lavage à diluer dix fois | Solución de lavado que hay que diluir 10 veces |
|  | Stoplösung                           | Stop solution                           | Solution d'arrêt                     | Solución de parada                             |

# DEUTSCH

## IMMUNOENZYMOMETRISCHER ASSAY ZUR QUANTITATIVEN BESTIMMUNG VON PROINSULIN IN HUMANEM SERUM UND PLASMA.

E-BX-96 - 96 Assays

### NUR FÜR ZWECKE DER IN-VITRO-DIAGNOSE BESTIMMT

#### 1. KLINISCHE ANWENDUNG

Proinsulin (PI), ein Polypeptid von 9390 MW (86 Aminosäuren), wird synthetisiert in den  $\beta$ -Zellen der Langerhans-Inseln im Pankreas (1). Die Sequenz von Proinsulin ist hoch konserviert bei Säugetierarten und ist homolog mit IGF-1 und IGF-2 (2). Dieses Protein wird in C-Peptide und Insulinformen gespalten (3). Beide werden in Mengen gleicher Molarität ins Blut abgegeben. Beim Durchschnittsindividuum ist das Proinsulin in der Zirkulation in sehr geringen Mengen vorhanden (typische Basiswerte 2-6 pmol/L). Die Höhe des Proinsulins kann eine Widerspiegelung des Zustands der  $\beta$ -Zellen und eine Konsequenz der Fehlfunktion der PI Spaltung und/oder der Sekretion sein (4). Proinsulin-ähnliche Substanzen sind bei bestimmten klinischen Konditionen wie dem Insulinom, dem familiären Hyperinsulinismus und der Erwachsenenenddiabetes erhöht (5, 6, 7, 8).

#### 2. TESTPRINZIP (I)

Der Proinsulin kit ist ein sensitiver „two-site“ sandwich enzyme-linked-immunosorbent Assay. Die Mikrotiterplatten sind mit einem monoklonalen Antikörper (S2), spezifisch für Epitope der C-Peptide/Insulin A Kettenbindung beschichtet. S2 ist in der Lage intaktes PI, des (31,32)-PI und split (32,33)-PI zu binden, aber kein Insulin, C-Peptide oder andere „des“ und „split“ Formen.

Vor Gebrauch wird ein Blockierungspuffer in die reservierten Vertiefungen gegeben. Ein Aliquot des Patientenserums wird danach in die Vertiefungen hinzugefügt und inkubiert. Dann werden die Vertiefungen gewaschen um ungebundene Antikörper und andere Serumkomponenten zu entfernen. Während der zweiten Inkubationszeit wird ein mit einem Anti-Proinsulin Antikörper markiertes Enzym (S53) in den Vertiefungen inkubiert. Dieser Antikörper ist spezifisch für die Epitope der Insulin  $\beta$  /C-Peptid Kettenbindung. S53 ist in der Lage sich an intaktes PI, des (64,65)-PI und split (65,66)-PI anzubinden, aber nicht an Insulin, C-Peptide oder andere „des“ und „split“ Formen. Die Kombination der beiden MAk schafft die Möglichkeit, nur intaktes humanes Proinsulin nachzuweisen. Nach dem Auswaschen einiger ungebundener Enzym-markierter Anti-Proinsulin Antikörper, wird die Enzymaktivität nach dem Hinzufügen eines chromogenes gemessen. Die Intensität der Farbentwicklung ist proportional zur Konzentration des Proinsulins in der Patientenprobe.

(I) Paule Housa et al. "First direct assay for intact human proinsulin". Clinical Chemistry 44:7, 15414-1519 (1998)

#### 3. MITGELIEFERTE MATERIALIEN

- Die Reagenzien reichen für 96 Bestimmungen.
- Lagern sie den Kit bei 2-8 °C.
- Das Verfallsdatum jedes Reagenz befindet sich auf dem Flaschenetikett.

**1. Beschichtete Mikrotiterplatte:** 96 brechbare, mit einem Proinsulin spezifischen Antikörper beschichtete, Vertiefungen. Unbenutzte Vertiefungen können bei 2-8° C in der mitgelieferten Aluminiumverpackung, die sorgfältig verschlossen werden muss, geschützt vor Feuchtigkeit, aufbewahrt werden. Lagern bei 2-8 °C.

**2. Proinsulin 0 Kalibrator :** 1 Fläschchen mit lyophilisierter Kalibrator. Wiederherstellung der Gebrauchslösung mit 3 ml Aqua dest. Blau gefärbt. Nach der Rekonstitution, müssen die Kalibratoren bei -20°C aufbewahrt werden (zwei mögliche Zyklen Gefrieren-Auftauen). Konservierungsmittel: Merthiolate. Lagern lyophilisiert bei 2-8 °C.

**3. Proinsulin 1 - 5 Kalibratoren:** 5 Fläschchen mit lyophilisierter Kalibratoren. Wiederherstellung der Gebrauchslösung mit 1 ml Aqua dest. Blau gefärbt. Nach der Rekonstitution, müssen die Kalibratoren bei -20°C aufbewahrt werden (zwei mögliche Zyklen Gefrieren-Auftauen). Die Soll-Werte entnehmen sie bitte dem Qualitätskontroll-Datenblatt..

**Die Kalibratoren wurden gegen den 1. WHO internationales Bezugsreagens IRR 84/611 kalibriert.**

Konservierungsmittel: Merthiolate

Lagern lyophilisiert bei 2-8 °C.

**4. Kontrollserum:** 2 Fläschchen mit lyophilisierter Probe. *Rekonstitution mit 1 ml a. dest.* Blau kodiert. Nach Rekonstitution wird das Kontrollserum bei -20°C aufbewahrt (max. 2 Einfrier -Auftauzyklen ) Den exakten Wert entnehmen Sie dem beigefügten Datenblatt. Konservierungsmittel:Merthiolat. Aufbewahrung, lyophilisiert bei 2-8°C.

**5. HRP- Konjugat:** 1 Fläschchen ( 11 ml ) mit antihumanem Proinsulin gebunden an Meerrettichperoxidase ( HRPO ). Konservierungsmittel: Neomycin und Merthiolate. Lagern bei 2-8 °C.

**6. Blockierungspuffer:** 1 Fläschchen (1,5 ml) murines IgG in Phosphatpuffer. Gebrauchsfertig. Konservierungsmittel:Merthiolat. Aufbewahrung bei 2-8°C

**7. Waschlösung:** 1 Fläschchen (40 ml) Puffer mit Tween 20. Konservierungsmittel: Streptomycin-Sulfate und Amphotericin. Füllen sie den Inhalt des Fläschchens mit Aqua dest. auf 400 ml (finales Volumen) auf. Bei 4°C bleibt die verdünnte Waschlösung 6 Monaten lang stabil. Lagern bei 2-8 °C.

**8. Chromogenes Substrat:** 2 Fläschchen (13ml) Tetramethylbenzidin in Citrat-Phosphatpuffer und DMSO. Gebrauchsfertig. Lagern bei 2-8 °C.

**9. Stopplösung:** 1 Fläschchen (15 ml) 0,5M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> . Gebrauchsfertig. Lagern bei 2-8 °C.

#### 4. MITGELIEFERTE REAGENZIEN

| REAGENZIEN                    | ANZAHL     | PHYSIKALISCHER ZUSTAND |
|-------------------------------|------------|------------------------|
| Beschichtete Mikrotiterplatte | 96         | gebrauchsfertig        |
| Kalibrator 0                  | 1 x 3 ml   | lyophilisiert          |
| Kalibratoren 1 – 5            | 5 x 1 ml   | lyophilisiert          |
| Kontrollserum                 | 2 x 1 ml   | lyophilisiert          |
| HRP- Konjugat                 | 1 x 11 ml  | gebrauchsfertig        |
| Blockierungspuffer            | 1 x 1,5 ml | gebrauchsfertig        |
| Waschlösung                   | 1 x 40 ml  | 10x konzentriert       |
| Chromogenes Substrat          | 2 x 13 ml  | gebrauchsfertig        |
| Stopplösung                   | 1 x 15 ml  | gebrauchsfertig        |

#### 5. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL

- Justierbare, automatische Mikropipette mit Einmalpipettenspitzen.
- Graduierter Zylinder
- Absaugpumpe oder automatische Wascheinrichtung für Vertiefungen.
- Mikrotiterplatten Spektralphotometer, welches geeignet ist, Absorptionsmessungen innerhalb 0 – 3,0 A und im Intervall von 450nm und 405nm zu messen
- Millimeterpapier
- Orbitalschüttler, einstellbar auf 150 rpm.
- Aqua dest.

## 6. WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßN

**Um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, müssen folgende Regeln eingehalten werden:**

- Verwenden oder mischen sie keine Testkomponenten unterschiedlicher Chargen.
- Verwenden sie keine Reagenzien nach Ablauf des Verfallsdatums.
- Verwenden sie nur völlig saubere Glasutensilien.
- Benutzen sie destilliertes Wasser, dass in geeigneten, sauberen Behältern aufbewahrt werden muss.
- Vermeiden sie jede Kontamination der einzelnen Reagenzien; so müssen für jede Probe und jedes Reagenz Einmalpipettenspitzen verwendet werden.

**Um die Kontamination von Personen und Umgebung zu vermeiden, müssen die folgenden Vorsichtsmaßnahmen beachtet werden.**

- Tragen Sie während der Durchführung des Assays sowie beim Umgang mit potentiell infektiösem Material Einweghandschuhe.
- Nicht mit dem Mund pipettieren.
- Rauchen, Essen und Trinken sie nicht bei der Durchführung des Assays; benutzen sie währenddessen keine Kosmetika.
- Alle Materialien humaner Herkunft zur Herstellung dieses Kits sind negativ auf HBs-Ag, Anti-HIV und Anti-HCV getestet. Da jedoch keine der zur Zeit verfügbaren Testmethoden absolute Gewähr für das Fehlen dieser Viren garantieren kann, müssen alle Proben und Reagenzien als potentiell infektiös betrachtet werden; deshalb muss der Assayabfall dekontaminiert und beseitigt werden in Übereinstimmung mit den etablierten Sicherheitsstandards.
- Vorhandene entzündbare Materialien müssen verbrannt werden; nicht entzündbare Materialien müssen im Autoklaven mindestens 1 Stunde bei 121 °C sterilisiert werden. Flüssigem Abfall muss Natriumhypochlorit zugefügt werden, um eine Endkonzentration von 3% zu erhalten. Diese muss mindestens 30 Min. einwirken. Flüssiger säurehaltiger Abfall muss zunächst mit einer geeigneten Menge an Base neutralisiert werden, bevor er mit Natriumhypochlorit versetzt werden kann.
- Das Chromogen – und Blockingreagenz muss vorsichtig gehandhabt werden. Vermeiden sie den Kontakt mit Haut, Augen und Schleimhäuten. Im Falle eines Unfalls gründlich unter fließendem Wasser ausspülen.
- Vermeiden sie Spritzen und Aerosolbildung. Für den Fall einer Kontamination durch Spritzer reinigen sie sorgfältig mit 3% iger Natriumhypochloritlösung und entsorgen diese Reinigungsflüssigkeit als potentiell infektiösen Abfall.
- Einige Reagenzien enthalten Natriumazid als Konservierungsmittel; um den Aufbau von explosiven Metallaziden in Rohr- und Kupferleitungen zu verhindern, müssen die Reagenzien unter großen Mengen fließenden Wassers entsorgt werden.

## 7. PROBENSAMMLUNG UND VORBEREITUNG

Es können Serum- und Plasma- Proben verwendet werden, wobei zu beachten ist, dass die Ergebnisse bei Serum- Proben etwas niedriger als im Plasma sind.

Hoch lipämische oder hämolytische Proben müssen verworfen werden. Die Proben können bei 2– 8°C 1 Tag aufbewahrt werden; bei längeren Zeiträumen ist es empfehlenswert, die Proben aliquotiert bei – 20°C einzufrieren. Ein wiederholtes Einfrieren oder Auftauen sollte vermieden werden.

Mischen sie vor dem Assay die aufgetauten Proben gründlich und vermeiden sie ein erneutes Einfrieren/Auftauen, da dies einen Verlust der antigenen Epitope bedeuten und zu falschen Ergebnissen führen könnte.

## 8. PIPETTIERSHEMA

| Vertiefungen<br>Reagenz                                                               | Blank  | Kalibratoren | Kontroll<br>Serumen | Proben |
|---------------------------------------------------------------------------------------|--------|--------------|---------------------|--------|
| Blockierungspuffer                                                                    | ---    | 10 µl        | 10 µl               | 10 µl  |
| Kalibratoren (0 - 5)                                                                  | ----   | 100 µl       | ----                | ----   |
| Kontrollserumen                                                                       | ----   | ----         | 100 µl              | ----   |
| Proben                                                                                | ----   | ----         | ----                | 100 µl |
| - Inkubieren: 30 min R.T., Schütteln (150 rpm)<br>- Absaugen und Waschen: 3 X 300 µl. |        |              |                     |        |
| Konjugat                                                                              | -----  | 100 µl       | 100 µl              | 100 µl |
| - Inkubieren: 60 min R.T., Schütteln (150 rpm)<br>- Absaugen und Waschen: 3 X 300 µl. |        |              |                     |        |
| Chromogenes<br>Substrat                                                               | 200 µl | 200 µl       | 200 µl              | 200 µl |
| - Inkubieren: 15 min R.T., Schütteln (150 rpm)                                        |        |              |                     |        |
| Stopplösung                                                                           | 100 µl | 100 µl       | 100 µl              | 100 µl |
| Lesen: 450 nm – 405 nm und 620 nm als Referenz.                                       |        |              |                     |        |

## 9. TESTVERLAUF

- Alle Reagenzien und Proben müssen vor Testbeginn auf Raumtemperatur gebracht werden.
- Mischen sie die Proben durch Umschwenken, bevor sie sie benutzen.
- Die Proben werden nicht verdünnt.

1. Weisen eine Vertiefung der Mikrotiterplatte zu, für den Kalibrator, Kontrollseren und Proben.
2. Pipettieren Sie 10 µl Blockierungspuffer direkt auf den Boden der Vertiefungen.
3. Pipettieren sie 100 µl jedes einzelnen Kalibrator, Kontrollseren und Proben in die dafür vorgesehenen Vertiefungen.
4. Inkubieren sie 30 Minuten bei Raumtempreatur auf einem Orbitalschüttler bei 150 rpm. (Anmerkung. Die Inkubationszeit beginnt nach der letzten Probenzugabe. )
5. Waschen sie die Vertiefungen 3 mal mit 300 µl der verdünnten Waschlösung. Saugen sie die gesamte Flüssigkeit aus den Vertiefungen ab.
6. Geben sie 100 µl des HRP-Konjugates in die Vertiefungen.
7. Inkubieren sie 60 Minuten bei Raumtempreatur auf einem Orbitalschüttler bei 150 rpm.
8. Waschen sie die Vertiefungen 3 mal mit 300 µl verdünnter Waschlösung. Saugen sie die gesamte Flüssigkeit aus den Vertiefungen ab.
9. Pipettieren sie 200 µl der Chromogenes Substrat in die Vertiefungen.
10. Inkubieren sie 15 Minuten bei bei Raumtempreatur auf einem Orbitalschüttler bei 150 rpm, vermeiden sie direkte Lichteinstrahlung. (Anmerkung. Die Inkubationszeit beginnt nach der ersten TMB-Zugabe. )
11. Pipettieren sie je 100 µl des Stopplösung in die Vertiefungen.
12. Lesen sie die Absorption der Vertiefungen ab( 450, 405 und 620 nm (als Referenz). Die Messung muss nach 20 Minuten vom Assayende an fertig sein.

## 10. KALKULATION DER ERGEBNISSE

Um eine bessere Sensitivität zu erzielen verwendet die Methode eine photometrische Messung bei zwei Wellenlängen (450 und 405 nm). Alle Werte, deren OD bei 450 nm den Messbereich des Gerätes überschreiten, müssen mit bei 405 nm gemessen und mit einem Korrektur multipliziert werden, der sich aus dem Verhältnis ziwischen der OD 450 nm und der OD 405 nm errechnet. Um diesen Faktor zu erstellen muss eine Messung bei 405 nm und 450 nm erfolgen.

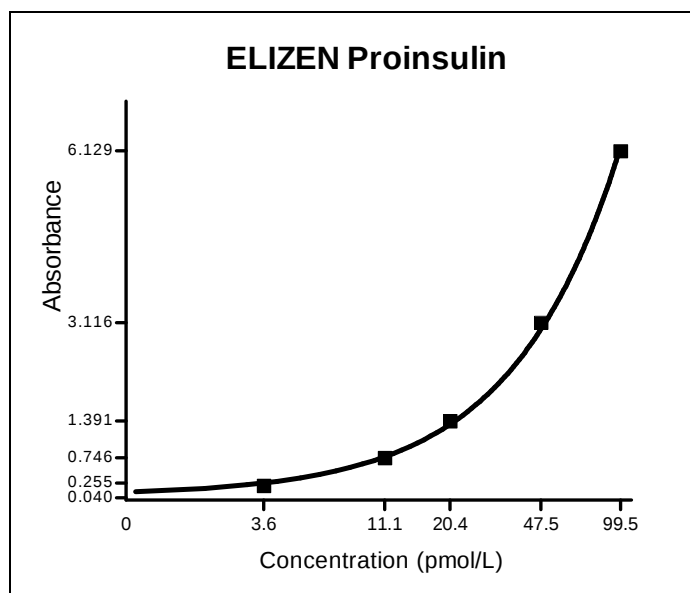
Zeichnen Sie eine Kalibrationskurve auf Millimeterpapier durch Auftragen der Standardkonzentrationen (x-Achse) gegen die Absorption der einzelnen Standards (y-Achse, logit). Die entsprechenden Proinsulin-Konzentrationen in pmol/l werden durch Interpolation der Absorptionen der einzelnen Standards an der Kalibrationskurve erhalten.

## 11. KALKULATIONSBEISPIEL

Die unten aufgeführten Werte müssen als Beispiel angesehen werden und dürfen nicht anstelle experimentell gewonnener Daten benutzt werden.

| Beschreibung    | Konzentration (pmol/l) | D.O   |
|-----------------|------------------------|-------|
| Kalibrator 0    | 0                      | 0,040 |
| Kalibrator 1    | 3,6                    | 0,255 |
| Kalibrator 2    | 11,1                   | 0,746 |
| Kalibrator 3    | 20,4                   | 1,391 |
| Kalibrator 4    | 47,5                   | 3,116 |
| Kalibrator 5    | 99,5                   | 6,129 |
| Kontrollserum 1 | 14,0                   | 0,961 |
| Kontrollserum 2 | 26,6                   | 1,845 |
| P1              | 7,6                    | 0,581 |
| P2              | 22,8                   | 1,620 |
| P3              | 25,9                   | 1,992 |
| P4              | 76,7                   | 5,352 |

## 12. TYPISCHE KALIBRATIONS-KURVE



## 13. NORMALWERTE

Die bestimmten Normalwerte sind nur indikativ, da sie von verschiedenen Wirkstoffen beeinflusst sein können. Wir empfehlen, dass jedes Labor seine eigenen Normalwerte bestimmt.

| Serum Proben                      | n  | Durchschnittliche Konzentration $\pm$ Standardabweichung (pmol/l) |
|-----------------------------------|----|-------------------------------------------------------------------|
| Nicht adipöse, fastende Patienten | 16 | 2,56 $\pm$ 1,28                                                   |
| Fastende IDDM                     | 9  | 4,67 $\pm$ 3,85                                                   |
| Nicht fastende IDDM               | 13 | 16,25 $\pm$ 17,75                                                 |

Die Analyse der Regression innerhalb eines Serum/Plasma Vergleiches hat folgende Gleichung ergeben:

$$Y \text{ (Plasma Ergebnis)} = 1,20 \times X \text{ (Serum Ergebnis)} + 1,17$$

Korrelationskoeffizient:  $r=0,98$  ( $n=48$ ).

## 14. LEISTUNGSDATEN

### SENSITIVITÄT

#### Analytische Sensitivität

Die Sensitivität war basierend auf der Eichkurve kalkuliert definiert als die kleinste Konzentration, die einen signifikanten Unterschied zum Nullkalibrator ergibt (Mittelwert + 2fache Standardabweichung).

Diese Konzentration ist 0,6 pmol/l.

### Präzision

#### Intra-assay

| Proben | Mittel wert (pmol/l) | $\pm$ | S.D. | C.V. (%) | N  |
|--------|----------------------|-------|------|----------|----|
| a      | 9.4                  | $\pm$ | 0,3  | 3,2      | 20 |
| b      | 23.7                 | $\pm$ | 0,7  | 3,0      | 20 |
| c      | 41.9                 | $\pm$ | 1,2  | 2,9      | 20 |

#### Inter-assay

| Proben | Mittel wert (pmol/l) | $\pm$ | S.D. | C.V. (%) | N |
|--------|----------------------|-------|------|----------|---|
| a      | 7,9                  | $\pm$ | 0,2  | 2,5      | 9 |
| b      | 14,1                 | $\pm$ | 0,2  | 1,4      | 9 |
| c      | 29,1                 | $\pm$ | 0,4  | 1,4      | 9 |

### GENAUIGKEIT

#### Wiederfindungstest

| Proben     | gemessen (pmol/l) | erwartet (pmol/l) | Wiederfindung (%) |
|------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| S1         | 8,7               | -                 |                   |
| S1 + Cal 0 | 4,5               | 4,3               | 104,7             |
| S1 + Cal 1 | 6,0               | 6,1               | 98,4              |
| S1 + Cal 2 | 10,1              | 9,9               | 102,0             |
| S1 + Cal 3 | 15,1              | 14,5              | 104,1             |
| S1 + Cal 4 | 28,7              | 28,1              | 102,1             |
| S1 + Cal 5 | 56,9              | 54,1              | 105,2             |

#### Paralleltest

| Verdünnung | gemessen (pmol/l) | erwartet (pmol/l) | Wiederfindung (%) |
|------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 1/1        | 22,5              | -                 | -                 |
| 1/2        | 11,8              | 11,2              | 105               |
| 1/4        | 6,4               | 5,6               | 114               |
| 1/6        | 4,0               | 3,7               | 107               |
| 1/8        | 2,8               | 2,8               | 100               |
| 1/10       | 2,0               | 2,2               | 90                |

### BESONDERHEIT

#### Störungen

Patientenproben können humane anti-Maus Antikörper (HAMA) enthalten, die falsch erhöhte oder abgesenkte Ergebnisse ergeben können, wenn Analysen mit monoklonalen Mausantikörpern durchgeführt werden. Dieser Test ist entwickelt worden, um Interferenzen mit HAMA-haltigen Proben zu minimieren, durch den Gebrauch von HAMA Interferenz blockierendem Puffer (Blockierungspuffer). Trotzdem kann die vollständige Eliminierung dieser Interferenz bei allen Patientenproben nicht garantiert werden. Ein Testergebnis, das unvereinbar mit dem klinischen Bild und der Patientenhistorie ist, sollte mit Vorsicht interpretiert werden.

#### Kreuzreaktionen

Die folgenden Peptide wurden geprüft, und kein Kreuzreaktion ist beobachtet worden:

|                          |                 |
|--------------------------|-----------------|
| Humanem Insulin          | < 10 000 pmol/l |
| Humanem C-Peptide        | 50 000 pmol/L   |
| Proinsulin des (31,32)   | < 200 pmol/L    |
| Proinsulin split (32,33) | 5000 pmol/L     |
| Proinsulin des (64,65)   | 200 pmol/L      |
| Proinsulin split (65,66) | 1000 pmol/L     |

# ENGLISH

## IMMUNOENZYMOMETRIC ASSAY FOR THE QUANTATIVE DETERMINATION OF PROINSULIN IN HUMAN SERUM AND PLASMA.

### E-BX-96 - 96 Assays

#### FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE ONLY

#### 1. CLINICAL APPLICATIONS

Proinsulin (PI), a polypeptide of 9390 MW (86 amino acids), is synthesized in the  $\beta$  cells of the Islets of Langerhans in the pancreas(1). The sequence of proinsulin is highly conserved in mammalian species and is homologous with IGF-1 and IGF-2 (2). This protein is processed to C-peptide and insulin forms (3). Both are secreted in equimolar amounts into the blood. In normal individuals, proinsulin is present in the circulation in very low concentrations (typical basal values 2-6 pmol/L). The level of proinsulin can be a reflection of  $\beta$  cell status and a consequence of dysfunction of PI processing and/or secretion (4). Proinsulin like material is increased in clinical conditions as insulinoma, familial hyperinsulinemia, non-insulin dependent diabetes mellitus (5, 6, 7, 8).

#### 2. PRINCIPLE OF THE ASSAY (I)

Proinsulin kit is a sensitive two-site sandwich enzyme linked immunosorbent assay. The microtiter plates are coated with a monoclonal antibody (S2) specific for epitope at the C-peptide/insuline A chain junction. S2 is able to bind intact PI, des (31,32)-PI and split (32,33)-PI but not insulin, C-peptide and the other "des" and "split" forms.

Prior to use a blocking buffer is added to the allocated wells. An aliquot of patient sample is then added to the wells and incubated. The wells are then washed to remove unbound antibody and other serum compounds. In a second incubation time, an enzyme labelled anti-proinsulin antibody (S53) is incubated in the wells. This antibody is specific for the epitopes at insulin  $\beta$  chain/C-peptide junction. S53 is able to bind to intact PI, des (64,65)-PI and split (65,66)-PI but not insulin, C-peptide and other "des" and "split" forms. The combination of the two Mabs has the ability to detect only the intact human proinsulin.

After washing away any unbound enzyme labelled anti-proinsulin antibody, the enzyme activity is measured by adding a chromogen substrate. The intensity of colour development is proportional to the concentration of proinsulin in the patient sample.

(I) Paule Housa et al. "First direct assay for intact human proinsulin". Clinical Chemistry 44:7, 15414-1519 (1998)

#### 3. REAGENTS PROVIDED WITH THE KIT

- Reagents are sufficient for 96 wells.
- Store the kit at 2-8°C.
- The expiry date of each reagent is shown on the vial label.

**1. Coated microtiterplate :** 96 breakable wells coated with a proinsulin specific antibody . Keep unused wells at 2-8°C, protected from moisture in the provided aluminium bag and carefully sealed.  
Store at 2 – 8°C

**2. Proinsulin 0 calibrator :** 1 vial of lyophilised calibrator. *Reconstitute with 3 ml of distilled water.* Blue coded. After reconstitution, keep the calibrator at –20°C (freeze-defreeze cycle: max 2 times).  
Preservatives : Merthiolate.  
Store lyophilized at 2 – 8°C

**3. Proinsulin 1 - 5 calibrators:** 5 vials of lyophilised calibrator. *Reconstitute with 1 ml of distilled water.* Blue coded. After reconstitution, keep the calibrator at –20°C (freeze-defreeze cycle: max 2 times). For the exact value, refer to the data sheet included.  
**The calibrators are calibrated against the WHO 1<sup>st</sup> International Reference reagent IRR 84/611.**  
Preservatives : Merthiolate.  
Store lyophilized at 2 – 8°C

**4. Control sera :** 2 vials of lyophilised sample. *Reconstitute with 1 ml of distilled water.* Blue coded. After reconstitution, keep the control serum at –20°C (freeze-defreeze cycle: max 2 times)  
For the exact value, refer to the data sheet included.  
Preservative : Merthiolate.  
Store lyophilised at 2 – 8°C.

**5. HRP conjugate:** 1 vial ( 11 ml) of anti-human proinsulin conjugated to horseradish peroxidase (HRPO). Preservatives : Neomycin and Merthiolate.  
Store at 2 – 8°C.

**6. Blocking buffer :** 1 vial (1.5 ml) of murin IgG in phosphate buffer. Ready for use.  
Preservatives : Merthiolate.  
Store at 2 – 8°C.

**7. Washing solution :** 1 vial (40 ml) of buffer with Tween 20. Preservatives: Sulfate Streptomycin and Amphotericin. Bring the vial content to 400 ml (final volume) with distilled water. The diluted washing solution is stable for 6 months at 2 - 8°C.  
Store at 2 – 8°C

**8. Chromogenic substrate:** 2 vials (13ml) of Tetramethylbenzidine in citrate-phosphate buffer and DMSO. Ready for use.  
Store at 2 – 8°C

**9. Stop solution :** 1 vial (15ml) of 0.5M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Ready for use.  
Store at 2 – 8°C

#### 4. KIT REAGENTS

| Reagents              | Quantity   | Physical state    |
|-----------------------|------------|-------------------|
| Wells                 | 96         | Ready for use     |
| Calibrator 0          | 1 x 3 ml   | Lyophilised       |
| Calibrators 1 – 5     | 5 x 1 ml   | Lyophilised       |
| Control Sera          | 2 x 1 ml   | Lyophilised       |
| HRP conjugate         | 1 x 11 ml  | Ready for use     |
| Blocking buffer       | 1 x 1.5 ml | Ready for use     |
| Washing Solution      | 1 x 40 ml  | Concentrated 10 x |
| Chromogenic substrate | 2 x 13 ml  | Ready for use     |
| Stop solution         | 1 x 15 ml  | Ready for use     |

#### 5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Adjustable, automatic micropipettes with disposable tips.
- Graduated cylinder.
- Aspiration pump or automated well washing device.
- Microtiterplate spectrophotometer capable of measuring absorbances within a 0-3.0 A interval at 450 and 405 nm.
- Millimetric graph paper.
- Orbital shaker adjustable at 150 rpm.
- Distilled H<sub>2</sub>O.

#### 6. WARNINGS AND PRECAUTIONS

**In order to obtain reproducible results, the following rules must be observed:**

- Do not mix reagents of different lots.
- Do not use reagents beyond their expiry date.
- Use thoroughly clean glassware.
- Use distilled water, stored in clean containers.
- Avoid any contamination among samples; for this purpose, disposable tips should be used for each sample and reagent.

**In order to avoid personal and environmental contamination, the following precautions must be observed:**

- Use disposable gloves while handling potentially infectious material and performing the assay.
- Do not pipette reagents by mouth.
- Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics during the assay.
- All material of human origin used for the preparation of this kit tested negative for HBsAg, anti-HIV and anti-HCV. Since no test at present can guarantee complete absence of these viruses, all samples and

reagents used for the assay must be considered potentially infectious. Therefore, the assay waste must be decontaminated and disposed of, in accordance with established safety procedures.

- Disposable ignitable material must be incinerated; disposable non-ignitable material must be sterilized in autoclave for at least 1 hour at 121°C. Liquid wastes must be added with sodium hypochlorite at a final concentration of 3%. Let the hypochlorite act for at least 30 minutes. Liquid wastes containing acid must be neutralized with appropriate amounts of base, before treating with sodium hypochlorite.
  - Chromogen and Blocking Reagent should be handled with care. Avoid contact with skin, eyes and mucous membranes. In case of accident rinse thoroughly with running water.
  - Avoid splashing and aerosol formation; in case of spilling, wash carefully with a 3% sodium hypochlorite solution and dispose of this cleaning liquid as potentially infectious waste.
- Some reagents contain sodium azide as preservative; to prevent build-up of explosive metal azides in lead and copper plumbing, reagents should be discarded by flushing the drain with large amounts of water.

## 7. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Both serum and plasma may be used in the assay, although values with serum are slightly lower than plasma. Avoid using hemolyzed, lipemic or bacterially contaminated sera.

Thoroughly mix thawed specimens before assay and avoid repeated freeze/thawing cycles which may cause loss of antibody activity and give erroneous results.

Samples may be stored at 2°-8°C for up to 24 hours. For long term storage, samples should be stored frozen at -20°C or lower.

## 8. ASSAY SCHEME

| Wells                                             | Blank  | Calibrator (0-5) | Control Sera | Samples |
|---------------------------------------------------|--------|------------------|--------------|---------|
| <b>Reagents</b>                                   |        |                  |              |         |
| Blocking buffer                                   | ---    | 10 µl            | 10 µl        | 10 µl   |
| Calibrator (0 - 5)                                | ----   | 100 µl           | ----         | ----    |
| Control Sera                                      | ----   | ----             | 100 µl       | ----    |
| Samples                                           | ----   | ----             | ----         | 100 µl  |
| - Incubate: 30' at R.T., orbital shaker (150 rpm) |        |                  |              |         |
| - Aspirate and wash: 3 X 300 µl.                  |        |                  |              |         |
| Conjugate                                         | -----  | 100 µl           | 100 µl       | 100 µl  |
| - Incubate: 60' at R.T., orbital shaker (150 rpm) |        |                  |              |         |
| - Aspirate and wash: 3 x 300 µl                   |        |                  |              |         |
| Chrom Substrate                                   | 200 µl | 200 µl           | 200 µl       | 200 µl  |
| - Incubate: 15' at R.T., orbital shaker (150 rpm) |        |                  |              |         |
| Stop solution                                     | 100 µl | 100 µl           | 100 µl       | 100 µl  |
| - Read: 450-405 nm and 620 nm as reference.       |        |                  |              |         |

## 9. ASSAY PROCEDURE

- Allow reagents and samples to warm up at room temperature.
- Mix samples by inversion before use.
- The samples are not diluted.

1. Allocate the wells of Microtiterplate for calibrators, control sera and samples
2. Pipette 10 µl of Blocking buffer directly into the bottom of the wells.
3. Pipette 100 µl of each calibrators, control sera and sample into the corresponding wells.
4. Incubate for 30 minutes at room temperature on an orbital shaker (150rpm) (NB. The incubation time begins after the last sample addition)
5. Wash the wells 3 times with 300 µl of diluted Washing solution. Aspirate all liquid from the wells.
6. Add 100µl of HRP conjugate into the wells.
7. Incubate for 60 minutes at room temperature on an orbital shaker (150rpm).
8. Wash the wells 3 times with 300 µl of diluted Washing solution. Aspirate all liquid from the wells.

9. Pipette 200 µl of Chromogenic substrate solution into the wells
10. Incubate 15 minutes at room temperature on an orbital shaker (150rpm), avoid direct light exposure (NB. The incubation time begins after the first TMB addition)
11. Pipette 100 µl of Stop solution into the wells
12. Read the absorbance of the wells (450, 405 and 620nm (as reference)). Reading must be completed within 20 minutes from the end of the assay.

## 10. CALCULATION OF RESULTS

In order to obtain a better sensitivity, the present method employs spectrophotometric reading at two wavelengths (450 and 405 nm). For all O.D. overflow at 450nm, multiplied the O.D. 405nm by the correction factor calculated by the ratio between O.D. 450nm and O.D. 405nm. To establish this factor, used a sample reading at 405nm and 450nm.

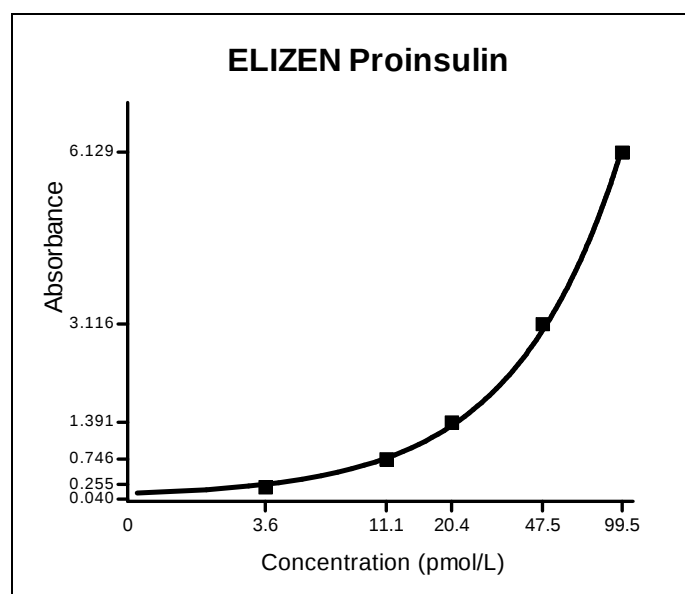
Draw a calibration curve on millimetric graph paper, by plotting the calibrators concentration (x-axis) against the absorbance obtained for each standard (y-axis, logit). Corresponding Proinsulin concentrations in pmol/l are obtained by interpolating the absorbances of each sample on the calibration curve.

## 11. EXAMPLE OF CALCULATION

The values shown below must be considered as an example and must not be used in place of experimental data.

| Description     | Concentration (pmol/l) | O.D   |
|-----------------|------------------------|-------|
| Calibrator 0    | 0                      | 0,040 |
| Calibrator 1    | 3,6                    | 0,255 |
| Calibrator 2    | 11,1                   | 0,746 |
| Calibrator 3    | 20,4                   | 1,391 |
| Calibrator 4    | 47,5                   | 3,116 |
| Calibrator 5    | 99,5                   | 6,129 |
| Control serum 1 | 14,0                   | 0,961 |
| Control serum 2 | 26,6                   | 1,845 |
| P1              | 7,6                    | 0,581 |
| P2              | 22,8                   | 1,620 |
| P3              | 25,9                   | 1,992 |
| P4              | 76,7                   | 5,352 |

## 12. TYPICAL CALIBRATION CURVE



### 13. NORMAL VALUES

The normal values determined are only indicative since they may be affected by various agents. We recommend that each laboratory establish its own normal range.

| Serum                      | n  | Mean $\pm$ SD (pmol/l) |
|----------------------------|----|------------------------|
| Non obese fasting patients | 16 | 2.56 $\pm$ 1.28        |
| Fasting IDDM               | 9  | 4.67 $\pm$ 3.85        |
| Non-fasting IDDM           | 13 | 16.25 $\pm$ 17.75      |

The regression analysis for a plasma/serum comparison equation is:

$$Y (\text{plasma value}) = 1.20 \times X (\text{serum value}) + 1.17$$

Correlation Coefficient  $r = 0.98$  ( $n=48$ )

### 14. PERFORMANCES OF THE ASSAY

#### SENSITIVITY

##### Analytical sensitivity

The sensitivity was calculated based upon the calibration curve and expressed as the minimal dose showing a significant difference from the Zero Calibrator (mean value + 2 S.D.). This dose is 0.6 pmol/l.

#### PRECISION

##### Intra-assay

| Sample | Mean | $\pm$<br>(pmol/l) | S.D. | C.V.<br>(%) | Replicates<br>no. |
|--------|------|-------------------|------|-------------|-------------------|
| a      | 9,4  | $\pm$             | 0,3  | 3,2         | 20                |
| b      | 23,7 | $\pm$             | 0,7  | 3,0         | 20                |
| c      | 41,9 | $\pm$             | 1,2  | 2,9         | 20                |

##### Inter-assay

| Sample | Mean | $\pm$<br>(pmol/l) | S.D. | C.V.<br>(%) | Replicates<br>no. |
|--------|------|-------------------|------|-------------|-------------------|
| a      | 7,9  | $\pm$             | 0,2  | 2,5         | 9                 |
| b      | 14,1 | $\pm$             | 0,2  | 1,4         | 9                 |
| c      | 29,1 | $\pm$             | 0,4  | 1,4         | 9                 |

#### ACCURACY

##### Recovery Test

| Samples    | Measured<br>(pmol/l) | Expected<br>(pmol/l) | Recovery<br>(%) |
|------------|----------------------|----------------------|-----------------|
| S1         | 8,7                  | -                    | -               |
| S1 + Cal 0 | 4,5                  | 4,3                  | 104,7           |
| S1 + Cal 1 | 6,0                  | 6,1                  | 98,4            |
| S1 + Cal 2 | 10,1                 | 9,9                  | 102,0           |
| S1 + Cal 3 | 15,1                 | 14,5                 | 104,1           |
| S1 + Cal 4 | 28,7                 | 28,1                 | 102,1           |
| S1 + Cal 5 | 56,9                 | 54,1                 | 105,2           |

##### Parallelism Test

| Dilution | Measured<br>(pmol/l) | Expected<br>(pmol/l) | Recovery<br>(%) |
|----------|----------------------|----------------------|-----------------|
| 1/1      | 22.5                 | -                    | -               |
| 1/2      | 11.8                 | 11.2                 | 105             |
| 1/4      | 6.4                  | 5.6                  | 114             |
| 1/6      | 4.0                  | 3.7                  | 107             |
| 1/8      | 2.8                  | 2.8                  | 100             |
| 1/10     | 2.0                  | 2.2                  | 90              |

#### SPECIFICITY

Patient samples may contain human anti-mouse antibodies (HAMA) which are capable of giving falsely elevated or depressed results with assays that utilize mouse monoclonal antibodies. This assay has been designed to minimize interference from HAMA-containing specimens with the use of a blocking HAMA interferences (blocking buffer). Nevertheless, complete elimination of this interference from all patient specimens cannot be guaranteed. A test result that is inconsistent with the clinical picture and patient history should be interpreted with caution.

#### Cross-reactivity

The following peptides were tested and no cross-reactivity has been observed :

|                           |                 |
|---------------------------|-----------------|
| Human Insulin             | < 10 000 pmol/l |
| Human C-Peptide           | 50 000 pmol/L   |
| Des (31,32)- Proinsulin   | < 200 pmol/L    |
| Split (32,33)- Proinsulin | 5000 pmol/L     |
| Des (64,65)- Proinsulin   | 200 pmol/L      |
| Split (65,66)- Proinsulin | 1000 pmol/L     |

# FRANCAIS

## DOSAGE IMMUNO-ENZYMATIQUE POUR LA DÉTERMINATION QUANTITATIVE DE LA PROINSULINE DANS LE SÉRUM ET LE PLASMA HUMAIN.

### E-BX-96 - 96 Dosages

### UNIQUEMENT POUR UN USAGE DE DIAGNOSTIC IN VITRO

#### 1. APPLICATIONS CLINIQUES

La pro-insuline (PI), un polypeptide de 9390 MW (86 acides aminés), est synthétisée dans les cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans du pancréas (1). La séquence de la pro-insuline est fortement conservée chez les mammifères et est homologue des IGF-1 et IGF-2 (2). Cette protéine est transformée en peptide C et différentes formes d'insuline (3). Les deux sont sécrétés dans le sang en quantité équimolaire. Chez les individus normaux, la pro-insuline est présente dans la circulation en très faible concentration (les valeurs de base typiques sont de 2 à 6 pmol/L). Le taux de pro-insuline peut être le reflet de l'état des cellules  $\beta$  et une conséquence du dysfonctionnement de la transformation de la PI et/ou de sa sécrétion (4). La pro-insuline est augmentée quand des circonstances cliniques telles que l'insulinome, l'hyperinsulinémie familiale, le diabète sucré non insulinodépendant sont rencontrées (5, 6, 7, 8).

#### 2. PRINCIPE DE L'ANALYSE (I)

La trousse pro-insuline est un dosage immuno-enzymatique sensible, de type sandwich à 2 sites. Les plaques de microtitration sont tapissées d'un anticorps monoclonal (S2) spécifique de l'épitope se trouvant à la jonction du peptide C et de la chaîne A de l'insuline. S2 est capable de lier la PI intacte, la PI des (31,32) et la PI split (32,33), mais pas l'insuline ou les autres formes "des" ou "split".

Avant utilisation, le tampon de blocage est ajouté aux puits alloués. Une aliquote de l'échantillon du patient est ajoutée au puits et incubée. Les puits sont ensuite lavés pour enlever l'anticorps non lié et les autres composants du sérum. Une enzyme marquée à un anticorps anti-pro-insuline (S53) est alors ajoutée dans les puits et l'on procède à une seconde incubation. L'anticorps est spécifique des épitopes de la jonction de la chaîne B de l'insuline et du peptide C. Le S53 est capable de lier la PI intacte, la PI des (64,65) et la PI split (65,66), mais pas l'insuline, le peptide C et les autres formes "des" et "split". La combinaison de deux AcM permet de détecter la seule pro-insuline humaine intacte.

Après lavage, pour éliminer toute l'enzyme marquée à un anticorps anti-pro-insuline, l'activité enzymatique est mesurée en ajoutant un substrat chromogène. L'intensité de la couleur développée est proportionnelle à la concentration en pro-insuline de l'échantillon du patient.

(I) Paule Housa et al. "First direct assay for intact human proinsulin". Clinical Chemistry 44:7, 15414-1519 (1998)

#### 3. REACTIFS FOURNIS AVEC LA TROUSSE

- Les réactifs sont suffisants pour 96 déterminations.
- Stocker les kits et les réactifs à 2-8°C.
- La date d'expiration de chacun des réactifs se trouve sur l'étiquette du flacon.

**1. Plaque de microtitration coatée:** 96 puits cassables tapissés d'un anticorps anti-pro-insuline spécifique. Conserver les puits non utilisés entre 2 et 8°C, à l'abri de l'humidité et dans le sachet en aluminium fourni et soigneusement fermé.  
Conserver entre 2 et 8°C

**2. Calibrateur pro-insuline 0:** 1 flacon de calibrateur lyophilisé. Reconstituer avec 3 ml d'eau distillée. Code Bleu. Après reconstitution, garder le calibrateur à -20°C (cycle de congélation-décongélation: maximum 2 fois).  
Conservateur: Merthiolate.  
Conserver lyophilisé entre 2 et 8°C.

**3. Calibrateurs pro-insuline 1 - 5:** 5 flacons de calibrateurs lyophilisés. Reconstituer avec 1 ml d'eau distillée. Code Bleu. Après reconstitution, garder le calibrateur à -20°C (cycle de congélation-décongélation: maximum 2 fois). Pour avoir la valeur exacte, se référer à la feuille de données incluse dans la trousse.

**Les calibrateurs sont calibrés par rapport à la première préparation de référence international de l'OMS, l'IRR 84/611.**

Conservateur: Merthiolate.

Conserver entre 2 et 8°C

**4. Sérums de contrôle:** 2 flacons d'échantillon lyophilisé. Reconstituer avec 1 ml d'eau distillée. Code Bleu. Après reconstitution, garder le calibrateur à -20°C (cycle de congélation-décongélation: maximum 2 fois).

Pour avoir la valeur exacte, se référer à la feuille de données incluse dans la trousse.

Conservateur: Merthiolate.

Conserver lyophilisé entre 2 et 8°C.

**5. Conjugué HRP:** 1 flacon (11 ml) d'un anticorps anti-pro-insuline humaine conjugué à la peroxydase de raifort (HRPO).

Conservateurs: Néomycine et Merthiolate.

Conserver entre 2 et 8°C

**6. Tampon de Blocage:** 1 flacon (1,5 ml) d'IgG murin dans un tampon phosphate.

Prêt à l'emploi.

Conservateur: Merthiolate.

Conserver entre 2 et 8°C

**7. Solution de lavage:** 1 flacon (40 ml) de tampon contenant du Tween 20. Conservateurs: Streptomycine et Amphotéricine. Porter le contenu du flacon à 400 ml (volume final) avec de l'eau distillée. La solution de lavage diluée est stable pendant 6 mois entre 2 et 8°C.

Conserver entre 2 et 8°C

**8. Substrat chromogène:** 2 flacons (13ml) de tétraméthylbenzidine en tampon citrate-phosphate et DMSO. Prêt à l'emploi.

Conserver entre 2 et 8°C.

**9. Solution d'arrêt :** 1 tube (15ml) de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5M. Prêt à l'emploi.

Conserver entre 2 et 8°C

#### 4. REACTIFS DE LA TROUSSE

| Réactifs            | Quantité   | État physique   |
|---------------------|------------|-----------------|
| Puits               | 96         | Prêt à l'emploi |
| Calibrateur 0       | 1 x 3 ml   | Lyophilisés     |
| Calibrateurs 1 – 5  | 5 x 1 ml   | Lyophilisés     |
| Sérums de contrôle  | 2 x 1 ml   | Lyophilisés     |
| Conjugué HRP        | 1 x 11 ml  | Prêt à l'emploi |
| Tampon de blocage   | 1 x 1,5 ml | Prêt à l'emploi |
| Solution de lavage  | 1 x 40 ml  | Concentré 10 x  |
| Substrat chromogène | 2 x 13 ml  | Prêt à l'emploi |
| Solution d'arrêt    | 1 x 15 ml  | Prêt à l'emploi |

#### 5. MATERIEL REQUIS MAIS NON FOURNI

- Micropipettes automatiques réglables avec pointes jetables.
- Pipettes graduées.
- Pompe d'aspiration ou dispositif de lavage automatique.
- Spectrophotomètre pour plaques de microtitration capable de lire des absorbances dans un intervalle de DO de 0 à 3,0 à 450 et 405.
- Papier millimétré.
- Agitateur orbital réglable à 150 tpm.
- Eau distillée.

#### 6. AVERTISSEMENTS ET PRECAUTIONS

**Pour avoir des résultats reproductibles, les règles suivantes doivent être observées:**

- Ne pas mélanger des réactifs portant un numéro de lot différent.
- Ne pas utiliser de réactifs après leur date d'expiration.
- Utiliser de la verrerie parfaitement propre.
- Utiliser de l'eau distillée conservée dans des contenants propres.

- Eviter toute contamination entre les échantillons. Pour cela, il faut utiliser une nouvelle pointe de pipette jetable pour chaque échantillon et réactif.

**Afin d'éviter une contamination personnelle et de l'environnement, les précautions suivantes doivent être observées:**

- Utiliser des gants jetables lors de l'utilisation de matériel potentiellement infecté et lors de la réalisation du dosage.
- Ne pas pipeter à la bouche.
- Ne pas fumer, manger, boire ou se maquiller durant le dosage.
- Tout matériel d'origine humaine utilisé pour la préparation de cette trousse a été testé et trouvé négatif pour HBsAg, anti-HIV et anti-HCV. Etant donné qu'aucun test ne peut garantir l'absence absolue de ces virus, tous les échantillons et réactifs utilisés lors du dosage doivent être considérés comme potentiellement infectieux. Tous les déchets produits lors du dosage, doivent être décontaminés et éliminés en respectant les mesures de sécurité.
- Le matériel jetable combustible doit être incinéré, le matériel jetable incombustible doit être stérilisé à l'autoclave pendant au moins 1 heure à 121 °C. Il faut ajouter aux déchets liquides de l'hypochlorite de soude de manière à obtenir une concentration finale de 3 %. Laisser agir l'hypochlorite de soude au moins 30 minutes. Les déchets liquides contenant de l'acide doivent être neutralisés avec la quantité adéquate de base avant traitement à l'hypochlorite de soude.
- Le chromogène et la solution d'arrêt doivent être manipulés avec précaution. Éviter le contact avec la peau, les yeux et les muqueuses. En cas d'accident, rincer abondamment à l'eau courante.
- Eviter les éclaboussures et la formation d'aérosol, en cas d'éclaboussure, laver soigneusement avec de l'hypochlorite de soude à 3 % et traiter ce liquide de lavage comme potentiellement infectieux.
- Certains réactifs contiennent de l'azote de sodium comme conservateur. Ce composé peut former avec des canalisations de plomb ou de cuivre des azotures métalliques hautement explosifs. Afin d'éviter la formation et l'accumulation de tels azotures dans les canalisations lors de l'élimination de ces réactifs dans un évier, rincer l'évier à grande eau.

## 7. PRELEVEMENT ET PREPARATION DE L'ECHANTILLON

Pour cette analyse, on peut utiliser soit du sérum soit du plasma, bien que les valeurs soient légèrement plus basses avec le sérum qu'avec le plasma. Éviter d'utiliser des échantillons hémolysés, lipémiques ou contaminés par des bactéries.

Mélanger à fond les échantillons décongelés avant l'analyse et éviter les cycles répétés de congélation/décongélation qui peuvent provoquer une dégradation de l'antigène et donner des résultats erronés.

Les échantillons peuvent être conservés entre 2 et 8°C pendant 24 heures. Pour une conservation à long terme, ils doivent être congelés à -20°C ou moins.

## 8. SCHEMA DU DOSAGE

| Puits                                                         | Blanc  | Calibrateurs (0-5) | Contrôles | Echant. |
|---------------------------------------------------------------|--------|--------------------|-----------|---------|
| <b>Réactif</b>                                                |        |                    |           |         |
| Tampon de blocage                                             | ---    | 10 µl              | 10 µl     | 10 µl   |
| Calibrateurs (0 – 5)                                          | ----   | 100 µl             | ----      | ----    |
| Sérums de contrôle                                            | ----   | ----               | 100 µl    | ----    |
| Echantillons                                                  | ----   | ----               | ----      | 100 µl  |
| - Incuber: 30 min. à T° ambiante, agitateur orbital (150 tpm) |        |                    |           |         |
| - Aspirer et laver: 3 X 300 µl                                |        |                    |           |         |
| Conjugué                                                      | -----  | 100 µl             | 100 µl    | 100 µl  |
| - Incuber: 60 min. à T° ambiante, agitateur orbital (150 tpm) |        |                    |           |         |
| - Aspirer et laver: 3 X 300 µl                                |        |                    |           |         |
| Substrat chrom.                                               | 200 µl | 200 µl             | 200 µl    | 200 µl  |
| - Incuber: 15 min. à T° ambiante, agitateur orbital (150 tpm) |        |                    |           |         |
| Solution d'arrêt                                              | 100 µl | 100 µl             | 100 µl    | 100 µl  |
| - Lire : à 450 et à 405 nm, et à 620 nm comme référence.      |        |                    |           |         |

## 9. PROCEDURE DE L'ANALYSE

- Ramener tous les réactifs et les échantillons à température ambiante avant l'utilisation.
  - Avant l'utilisation, mélanger les échantillons par inversion
  - Les échantillons ne sont pas dilués.
1. Allouer les puits de la plaque aux calibrateurs, sérums de contrôle et échantillons
  2. Pipeter 10 µl de tampon de blocage directement dans le fond des puits.
  3. Pipeter 100 µl de chacun des calibrateurs, sérums de contrôle et échantillons dans les puits correspondants.
  4. Incuber pendant 30 minutes à température ambiante sur un agitateur orbital (150 tpm) (NB.: le temps d'incubation commence après l'addition du dernier sérum).
  5. Laver 3 fois les puits avec 300 µl de Solution de lavage diluée. Aspirer tout le liquide des puits.
  6. Ajouter 100 µl de conjugué HRP dans les puits
  7. Incuber pendant 60 minutes à température ambiante sur un agitateur orbital (150 tpm).
  8. Laver les puits 3 fois avec 300 µl de Solution de lavage diluée. Aspirer tout le liquide des puits.
  9. Pipeter 200 µl de la solution du substrat chromogène dans les puits.
  10. Incuber pendant 15 minutes à température ambiante sur un agitateur orbital (150 tpm), éviter l'exposition à la lumière directe (NB.: l'incubation commence après la première addition du substrat chromogène).
  11. Pipeter 100 µl de solution d'arrêt dans les puits.
  12. Lire l'absorbance dans les puits (à 450, 405 et 620nm (comme référence)). La lecture doit être terminée dans les 20 minutes à partir de la fin de l'essai.

## 10. CALCUL DES RESULTATS

Afin d'obtenir une meilleure sensibilité, cette méthode utilise une lecture spectrophotométrique à deux longueurs d'onde (450 et 405 nm). Pour tous les dépassement de D.O. à 450nm, la D.O. à 405nm est multipliée par le facteur de correction calculé qui est le rapport entre la D.O. à 450nm et la D.O. à 405nm. Pour établir ce facteur, on utilise la lecture d'un échantillon à 405nm et 450nm.

Tracer la courbe de calibration sur un papier millimétré en reportant la concentration des calibrateurs (axe des X) en fonction de l'absorbance obtenue pour chacun des standards (axe des y, logit).

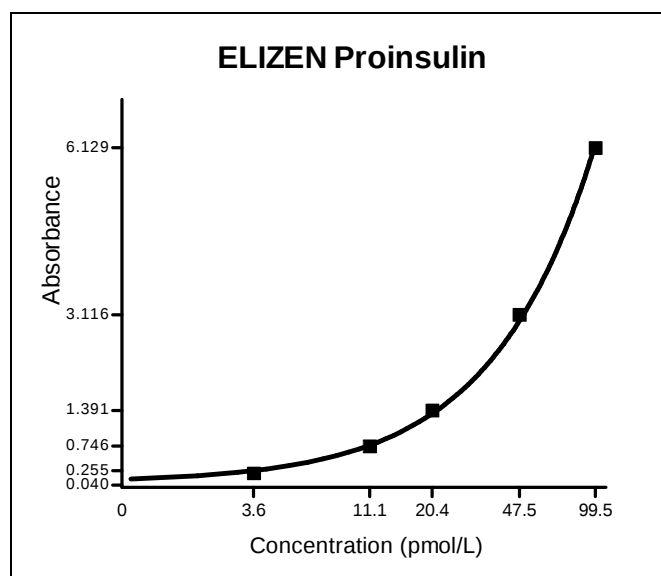
Les concentrations en pro-insuline correspondantes en pmol/l sont obtenues en interpolant les absorbances de chaque échantillon sur la courbe de calibration.

## 11. EXEMPLE DE CALCUL

Les valeurs rapportées ci-dessous doivent être considérées comme un exemple et ne peuvent être utilisées à la place des données expérimentales.

| Description         | Concentration (pmol/l) | D.O.  |
|---------------------|------------------------|-------|
| Calibrateur 0       | 0                      | 0,040 |
| Calibrateur 1       | 3,6                    | 0,255 |
| Calibrateur 2       | 11,1                   | 0,746 |
| Calibrateur 3       | 20,4                   | 1,391 |
| Calibrateur 4       | 47,5                   | 3,116 |
| Calibrateur 5       | 99,5                   | 6,129 |
| Sérum de contrôle 1 | 14,0                   | 0,961 |
| Sérum de contrôle 2 | 26,6                   | 1,845 |
| P1                  | 7,6                    | 0,581 |
| P2                  | 22,8                   | 1,620 |
| P3                  | 25,9                   | 1,992 |
| P4                  | 76,7                   | 5,352 |

## 12. COURBE DE CALIBRATION TYPIQUE



## 13. VALEURS NORMALES

Les valeurs normales déterminées ne sont qu'indicatives parce qu'elles peuvent être affectées par différents agents. Nous recommandons à chaque laboratoire de déterminer ses propres valeurs normales

| Sérum                      | n  | Moyenne $\pm$ SD (pmol/l) |
|----------------------------|----|---------------------------|
| Patients non obèses à jeun | 16 | 2,56 $\pm$ 1,28           |
| DID* à jeun                | 9  | 4,67 $\pm$ 3,85           |
| DID* non à jeun            | 13 | 16,25 $\pm$ 17,75         |

\* DID: diabétiques insulinodépendants

L'équation de l'analyse de régression pour comparer un plasma et un sérum est:

$Y$  (valeur du plasma) =  $1.20 \times X$  (valeur du sérum) + 1.17  
Coefficient de corrélation  $r = 0.98$  ( $n=48$ )

## 14. PERFORMANCE DU DOSAGE

### SENSIBILITE

#### Sensibilité analytique

La sensibilité a été calculée sur base de la courbe d'étalonnage et exprimée comme dose minimale montrant une différence significative du Calibre Zéro (valeur moyenne + 2 S.D.). Cette dose est 0,6 pmol/l.

### PRECISION

#### Intra-analyse

| Échantillon | Moyenne $\pm$ (pmol/l) | S.D. | C.V. (%) | Replicats n° |
|-------------|------------------------|------|----------|--------------|
| a           | 9,4 $\pm$ 0,3          | 0,3  | 3,2      | 20           |
| b           | 23,7 $\pm$ 0,7         | 0,7  | 3,0      | 20           |
| c           | 41,9 $\pm$ 1,2         | 1,2  | 2,9      | 20           |

#### Inter-essai

| Échantillon | Moyenne $\pm$ (pmol/l) | S.D. | C.V. (%) | Replicats n° |
|-------------|------------------------|------|----------|--------------|
| a           | 7,9 $\pm$ 0,2          | 0,2  | 2,5      | 9            |
| b           | 14,1 $\pm$ 0,2         | 0,2  | 1,4      | 9            |
| c           | 29,1 $\pm$ 0,4         | 0,4  | 1,4      | 9            |

## EXACTITUDE

### Test de récupération

| Échantillons | Mesuré (pmol/l) | Prévu (pmol/l) | Récupération (%) |
|--------------|-----------------|----------------|------------------|
| S1           | 8,7             | -              | -                |
| S1 + Cal 0   | 4,5             | 4,3            | 104,7            |
| S1 + Cal 1   | 6,0             | 6,1            | 98,4             |
| S1 + Cal 2   | 10,1            | 9,9            | 102,0            |
| S1 + Cal 3   | 15,1            | 14,5           | 104,1            |
| S1 + Cal 4   | 28,7            | 28,1           | 102,1            |
| S1 + Cal 5   | 56,9            | 54,1           | 105,2            |

### Test de parallélisme

| Dilution | Mesuré (pmol/l) | Prévu (pmol/l) | Récupération (%) |
|----------|-----------------|----------------|------------------|
| 1/1      | 22,5            | -              | -                |
| 1/2      | 11,8            | 11,2           | 105              |
| 1/4      | 6,4             | 5,6            | 114              |
| 1/6      | 4,0             | 3,7            | 107              |
| 1/8      | 2,8             | 2,8            | 100              |
| 1/10     | 2,0             | 2,2            | 90               |

## SPECIFICITE

### Interférences

Les échantillons de patients peuvent contenir des anticorps humains anti-souris (HAMA) qui peuvent donner des résultats faussement élevés ou abaissés avec les dosages qui utilisent des anticorps monoclonaux de souris. Ce dosage-ci a été conçu pour minimiser l'interférence avec les échantillons contenant des HAMA (tampon de blocage). Néanmoins, l'élimination complète de cette interférence ne peut pas être garantie pour tous les échantillons de patients. Un résultat d'analyse incohérent avec le tableau clinique et l'anamnèse du patient doit être interprété avec précaution.

### Réactivité croisée

Les peptides suivants ont été testés et ne montraient pas de réactivité croisée:

|                            |                 |
|----------------------------|-----------------|
| Insuline humaine           | < 10 000 pmol/l |
| Peptide C humain           | 50 000 pmol/L   |
| Pro-insuline des (31,32)   | < 200 pmol/L    |
| Pro-insuline split (32,33) | 5000 pmol/L     |
| Pro-insuline des (64,65)   | 200 pmol/L      |
| Pro-insuline split (65,66) | 1000 pmol/L     |

# ESPAÑOL

## ENSAYO INMUNOENZIMOMETRICO PARA LA DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE PROINSULINA EN SUERO Y PLASMA HUMANO.

### E-BX-96 - 96 determinaciones

### PARA USO DE DIAGNÓSTICO IN VITRO.

#### 1. APLICACIONES CLÍNICAS

La Proinsulina (PI), un polipéptido de PM 9390 (86 amino ácidos), es sintetizada en las células  $\beta$  de los islotes de Langerhans en el páncreas (1). La secuencia de la proinsulina es consistente en los mamíferos y es homóloga a IGF-1 y IGF-2 (2). Esta proteína es convertida en péptido C y otras formas de insulina (3). Ambos son secretados en cantidades equimolares en la sangre. En individuos normales, la proinsulina está presente en la circulación en concentraciones muy bajas (los valores basales típicos son 2-6 pmol/L). El nivel de proinsulina puede ser un reflejo del estado de las células  $\beta$  y una consecuencia de una disfunción del procesamiento de la PI y/o de la secreción (4). Una sustancia como la proinsulina está aumentada en condiciones clínicas como el insulinoma, hiperinsulinemia familiar y diabetes mellitus no dependiente de la insulina (5, 6, 7, 8).

#### 2. PRINCIPIO DEL ANÁLISIS (I)

El kit de proinsulina es un inmunoensayo enzimático de adsorción, muy sensible. Las microplacas están recubiertas por un anticuerpo monoclonal (S2) específico para un epítipo en la unión entre el péptido C y la cadena A de la insulina. El S2 se puede unir con PI intacta, des (31,32)-PI y split (32,33)-PI pero no a la insulina, péptido C y las otras formas "des" y "split".

Antes de usar, se agrega un tampón bloqueador a los pocillos designados. Una alícuota de la muestra del paciente se agrega a los pocillos y se incuba. Luego los pocillos se lavan para eliminar anticuerpos libres y otros componentes del suero. En una segunda incubación se agrega un anticuerpo anti proinsulina (S53) acoplado a una enzima. Este anticuerpo es específico para los epítopes ubicados en la unión de la cadena  $\beta$  de la insulina con el péptido C. S53 puede unirse a PI intacta, des (64,65)-PI y split (65,66)-PI pero no a la insulina, péptido C u otras formas "des" y "split". La combinación de los dos anticuerpos monoclonales tiene la habilidad de detectar solo la proinsulina humana intacta.

Después de lavar todos los anticuerpos libres anti proinsulina acoplados a una enzima, se mide la actividad enzimática agregando sustrato cromogénico. La intensidad del color desarrollado es proporcional a la concentración de proinsulina en la muestra del paciente.

(I) Paule Housa et al. "First direct assay for intact human proinsulin". Clinical Chemistry 44:7, 15414-1519 (1998)

#### 3. MATERIAL SUMINISTRADO

- Reactivos suficientes para 96 determinaciones.
- Almacene el kit y los reactivos a 2-8°C.
- La fecha de caducidad de cada reactivo se muestra en la etiqueta del vial.

**1. Placa de microvaloración recubierta:** 96 pocillos recortables recubiertos con un anticuerpo específico anti proinsulina. Mantenga los pocillos no usados a 2-8 °C, protegidos contra la humedad en la bolsa de aluminio y minuciosamente sellados. Almacenar a 2 - 8 °C

**2. Calibrador 0 Proinsulina:** 1 vial de calibrador liofilizado. *Reconstituir con 3 ml de agua destilada.* Codificado azul. Después de reconstituir mantenga el calibrador a -20°C (congele y descongele máximo 2 veces). Conservantes : Mertiolato. Almacenar liofilizado a 2 - 8 °C.

**3. Calibradores 1 - 5 Proinsulina:** 5 viales de calibradores liofilizados. *Reconstituir con 1 ml de agua destilada.* Codificado azul. Después

de reconstituido, mantenga el calibrador a -20°C (congele y descongele máximo 2 veces). Para el valor exacto, consulte la ficha de datos incluida.

**Los calibradores son calibrados con el WHO 1<sup>st</sup> International Reference reagent IRR 84/611.**

Conservantes : Mertiolato.

Almacenar liofilizado a 2 - 8 °C.

**4. Suero de control:** 2 viales de controles liofilizados. *Reconstituir con 1 ml de agua destilada.* Codificado azul. Después de reconstituir, mantenga el suero control a -20°C (congele y descongele máximo 2 veces)

Para el valor exacto, consulte la ficha de datos incluida.

Conservantes : Mertiolato.

Almacenar liofilizado a 2 - 8 °C.

**5. HRP-conjugado:** 1 vial de 11 ml de anticuerpo anti proinsulina humana acoplado a peroxidasa de rábano picante (HRPO).

Conservantes : Neomicina y Mertiolato.

Almacenar a 2 - 8 °C.

**6. Tampón de bloqueo :** 1 vial (1,5 ml) de IgG de ratón en tampón fosfato.

Listo para su uso

Conservantes : Mertiolato.

Almacenar a 2 - 8 °C.

**7. Solución de lavado:** 1 vial (40 ml) de tampón con Tween 20. Conservantes: Sulfato de Estreptomicina y Anfotericina Lleve el contenido del vial a 400 ml (volumen final) con agua destilada. La solución de lavado diluida es estable durante 6 meses a 2 - 8 °C. Almacenar a 2 - 8 °C.

**8. Sustrato cromogénico:** 2 viales (13 ml) de tetrametilbencidina en tampón de citrato-fosfato y DMSO. Listo para su uso. Almacenar a 2 - 8 °C

**9. Solución de parada :** 1 vial (15 ml) de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 M. Listo para su uso. Almacenar a 2 - 8 °C

#### 4. REACTIVOS DEL KIT

| Reactivos            | Cantidad   | Estado físico     |
|----------------------|------------|-------------------|
| Pocillos             | 96         | Lista para su uso |
| Calibrador 0         | 1 x 3 ml   | Liofilizado       |
| Calibradores 1 – 5   | 5 x 1 ml   | Liofilizado       |
| Suero de control     | 2 x 1 ml   | Liofilizado       |
| HRP-conjugado        | 1 x 11 ml  | Listo para su uso |
| Tampón de bloqueo    | 1 x 1,5 ml | Listo para su uso |
| Solución de lavado   | 1 x 40 ml  | Concentrada 10X   |
| Sustrato cromogénico | 2 x 13 ml  | Listo para su uso |
| Solución de parada   | 1 x 15 ml  | Listo para su uso |

#### 5. MATERIAL NECESARIO NO SUMINISTRADO

- Micropipetas automáticas ajustables con puntas desechables.
- Cilindro graduado.
- Bomba de aspiración o aparato de lavado automático.
- Espectrofotómetro para placas de microvaloración capaz de leer absorbancias con un intervalo de DO 0-3,0 a 450 y 405 nm.
- Papel milimétrico para gráfico.
- Agitador orbital ajustable a 150 rpm.
- Agua destilada.

#### 6. ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Para obtener resultados reproducibles, se deben observar las siguientes reglas:

- No mezcle reactivos de lotes diferentes.
- No use reactivos después de la fecha de caducidad.
- Use material de vidrio escrupulosamente limpio.
- Use agua destilada almacenada en recipientes limpios.

- Evite cualquier contaminación entre las muestras; con este propósito, se deben usar puntas desechables para cada muestra y reactivo.

**Para evitar contaminación personal o del medio ambiente, se deben tomar las siguientes precauciones:**

- Utilice guantes desechables para manipular material potencialmente infeccioso y realizar el análisis.
- No pipetee los reactivos con la boca.
- Durante el análisis no fume, coma, ni beba. Tampoco debe aplicarse ningún cosmético.
- Todos los materiales de origen humano utilizados para la preparación de este kit deben haber sido sometidos a análisis de HBsAg, anti-VIH y anti-HCV, con resultados negativos. Dado que actualmente ninguna prueba puede garantizar la total ausencia de estos virus, todos los reactivos y las muestras utilizados para el análisis deben ser considerados como potencialmente infecciosos; por lo tanto, los desechos de los análisis deben ser descontaminados y eliminados con arreglo a los procedimientos de seguridad establecidos. El material desechable que sea inflamable debe ser incinerado; el material desechable no inflamable debe ser esterilizado en autoclave, al menos durante 1 hora a 121°C.
- A los desechos líquidos debe añadirse hipoclorito sódico en una concentración final al 3%. Deje que el hipoclorito actúe durante 30 minutos, como mínimo. Los desechos líquidos que contengan ácido deben ser neutralizados con cantidades de base apropiadas antes del tratamiento con hipoclorito sódico.
- Maneje con cuidado el cromogénico y el reactivo de bloqueo. Evite el contacto con la piel, los ojos o las membranas mucosas. En caso de accidente, aclare con abundante agua corriente.
- Evite salpicaduras y la formación de aerosol; en caso de salpicaduras, lave cuidadosamente con una solución de hipoclorito sódico al 3% de sodio y deseche este líquido resultante de la limpieza como residuo potencialmente infeccioso.
- Algunos reactivos contienen azida de sodio como conservante; para evitar la acumulación de azidas metálicas explosivas en cañerías de plomo y cobre, los reactivos deben desecharse por los desagües correspondientes con grandes cantidades de agua.

## 7. RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Se puede usar tanto suero como plasma en este ensayo, a pesar de que los valores con suero son algo menores que con plasma. Evite el uso de muestras hemolizadas, lipémicas o con contaminación bacteriana.

Mezcle bien las muestras congeladas antes del ensayo y evite los ciclos repetidos de congelación/descongelación, que pueden provocar la degradación del antígeno y dar lugar a resultados erróneos.

Las muestras se pueden almacenar a 2 °C - 8 °C hasta 24 horas. Para periodos de almacenamiento a largo plazo, debe congelar las muestras a -20 °C o temperaturas inferiores.

## 8. ESQUEMA DEL ANÁLISIS

| Pocillos                                                         | Blanco | Calibrador (0-5) | Sueros de control | Muestras |
|------------------------------------------------------------------|--------|------------------|-------------------|----------|
| <b>Reactivos</b>                                                 |        |                  |                   |          |
| Tampón de bloqueo                                                | ---    | 10 µl            | 10 µl             | 10 µl    |
| Calibradores (0 - 5)                                             | ----   | 100 µl           | ----              | ----     |
| Suero de control                                                 | ----   | ----             | 100 µl            | ----     |
| Muestras                                                         | ----   | ----             | ----              | 100 µl   |
| - Incube: 30' a temperatura ambiente, agitador orbital (150 rpm) |        |                  |                   |          |
| - Succione y lave: 3 X 300 µl.                                   |        |                  |                   |          |
| Conjugado                                                        | -----  | 100 µl           | 100 µl            | 100 µl   |
| - Incube: 60' a temperatura ambiente, agitador orbital (150 rpm) |        |                  |                   |          |
| - Succione y lave: 3 x 300 µl                                    |        |                  |                   |          |
| Sustrato cromogénico                                             | 200 µl | 200 µl           | 200 µl            | 200 µl   |
| - Incube: 15' a TA, agitador orbital (150 rpm)                   |        |                  |                   |          |

|                                             |        |        |        |        |
|---------------------------------------------|--------|--------|--------|--------|
| Solución de parada                          | 100 µl | 100 µl | 100 µl | 100 µl |
| - Lea: 450-405 nm y 620 nm como referencia. |        |        |        |        |

## 9. PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

- Deje que los reactivos y las muestras se calienten a temperatura ambiente.
  - Mezcle las muestras por inversión antes de usarlas.
  - Las muestras no están diluidas.
- 1 Disponga los pocillos de la placa de microvaloración para los calibradores, sueros de control y las muestras
  - 2 Pipetee 10 µl de tampón Bloqueador directamente al fondo de los pocillos.
  - 3 Transfiera con una pipeta 100 µl de cada calibrador, suero de control y muestra a los pocillos correspondientes.
  - 4 Incube por 30 minutos a temperatura ambiente en un agitador orbital (150rpm) (NOTA: el tiempo de incubación comienza después de la adición de la última muestra)
  - 5 Lave 3 veces los pocillos con 300 µl de solución de lavado diluida. Succione todo el líquido de los pocillos
  - 6 Añada 100 µl de conjugado HRP a los pocillos.
  - 7 Incube por 60 minutos a temperatura ambiente en un agitador orbital (150rpm).
  - 8 Lave 3 veces los pocillos con 300 µl de solución de lavado diluida. Succione todo el líquido de los pocillos
  - Transfiera con una pipeta 200 µl de sustrato-solución cromógena a los pocillos
  - 9 Incube por 15 minutos a temperatura ambiente en un agitador orbital (150rpm), evite la exposición a la luz directa (NOTA: el tiempo de incubación comienza después de la adición del primer TMB)
  - 10 Transfiera con una pipeta 100 µl de Solución de parada a los pocillos
  - 11 Lea la absorbancia de los pocillos (450 y 405 nm) y 620 nm como referencia. La lectura debe realizarse antes de 20 minutos desde el final del ensayo.

## 10. ÁLCULO DE RESULTADOS

Para obtener una mejor sensibilidad este método usa lectura espectrofotométrica a dos longitudes de onda (450 and 405 nm). Para todos los que excedan la DO a 450nm, multiplique la DO a 405nm por el factor de corrección calculado como la razón entre DO a 450nm y la DO a 405nm. Para establecer este factor, use la lectura de una muestra a 405nm y 450nm.

Trace una curva de calibración en papel milimetrado, representando la concentración de los calibradores (eje X) en función de la absorbancia obtenida para cada estándar (eje Y, logit)

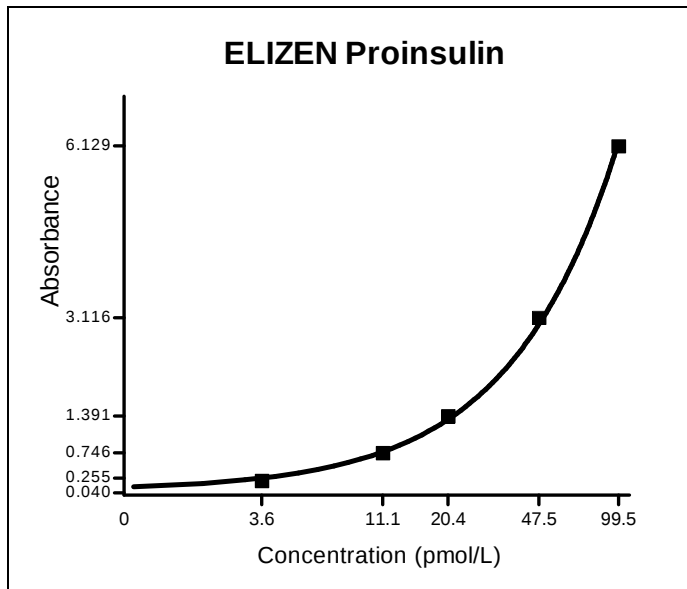
Las concentraciones de proinsulina correspondientes en pmol/l se obtienen interpolando las absorbancias de cada muestra en la curva de calibración.

## 11. EJEMPLO DE CÁLCULO

Los valores que se indican a continuación son simplemente ilustrativos y no deben emplearse en lugar de los datos experimentales.

| Descripción        | Concentración (pmol/l) | D.O.  |
|--------------------|------------------------|-------|
| Calibrador 0       | 0                      | 0,040 |
| Calibrador 1       | 3,6                    | 0,255 |
| Calibrador 2       | 11,1                   | 0,746 |
| Calibrador 3       | 20,4                   | 1,391 |
| Calibrador 4       | 47,5                   | 3,116 |
| Calibrador 5       | 99,5                   | 6,129 |
| Suero de control 1 | 14,0                   | 0,961 |
| Suero de control 2 | 26,6                   | 1,845 |
| P1                 | 7,6                    | 0,581 |
| P2                 | 22,8                   | 1,620 |
| P3                 | 25,9                   | 1,992 |
| P4                 | 76,7                   | 5,352 |

## 12. CURVA DE CALIBRACION TIPICA



### 13 VALORES NORMALES

Los valores normales determinados son sólo indicativos ya que pueden verse afectados por varios factores. Recomendamos que cada laboratorio establezca sus propios intervalos de normalidad.

| Suero                         | n  | Media ± D.E. (pmol/l) |
|-------------------------------|----|-----------------------|
| Pacientes en ayunas no obesos | 16 | 2,56 ± 1,28           |
| En ayunas DMID                | 9  | 4,67 ± 3,85           |
| No en ayunas DMID             | 13 | 16,25 ± 17,75         |

El análisis de la regresión para una ecuación de comparación plasma/suero es:

$Y$  (valor del plasma) =  $1,20 \times X$  (valor del suero) + 1,17  
Coeficiente de correlación  $r = 0,98$  ( $n=48$ )

### 14 RENDIMIENTO DEL ANÁLISIS

#### SENSIBILIDAD

##### Sensibilidad analítica

La sensibilidad se calculó a partir de la curva de calibración y se expresó como dosis mínima con una diferencia significativa con respecto al calibrador cero (valor promedio +2 D. E.). Esta dosis es de 0,6 pmol/l.

#### PRECISIÓN

##### Intra-ensayo

| Suero | Media | ±        | D.E. | C.V. (%) | Repeticiones no. |
|-------|-------|----------|------|----------|------------------|
|       |       | (pmol/l) |      |          |                  |
| a     | 9,4   | ±        | 0,3  | 3,2      | 20               |
| b     | 23,7  | ±        | 0,7  | 3,0      | 20               |
| c     | 41,9  | ±        | 1,2  | 2,9      | 20               |

##### Inter- ensayo

| Suero | Media | ±        | D.E. | C.V. (%) | Repeticiones no. |
|-------|-------|----------|------|----------|------------------|
|       |       | (pmol/l) |      |          |                  |
| a     | 7,9   | ±        | 0,2  | 2,5      | 9                |
| b     | 14,1  | ±        | 0,2  | 1,4      | 9                |
| c     | 29,1  | ±        | 0,4  | 1,4      | 9                |

#### Exactitud

##### Prueba de recuperación

| Muestras   | Previsto (pmol/l) | Medido (pmol/l) | Recuperación (%) |
|------------|-------------------|-----------------|------------------|
| S1         | 8,7               | -               | -                |
| S1 + Cal 0 | 4,5               | 4,3             | 104,7            |
| S1 + Cal 1 | 6,0               | 6,1             | 98,4             |
| S1 + Cal 2 | 10,1              | 9,9             | 102,0            |
| S1 + Cal 3 | 15,1              | 14,5            | 104,1            |
| S1 + Cal 4 | 28,7              | 28,1            | 102,1            |
| S1 + Cal 5 | 56,9              | 54,1            | 105,2            |

##### Prueba de paralelismo

| Dilución | Previsto (pmol/l) | Medido (pmol/l) | Recuperación (%) |
|----------|-------------------|-----------------|------------------|
| 1/1      | 22,5              | -               | -                |
| 1/2      | 11,8              | 11,2            | 105              |
| 1/4      | 6,4               | 5,6             | 114              |
| 1/6      | 4,0               | 3,7             | 107              |
| 1/8      | 2,8               | 2,8             | 100              |
| 1/10     | 2,0               | 2,2             | 90               |

#### ESPECIFICIDAD

Las muestras de los pacientes pueden contener anticuerpos humanos anti ratón (HAMA) que pueden dar resultados falsos altos o bajos con ensayos que usan anticuerpos monoclonales de ratón. Este ensayo ha sido diseñado para minimizar la interferencia de las muestras que contengan HAMAS con el uso de un bloqueador de interferencias HAMA (tampón bloqueador). Sin embargo no se puede garantizar la eliminación total de esta interferencia de todas las muestras de los pacientes. Un resultado que sea inconsistente con el cuadro clínico y la historia del paciente debe ser interpretado con precaución.

#### Reactividad cruzada

Los siguientes péptidos fueron analizados y no se observó reactividad cruzada:

|                            |                 |
|----------------------------|-----------------|
| Insulina humana            | < 10 000 pmol/l |
| Péptido C humano           | 50 000 pmol/L   |
| Des (31,32)- Proinsulina   | < 200 pmol/L    |
| Split (32,33)- Proinsulina | 5000 pmol/L     |
| Des (64,65)- Proinsulina   | 200 pmol/L      |
| Split (65,66)- Proinsulina | 1000 pmol/L     |

### 15. BIBLIOGRAPHIE – BIBLIOGRAPHY – BIBLIOGRAPHIE-BIBLIOGRAFIA

- Kitabschi AE "Proinsulin and C-peptide : a review" Metabolism 1977; 26(5) : 547-587
- Stiles AD, D'Ercole AJ. "The insulin-like growth factors and the lung" Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 1990; 3(2) : 93-100
- Linde S. et al. "Separation and quantitation of serum proinsulin and proinsulin intermediates in humans" J. Chromatogr 1991; 548(1-2) : 371-380
- Robbins DC et al. « Biologic and clinical importance of proinsulin » N. Engl. J. Med. 1984; 10(18) : 1165-1175
- Hafner SM et al. "Proinsulin and specific insulin concentration in high- and low risk populations for NIDDM" Diabetes 1994; 43(12) : 1490-1493
- Hanley AJ et al. "Increased proinsulin levels and decreased acute insulin response independently predict the incidence of type 2 diabetes in the insulin resistance atherosclerosis study" Diabetes 2002; 51(4) : 1263-1270
- Cohen RM et al. "Proinsulin radioimmunoassay in the evaluation of insulinoma and familial hyperproinsulinemia" Metabolism 1986; 35(12) : 1137-1146
- Houssa P. et al. "First direct assay for intact human proinsulin". Clinical Chemistry 1998; 44(7), 15414-1519.
- Klee G. "Human anti-mouse antibodies" Archives of pathology Laboratoire Medecine: Vol.124.N°6, pp.921-923

**10.** Kricka L. "Human anti-animal antibody interferences in immunological assays". Clinical Chemistry.1999 ; 45:942-956.

Diese Produktinformation ist unter [www.zentech.be](http://www.zentech.be) verfügbar.

This package insert is downloadable at [www.zentech.be](http://www.zentech.be)

Ce mode d'emploi peut être téléchargé sur [www.zentech.be](http://www.zentech.be)

Este prospecto se puede descargar en [www.zentech.be](http://www.zentech.be)