

**TECO**®

***Human Intact Proinsulin ELISA***

# Human Intakt Proinsulin ELISA

**Testanleitung  
Deutsch**

Katalog Nr. TE1012

UDI-DI 7640146270016

CE

# Beschreibung des Symbols



TE1012



Chargenbezeichnung



Einmalige Produktkennung



In-vitro-Diagnostikum



Hersteller



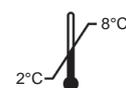
Elektronische  
Gebrauchsanweisung  
beachten



96  
96 Tests



Verwendbar bis



Temperaturbegrenzung



Testanleitung beachten



## Nur für den professioneller Gebrauch



### TECOmedical AG

A Eurobio Scientific Company

Gewerbestrasse 10

4450 Sissach, Switzerland

Phone +41 61 985 81 00

info@tecomedical.com

www.tecomedical.com



### Eurobio Scientific SA

7 avenue de Scandinavie

ZA de Courtaboeuf

91940 Les Ulis France

Phone +33 1 69 79 64 80

reglementaire@eurobio-scientific.com

Jeder schwerwiegende Zwischenfall im Zusammenhang mit diesem Produkt muss der TECOmedical AG und der zuständigen Behörde des Mitgliedstaates, in dem der Anwender und/oder Patient ansässig ist, gemeldet werden.

# TECO® human Intakt Proinsulin ELISA Kit

## CONT Der Kit enthält folgende Reagenzien und Materialien

SYMBOL	BEZEICHNUNG	FORMAT
<b>1</b>	<i>Intact Proinsulin Antibody Coated Microtiter Plate</i> Intakt Proinsulin Antikörper-beschichtete Mikrotiterplatte 12 Streifen à 8 Kavitäten (insgesamt 96, einzeln brechbar) in einem Rahmen, gebrauchsfertig	1 Platte
<b>2</b>	<i>Blocking Buffer</i> Blockierungspuffer gebrauchsfertig	1 x 1,5 ml
<b>3</b>	<i>Antibody-HRP Conjugate</i> Antikörper-HRP-Konjugat gebrauchsfertig	  1 x 11 ml
<b>4</b>	<i>TMB Substrate</i> TMB Substrat gebrauchsfertig	1 x 25 ml
<b>5</b>	<i>Wash Solution</i> Waschlösung 10 fach konzentriert	  1 x 40 ml
<b>6</b>	<i>Stop Solution - 0,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></i> Stopplösung - 0,5 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,5 M Schwefelsäure, gebrauchsfertig	 1 x 15 ml
<b>A</b>	Standard A 0 pmol/L, lyophilisiert	2 x 3,0 ml
<b>B</b>	Standard B lyophilisiert, Konzentration siehe Datenblatt	1 x 1,0 ml
<b>C</b>	Standard C lyophilisiert, Konzentration siehe Datenblatt	1 x 1,0 ml
<b>D</b>	Standard D lyophilisiert, Konzentration siehe Datenblatt	1 x 1,0 ml
<b>E</b>	Standard E lyophilisiert, Konzentration siehe Datenblatt	1 x 1,0 ml
<b>F</b>	Standard F lyophilisiert, Konzentration siehe Datenblatt	1 x 1,0 ml
<b>L</b>	Kontrolle 1 lyophilisiert, Sollwert siehe Datenblatt	1 x 1,0 ml
<b>H</b>	Kontrolle 2 lyophilisiert, Sollwert siehe Datenblatt	1 x 1,0 ml
	<b>eIFU Indikator</b> Login-Adresse für die elektronische Gebrauchsanweisung	

TECO® Human Intakt Proinsulin ELISA Waschlösung ist Bestandteil des Kits und kann separat nachbestellt werden (Katalognummer TE1112).

## Lagerung

Den Kit bei 2-8°C Lagerung. Nicht einfrieren. Nicht verwendete Reagenzien bei 2–8 °C Lagerung.

## Verwendungszweck

Der TECO® human Intakt Proinsulin ELISA ist ein „two-site“ sandwich enzyme-linked immunosorbent in-vitro Test für die quantitative Bestimmung von intaktem Proinsulin in humanem Plasma und Serum.

## Klinische Bedeutung

Proinsulin wird in den  $\beta$ -Zellen der Bauchspeicheldrüse produziert und normalerweise anschließend in Insulin und C-Peptid umgewandelt. Bei gesunden Menschen werden nur geringe Konzentrationen im Plasma gefunden. Insulinresistenz (IR) oder Hyperglykämie verursacht eine erhöhte Insulinsekretion und letztendlich eine Sekretionsstörung. Der Plasmaspiegel des intakten Proinsulins steigt dann an, während der Insulinspiegel sinkt. Ein erhöhter Nüchternwert für intaktes Proinsulin ist ein spezifischer Biomarker für  $\beta$ -Zell-Dysfunktion und IR sowie ein unabhängiger Risikomarker für Herz-Kreislauf-Erkrankungen.

Der während des oralen Glukosetoleranztests gemessene 2-Stunden-Wert für intaktes Proinsulin sagt einen Typ-2-Diabetes bis zu 4 Jahre vor der klinischen Manifestation vorher.

In der klinischen Praxis können morgendliche Nüchternwerte von intaktem Proinsulin als hochspezifischer Marker einer klinisch relevanten Insulinresistenz und  $\beta$ -Zell-Dysfunktion, der eigentlichen Ursache von Typ-2-Diabetes, eingesetzt werden. Die Werte sind hilfreich bei der Auswahl einer geeigneten Therapie gegen die Insulinresistenz und als Verlaufsparemeter zur Kontrolle der Therapieeffekte auf die Sekretionsstörung der  $\beta$ -Zellen. Patienten mit erhöhten Nüchternspiegel an intaktem Proinsulin sollten als insulinresistente und möglicherweise prädiabetische Patienten eingestuft und entsprechend therapiert werden, um das Risiko kardiovaskulärer Folgeschäden zu reduzieren.

Der im Rahmen des oralen Glukosetoleranztests gemessene 2-Stunden-Wert für intaktes Proinsulin ist hochgradig prädiktiv für die zukünftige Entwicklung von Typ-2-Diabetes, noch bevor Veränderungen bei Glukose, HbA1c und Insulin nachweisbar sind. Tatsächlich sagt der 2-Stunden-Wert für intaktes Proinsulin Typ-2-Diabetes bis zu 4 Jahre vor der klinischen Manifestation voraus.

Erhöhte Nüchternwerte an intaktem Proinsulin können auch bei Patienten mit Insulinom oder vor der Manifestation von Typ-1-Diabetes auftreten.

## Literatur

- 1 Vangipurapu J, Stančáková A, Kuulasmaa T, Kuusisto J, Laakso M. Both fasting and glucose-stimulated proinsulin levels predict hyperglycemia and incident type 2 diabetes: a population-based study of 9,396 finnish men. PLoS One 2015; 10:e0124028
- 2 Pfützner A, Hermanns I, Ramljak FS, Demircik F, Pfützner AH, Kann PH, Weber MM. Elevated Intact Proinsulin Levels During an Oral Glucose Challenge Indicate Progressive  $\beta$ -Cell Dysfunction and may be Predictive for Development of Type 2 Diabetes. J Diabetes Sci Technol J Diabetes Sci Technol. 2015; 9:1307-12.
- 3 Pfützner A, Forst T. Elevated intact proinsulin levels are indicative of Beta-cell dysfunction, insulin resistance, and cardiovascular risk: impact of the antidiabetic agent pioglitazone. J Diabetes Sci Technol. 2011 May 1;5(3):784-93. Review.
- 4 Pfützner A, Sachsenheimer D, Lier A. Erhöhtes intaktes Proinsulin als früher Hinweis auf einen zukünftigen Typ 2 Diabetes. Increased Intact Proinsulin as an early indication of a future type 2 diabetes. Diabetes Stoffw Herz 2018; 27:69-73.

## Testprinzip

Der TECO® human Intakt Proinsulin ELISA ist ein sensitiver „two-site“ sandwich enzymelinked immunosorbent assay. Die Mikrotiterplatte ist mit einem monoklonalen Antikörper, spezifisch für die C-Peptid/Insulin A Kettenbindung beschichtet. Dieser Antikörper bindet die intakt Proinsulin Epitope: des-(31,32)-Proinsulin und split-(32,33)-Proinsulin, nicht aber Insulin, CPeptid oder andere „des“- und „split“-Formen.

Im ersten Schritt werden die Patientenproben mit einer Blockierungspufferlösung inkubiert. Die Kavitäten werden danach gewaschen um Serum-/Plasmakomponenten zu entfernen. Im zweiten Inkubationsschritt wird ein enzymmarkierter monoklonaler Proinsulin-Antikörper zugegeben. Dieser Antikörper ist spezifisch für die Insulin  $\beta$  /C-Peptid-Kettenbindung. Der Antikörper bindet die intakt Proinsulin Epitope: des-(64,65)-Proinsulin und split-(65,66)-Proinsulin, nicht aber Insulin, C-Peptide oder andere „des“-und „split“-Formen. Durch die Kombination der beiden monoklonalen Antikörper wird nur intaktes humanes Proinsulin gemessen. Nicht gebundene enzymmarkierte Proinsulinantikörper werden ausgewaschen und die verbleibende Enzymaktivität nach der Zugabe von TMB gemessen. Die Intensität der Farbentwicklung ist proportional zur Konzentration des Proinsulins in der Patientenprobe.

## Nicht mitgelieferte, benötigte Materialien

- Pipetten für 50  $\mu$ l, 100  $\mu$ l, 150  $\mu$ l und 300  $\mu$ l
- Messbehälter für die Rekonstitution oder Verdünnung von Reagenzien
- Absaugvorrichtung und Multi-Kanal-Pipette oder automatische
- Waschvorrichtung für ELISA Platten
- Aqua dest
- Vortexmischer
- ELISA-Plattenlesegerät (geeignet für 96-Well-Formate und Messungen
- bei 450 und 405 nm, mit 590-650 nm als Referenzwellenlänge)
- ELISA-Plattenschüttler (400 rpm) (Orbitalschüttler)
- Software für die Auswertung der Ergebnisse

## Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Dieser Kit ist nur für die in-vitro-Diagnostik geeignet und sollte nur von Fachpersonal durchgeführt werden.

Die Anweisungen sorgfältig befolgen.

Die Verfallsdaten auf den Etiketten und die spezifische Stabilität der rekonstituierten Reagenzien beachten. Weitere ausführlichere Informationen zur Sicherheit befinden sich im „Materials Safety Data Sheet“.

Material menschlichen Ursprungs, das für die Herstellung des Kits verwendet wurde, wurde getestet und zeigte keine Reaktion auf HIV1 und 2 sowie HCV-Antikörper und HbsAg. Die Kitbestandteile sollten dennoch so gehandhabt werden, als seien sie zur Übertragung eines Infektionserregers fähig.

TECOmedical AG kann nicht für einen eventuellen Verlust oder Schaden haftbar gemacht werden, der durch Nichtbeachtung der Testanleitung entsteht.

- 1 Verwendungszweck: zur in-vitro Diagnostik.
- 2 Alle Proben als potenziell gefährliches biologisches Material behandeln. Beim Arbeiten mit diesem Kit und den Proben allgemein gültige Vorsichtsmaßnahmen befolgen.
- 3 Behälter und ungenutzte Inhaltsstoffe gemäß den Anforderungen bundesweit, landesweit und örtlich geltender Bestimmungen entsorgen.
- 4 Die mitgelieferten Reagenzien als eine zusammengehörende Einheit vor dem auf der Verpackung angegebenen Verfallsdatum verwenden.
- 5 Die Reagenzien des Assays wie angegeben lagern.

- 6 Die beschichteten Teststreifen nicht verwenden, wenn der Beutel beschädigt ist.
- 7 Jede Probe als Duplikat testen.
- 8 Für ein zügiges und effizientes Dosieren von Flüssigkeiten wird der Gebrauch von Mehrkanalpipetten empfohlen.
- 9 a) 0,5 M Schwefelsäure ist ätzend und kann zu Verbrennungen führen.  
b) TMB und Waschlösung vorsichtig handhaben.  
Nicht einnehmen. Berührung mit Haut, Augen und Kleidung vermeiden. Bei Berührung mit Wasser abwaschen. Bei Einnahme einen Arzt konsultieren.

## Vorbereitung der Reagenzien

**1** Mit Proinsulin-spezifischem Antikörper beschichtete Mikrotiterplatte  
12 Streifen à 8 Kavitäten (insgesamt 96, einzeln brechbar) in einem Rahmen, in Folienbeutel eingeschweißt. Die Streifen fest in den dafür vorgesehenen Rahmen drücken. Nach dem Öffnen nicht benutzte Kavitäten in die Originalfolienverpackung zurücklegen und verschließen.  
Lagerung bei 2–8 °C bis zum Verfallsdatum.

**A** Proinsulin 0-Standard  
2 Fläschchen 0-Standard, lyophilisiert. Blau gefärbt. Auflösen mit je 3 ml Aqua dest. Nach der Rekonstitution bei -20 °C Lagerung, stabil für 2 Monate (max. 2 Einfrier-Auftauzyklen).  
Lagerung, lyophilisiert bei 2–8 °C bis zum Verfallsdatum.

**B** Standard  
5 Fläschchen mit lyophilisierten Standard. Blau gefärbt. Auflösen mit je 1 ml Aqua dest. Nach der Rekonstitution bei -20°C Lagerung, stabil für 2 Monate (max. 2 Einfrier-Auftauzyklen). Die Konzentrationen in pmol/l entnehmen Sie bitte dem beigefügten Datenblatt. Die Standards wurden gegen den WHO internationalen Standard 09/296 standardisiert.  
Lagerung, lyophilisiert bei 2–8 °C bis zum Verfallsdatum.

**L** Kontrolle 1  
1 Fläschchen mit lyophilisierter Kontrolle. Blau gefärbt. Auflösen mit 1 ml Aqua dest. Nach der Rekonstitution bei -20°C Lagerung, stabil für 2 Monate (max. 2 Einfrier-Auftauzyklen) Den Soll-Wert entnehmen Sie dem beigefügten Datenblatt.  
Lagerung, lyophilisiert bei 2–8 °C bis zum Verfallsdatum.

**H** Kontrolle 2  
1 Fläschchen mit lyophilisierter Kontrolle. Blau gefärbt. Auflösen mit 1 ml Aqua dest. Nach Rekonstitution bei -20°C Lagerung, stabil für 2 Monate (max. 2 Einfrier-Auftauzyklen) Den Soll-Wert entnehmen Sie bitte dem beigefügten Datenblatt.  
Lagerung, lyophilisiert bei 2–8°C bis zum Verfallsdatum.

- 2** Blockierungspuffer  
1 Fläschchen (1,5 ml) murines IgG in Phosphatpuffer. Gebrauchsfertig. Lagerung, bei 2–8 °C bis zum Verfallsdatum.  
  
Blockierungspuffer Gebrauchslösung  
Entweder jeweils die benötigte Menge an Blockierungspuffer Gebrauchslösung herstellen und verbrauchen oder Gesamtmenge herstellen und bei -20 °C einfrieren. 1 Teil Puffer + 4 Teile 0 Standard, z.B. 1,2 ml Blockierungspuffer **2** + 4,8 ml Proinsulin 0 Standard **A** mischen, Lagerung bei -20 °C, stabil für 2 Monate (max. 2 Einfrier-Auftauzyklen).
- 3** Antikörper-HRP-Konjugat  
Fläschchen (11 ml) mit humanem Proinsulinantikörper gebunden an Meerrettichperoxidase (HRP). Gebrauchsfertig.  
Lagerung bei 2–8 °C bis zum Verfallsdatum.
- 4** TMB Substrat  
1 Fläschchen (25 ml) Tetramethylbenzidin in Citrat-Phosphatpuffer und DMSO. Gebrauchsfertig.  
Lagerung bei 2–8 °C bis zum Verfallsdatum.
- 5** Waschlösung  
1 Fläschchen (40 ml) Puffer mit Tween 20. Den Inhalt des Fläschchens mit Aqua dest. auf 400 ml (Endvolumen) auffüllen. Bei 4 °C bleibt die verdünnte Waschlösung 6 Monate stabil.  
Unverdünnt bei 2–8 °C Lagerung bis zum Verfallsdatum.
- 6** Stopplösung – 0,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
1 Fläschchen (15 ml) 0,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gebrauchsfertig. Lagerung bei 2–8 °C bis zum Verfallsdatum.

## Vorbereitung und Haltbarkeit der Proben

### Zu beachten

Die Blutabnahme muss nüchtern erfolgen, um klinische Aussagen treffen zu können.

### Probenmaterial

Nüchterne Blutentnahme. Humanes Serum oder Plasma. Aufgrund besserer Stabilität werden EDTA-Plasma und Heparin-Plasmaproben gegenüber Serumproben bevorzugt.

### Plasma

Die Probenentnahme kann in HbA1C-Röhrchen erfolgen. Diese Proben sind stabil bei Raumtemperatur und sollten innerhalb von 48 Stunden zentrifugiert werden. Plasma im Assay einsetzen oder in Aliquotes bei -20 °C lagern. Intaktes Proinsulin ist bei – 20 °C mehr als 2 Jahre stabil. Mehrmaliges Auftauen und Einfrieren ist zu vermeiden.

### Serum

Vollblut innerhalb von 4 Stunden zentrifugieren. Intakt Proinsulin wird durch Proteasen in Serum abgebaut, Serum nicht länger als 1 Tag bei 2–8 °C Lagerung. Serum im Assay einsetzen oder in Aliquotes bei -20 °C lagern.

Weitere Informationen zur Probenstabilität: Pfützner et al. Clinical and laboratory evaluation of a new specific ELISA for intact proinsulin. Clin Lab 51: 243-249, 2005.

## Testdurchführung

### BEMERKUNG

Um im Cut-off Bereich (7 pmol/l) eine optimale Differenzierung zu erreichen wird empfohlen im Test die Standards **A** bis **E** (0 bis ~ 60 pmol/l) einzusetzen und die Extinktion bei 450 nm mit Referenzfilter 590 – 650 nm zu messen. Eine zweite Messung von Standard **A** bis **F** (0 bis ~ 140 pmol/l) kann durchgeführt werden bei 405 nm mit Referenzfilter 590 – 650 nm.

Vor Beginn, alle Reagenzien mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur (20-25°C) stehen lassen.

- 1 Die benötigten Teststreifen **1** vorbereiten. Die Kavitäten für Standards, Kontrollen und Proben festlegen.
- 2 50 µl der Blockierungspuffer-Gebrauchslösung **2** in jede Kavität pipettieren.
- 3 50 µl der Standards **A** bis **F**, Kontrollen 1 und 2 (**L** und **H**), sowie Patientenseren in die entsprechenden Kavitäten pipettieren.
- 4 Die Teststreifen abdecken und 60 Minuten bei Raumtemperatur (20–25°C) unter Schütteln auf einem ELISA-Plattenschüttler (400 rpm) inkubieren.
- 5 Nach der Inkubation die Kavitäten absaugen unter Verwendung von einem Plattenwascher oder manuell dekantieren durch Umdrehen der Platte. Die Kavitäten 3 x mit 300 ml verdünnter Waschlösung waschen. Nach dem letzten Waschvorgang die Platte vorsichtig auf einer trockenen, sauberen und saugfähigen Fläche ausklopfen, um die überschüssige Waschlösung zu entfernen.
- 6 100 µl Antikörper-HRP-Konjugat **3** in jede Kavität pipettieren.
- 7 Die Teststreifen abdecken und 60 Minuten bei Raumtemperatur (20–25°C) unter Schütteln auf einem ELISA-Plattenschüttler (400 rpm) inkubieren.
- 8 Waschvorgang wie unter 5. beschrieben wiederholen.
- 9 150 µl TMB Substrat **4** in die Kavitäten pipettieren und bei Raumtemperatur 15–25 Minuten unter Schütteln auf einem ELISA-Plattenschüttler (400 rpm) inkubieren.
- 10 100 µl Stopplösung **6** in jede Kavität pipettieren und die Platte etwa 5 Sekunden auf einem Plattenschüttler schütteln und innerhalb von 15 Minuten messen.
- 11 Die Absorption jeder Kavität bei 450 nm, Standard **A** bis **E** (ggf. bei 405 nm, Standard **A** bis **F**) mit Hilfe eines ELISA-Plattenlesegerät messen; als Referenzfilter 590–650 nm verwenden.
- 12 Bei Bedarf, Probenverdünnung mit 0-Standard durchführen. (empfohlene Verdünnung 1:4)

Protokolle für die verschiedene automatischen ELISA Systeme sind verfügbar

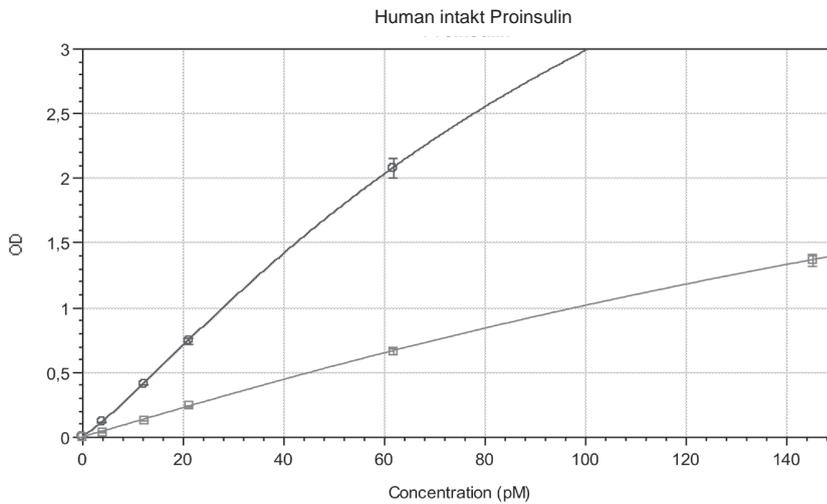
## Ergebnisanalyse

Eine Standardkurve kann erstellt werden, indem die Standardkonzentration auf der x-Achse (lineare Skala) gegen die Extinktion auf der y-Achse (lineare Skala) gesetzt wird. Die Konzentrationen von intaktem Proinsulin der Patientenserien können dann mit Hilfe der Standardkurve abgelesen werden. Eine 4-Parameter-Methode sollte zur automatischen Datenreduktion verwendet werden.

### ERGEBNISSE 450 UND 405 nm

(nur Beispieldaten, nicht für die Berechnung der tatsächlichen Ergebnisse verwenden)

STANDARD	pmol/l	Extinction at 450 nm	Extinction at 405 nm
A	0	0,003	0,002
B	3,9	0,118	0,04
C	12,3	0,409	0,133
D	21,1	0,746	0,238
E	61,8	2,077	0,663
F	145,3	-	1,367
L-Kontrolle 1	15,2 (9,8 - 20,5)	0,522	0,168
H-Kontrolle 2	39,2 (29,4 - 48,9)	1,432	0,458



4-P Fit:  $y = (A - D) / (1 + (x/C)^B) + D$ :

	A	B	C	D	R <sup>2</sup>
○ Std1 (STD#1: Concentration vs MeanValue)	0.00505	1.19	123	6.78	1
□ Std2 (STD#2: Concentration vs MeanValue)	0.000551	1.06	355	4.88	1

Weighting: Fixed

## Referenzwerte\*

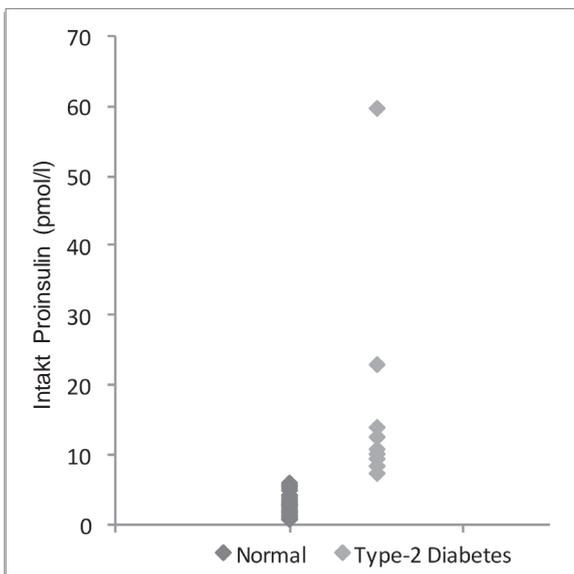
Der Normalwert (N=32) für intaktes Proinsulin in EDTA-Plasma wurde mit dem Human Intakt Proinsulin ELISA an einem Kollektiv von gesunden Männern und Frauen ermittelt.

- Mittelwert: 2.67 +/- 1.54SD pmol/l.

## GESUNDE PROBANDEN (N=32) VERSUS TYP-2-DIABETES-PATIENTEN - HOMA SCORE > 2 (N=11)

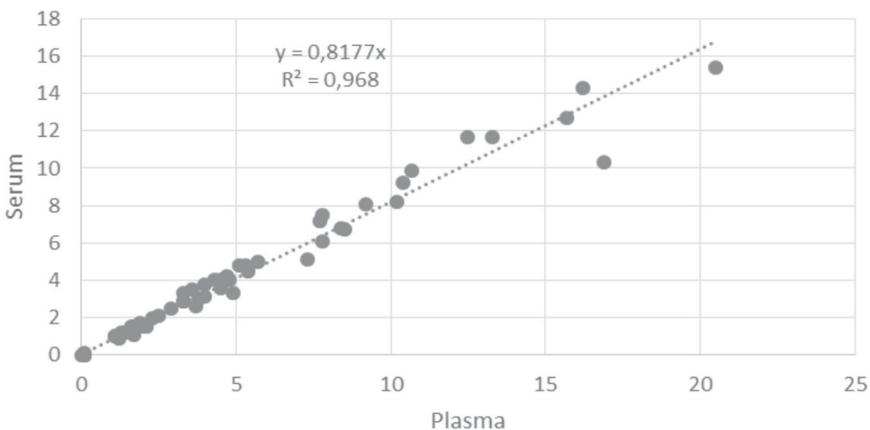
- Nüchternwerte:  $\leq 7$  pmol/l
- Nüchternwerte  $\leq 7$  pmol/l (WHO 09/296) werden als normal eingestuft.
- Nüchternwerte  $> 7$  pmol/l (WHO 09/296) deuten auf eine progressive  $\beta$ -Zell-Dysfunktion, Insulinresistenz und möglicherweise Typ-2-(Prä-)Diabetes hin. Ein solcher Wert ist auch ein Hochrisikoindikator für Herz-Kreislauf-Erkrankungen.

### Gesunde Probanden



### Intakt Proinsulin Korrelation Serum - EDTA Plasma

Im Vergleich zu EDTA Plasma sind Serum Werte 15 bis 20 % niedriger (N=58)



\* Ist in der Literatur für Intakt Proinsulin ein cut-off Wert 11 pmol/l angegeben - ältere Assayversion mit WHO-Standard 84/611 Kalibrierung.

## Intakt Proinsulin – Glukosetoleranztest

Diabetes mellitus des Typs 2 ist eine komplexe Erkrankung, die in der Regel mit einer genetisch determinierten  $\beta$ -Zell-Dysfunktion, einer erhöhten hormonellen Aktivität des viszeralen Fettgewebes und einer metabolischen Insulinresistenz einhergeht. Intaktes Proinsulin ist ein direkter Biomarker für die Funktionalität der  $\beta$ -Zellen und ein spezifischer indirekter Biomarker für eine klinisch relevante Insulinresistenz, wenn die morgendlichen Nüchternwerte erhöht sind [1-3]. In der Mehrzahl der Fälle geht eine  $\beta$ -Zell-Dysfunktion mit Erhöhung der intakten Proinsulinspiegel der klinischen Manifestation des Typ-2-Diabetes voraus. Bis zu 30 % der insulinresistenten und (prä-)diabetischen Patienten bleiben aufgrund von normalen Blutzucker- und HbA1c-Spiegeln undiagnostiziert. Die Früherkennung der Insulinresistenz ist von großer Bedeutung, da viele Typ-2-Diabetes-Patienten bereits zum Zeitpunkt der ersten klinischen Diagnose irreversible kardiovaskuläre Schäden aufweisen und einem hohen Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse ausgesetzt sind. Immer noch sterben 75 % der T2D-Patienten an kardiovaskulären Ereignissen, während dies bei nur 35 % der Patienten mit Typ-1-Diabetes der Fall ist.

### FALLSTUDIE

Diese Situation zeigt sich am deutlichsten im Rahmen eines oralen Glukosetoleranztests (oGTT). Zwanzig normale Personen (10 männlich, 10 weiblich, Alter zwischen 29 und 83 Jahren) unterzogen sich einem oGTT [4]. Glukose, HbA1c, Insulin und intaktes Proinsulin wurden im Nüchternzustand (Zeitpunkt 0), 1 Stunde und 2 Stunden nach oraler Gabe von 75 Gramm Glukose gemessen. Intaktes Proinsulin wurde mit dem TECOmedical Intakt Proinsulin ELISA bestimmt.

Vier Patienten wiesen auffällige Ergebnisse auf, ihre Glukose-, Insulin- und HbA1c-Spiegel waren im Nüchternzustand und nach 2 Stunden normal, auch der Wert für intaktes Proinsulin war im Nüchternzustand normal, jedoch nach 2 Stunden deutlich erhöht ( $> 7$  pmol/l). Diese Patientenfälle werden nachfolgend ausführlicher beschrieben. Alle 4 Patienten entwickelten einen klinisch manifesten Typ-2-Diabetes 3-4 Jahre nachdem ersten oGTT. Alle anderen Personen (16) zeigten normale Werte für alle Marker und erkrankten nicht.

### FALL1

Mann, 83 Jahre alt, (BMI: 29,5 kg/m<sup>2</sup>) mit kontrollierter Hypertonie und Typ-2-Diabetes in der Familienanamnese (Mutter). Während des oGTT im Jahr 2011 war HbA1c normal (5,7 %). Die oGTT-Ergebnisse waren wie folgt:

	GLUKOSE	INTAKTES PROINSULIN
Normalwert	80-120 mg/dl	$< 7$ pmol/l
0 h	104	1,56
2 h	67	11,94

Ende 2014, wurde T2D bei diesem Patienten klinisch bestätigt, 2015 war die Erkrankung durch Metformin-Medikation unter Kontrolle.

#### FALL 2

Frau, 83 Jahre alt, (BMI: 28,5 kg/m<sup>2</sup>) mit kontrollierter Dyslipidämie und Hypertonie, kein T2D in der Familienanamnese. Beide Elternteile waren 25 Jahre zuvor an Myokardinfarkt gestorben. Während des oGTT im Jahr 2011 war HbA1c normal (5,5 %). Die oGTT-Ergebnisse lauteten wie folgt:

	GLUKOSE	INTAKTES PROINSULIN
Normalwert	80-120 mg/dl	< 7 pmol/l
0 h	86	2,36
2 h	126	10,21

Die Patientin wurde anschließend halbjährlich untersucht. Anfang 2015 stieg der Nüchternwert für intaktes Proinsulin plötzlich auf 12,3 pmol/l. T2D manifestierte sich bei einem weiteren oGTT (Glukose-werte: Nüchternwert 123 mg/dl, 2-Stunden-Wert 196 mg/dl). Der T2D wurde medikamentös erfolgreich behandelt.

---

#### FALL 3

Frau, 46 Jahre alt, (BMI: 34,2 kg/m<sup>2</sup>) mit manifester Adipositas. Dyslipidämie und Hyperurikämie in der Familienanamnese und T2D bei beiden lebenden Elternteilen. Während des oGTT im Jahr 2011 war HbA1c normal (5,6 %). Die oGTT-Ergebnisse waren wie folgt:

	GLUKOSE	INTAKTES PROINSULIN
Normalwert	80-120 mg/dl	< 7 pmol/l
0 h	94	1,88
2 h	72	12,45

Die Patientin wurde anschließend regelmäßig untersucht. Obwohl die Patientin 15 kg an Gewicht abnehmen konnte, wurde Ende 2013 während eines weiteren oGTT ein klinisch manifester T2D diagnostiziert (Glukosewerte: Nüchtern wert 105 mg/dl, 2-Stunden-Wert 211 mg/dl).

---

#### FALL 4

Mann, 29 Jahre alt, (BMI: 38,3 kg/m<sup>2</sup>) mit morbider Adipositas. Vater war mit 48 Jahren an Myokardinfarkt gestorben, keine Krankengeschichte bei der Mutter. Während des oGTT im Jahr 2011 war HbA1c normal (5,6 %). Die oGTT-Ergebnisse lauteten wie folgt:

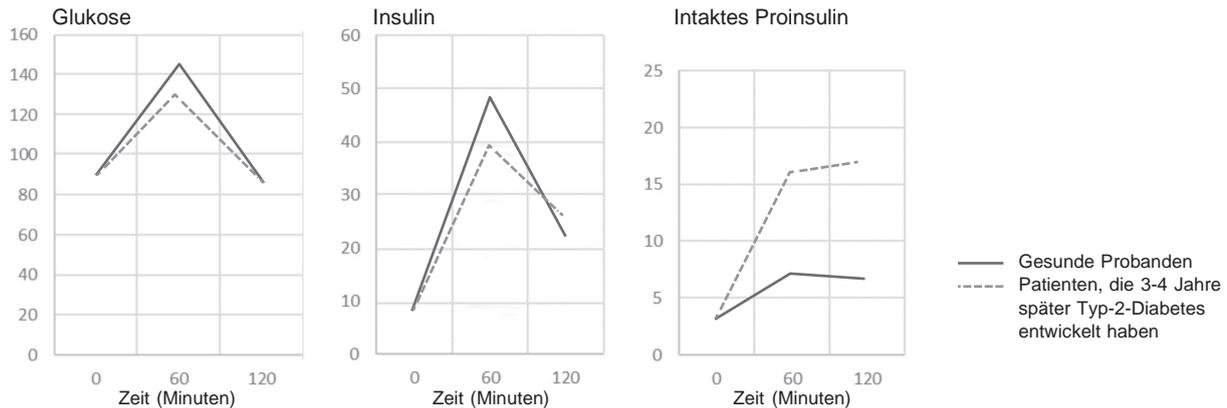
	GLUKOSE	INTAKTES PROINSULIN
Normalwert	80-120 mg/dl	< 7 pmol/l
0 h	86	3,55
2 h	92	11,94

Der Patient wurde anschließend regelmäßig untersucht. Versuche, das Gewicht zu reduzieren, blieben erfolglos. Ein klinisch manifester T2D wurde Ende 2014 während eines weiteren oGTT diagnostiziert (Glukosewerte: Nüchtern wert 117 mg/dl, 2-Stunden-Wert 243 mg/dl). Nach Konsultation stimmte der Patient einer bariatrischen Operation und einem Magenband zu. Der Gewichtsverlust betrug mehr als 30 kg in 6 Monaten (BMI: 26,2 kg/m<sup>2</sup>).

## Schlußfolgerungen

In allen 4 Fällen wurde die spätere Entwicklung des Typ-2-Diabetes bereits 3-4 Jahre zuvor anhand der erhöhten 2-Stunden-Werte für intaktes Proinsulin im Rahmen des oGTT vorhergesagt. Alle anderen 16 Patienten wurden ebenfalls über 6 weitere Jahre beobachtet, es wurde kein T2D diagnostiziert. Die nachfolgende Abbildung zeigt die oGTT-Ergebnisse für beide Patientengruppen während der initialen oGTT.

Intaktes Proinsulin zeigt Prädiabetes des Typs 2 an, bevor Veränderungen in den Glukosewerten nachweisbar sind. Es kann die Entwicklung des Typ-2-Diabetes bis zu 4 Jahre vor der klinischen Diagnosestellung vorhersagen. Glukose, Insulin und HbA1c können Prädiabetes nicht erkennen und eine spätere T2D-Entwicklung nicht vorhersagen.



Profile für Glukose, Insulin und intaktes Proinsulin im oGTT von Patienten, die innerhalb von 4 Jahren nach diesem Test T2D entwickelten. Die Ergebnisse werden mit gesunden Personen, die keinen T2D entwickelten, verglichen.

> Nur intaktes Proinsulin sagte eine spätere T2D-Entwicklung vorher.  
 > (Glukose in mg/dl; Insulin in µU/ml); intaktes Proinsulin in pmol/l).

### KLINISCHE INTERPRETATION DER INTAKTEN PROINSULIN-SPIEGEL WÄHREND DES oGTT:

- Werte  $\leq 7$  pmol/l (WHO 09/296) werden als normal eingestuft und deuten auf eine normale  $\beta$ -Zellfunktion und kein Risiko für Typ-2-Diabetes und Herz-Kreislauf-Erkrankungen hin.
- Werte  $> 7$  pmol/l (WHO 09/296) weisen auf progressive  $\beta$ -Zell-Dysfunktion und Insulinresistenz hin und sind hochgradig prädiktiv für die Entwicklung des Typ-2-Diabetes innerhalb von 4 Jahren.

## Leistungsmerkmale des Tests

### STANDARD

Dieser Test wurde gegen den internationalen Standard für intaktes Proinsulin (WHO 09/296), National Institute for Biological Standards and Control, Hertfordshire, England, standardisiert.

### PRÄZISION (INTRA-ASSAY)

N = 6	MITTELWERT pmol/l	%CV
Probe 1	5,38	2,2
Probe 2	9,31	1,8

### PRÄZISION (INTER-ASSAY)

N = 5	MITTELWERT pmol/l	%CV
Probe 1	5,27	4,0
Probe 2	9,06	1,8
Probe 3	16,68	3,1
Probe 4	32,46	1,7

## DETEKTIONSLIMIT

Der Nullstandard wurde 20 x getestet und daraus Mittelwert und Standardabweichung berechnet. Das untere Detektionslimit (3 SD vom Mittelwert) lag bei 0.15 pmol/L (450 nm) und bei 0.22 pmol/l (405nm)

- LLOQ = 0.49 pmol/l
- ULOQ = höchster Standard (450 oder 405 nm)

## WIEDERFINDUNGSTEST

SERUM PROBE	PROINSULIN ZUGEFÜGT pmol/l	ERWARTET pmol/l	ERGEBNIS pmol/l	WIEDERF. (%)
Serum 1	0	3,98	3,98	100,00
	10	13,98	14,80	109,40
Serum 2	0	13,34	13,34	100,00
	10	23,34	23,32	106,20
Serum 3	0	3,68	3,68	100,00
	10	13,68	14,19	107,00
Serum 4	0	4,62	4,62	100,00
	10	14,62	12,53	88,80
Serum 5	0	5,01	5,01	100,00
	10	15,01	15,37	106,30

SERUM PROBE	PROINSULIN ZUGEFÜGT pmol/l	ERWARTET pmol/l	ERGEBNIS pmol/l	WIEDERF. (%)
Serum 1	0	51,10	51,10	100,00
	10	61,10	62,05	110,90
Serum 2	0	54,13	54,13	100,00
	10	64,13	63,24	107,80
Serum 3	0	47,15	47,15	100,00
	10	57,15	56,14	107,20
Serum 4	0	36,85	36,85	100,00
	10	46,85	46,66	108,20
Serum 5	0	38,38	38,38	100,00
	10	48,38	47,74	107,30

## VERDÜNNUNGSTEST IN PLASMA UND SERUM

SERUM PROBE	VER-DÜNNUNGS-FAKTOR	ERWARTET pmol/l	ERGEBNIS pmol/l	WIEDERF. (%)
Serum 1	1	3,98	3,98	100,00
	2	1,99	1,93	97,00
	4	1,00	0,99	99,50
Serum 2	1	13,34	13,34	100,00
	2	6,67	6,97	104,50
	4	3,34	3,90	116,90
Serum 3	1	3,68	3,68	100,00
	2	1,84	1,84	100,00
	4	0,92	0,93	101,10
Serum 4	1	4,62	4,62	100,00
	2	2,31	2,58	111,70
	4	1,16	1,31	113,40
Serum 5	1	5,01	5,01	100,00
	2	2,51	2,52	100,60
	4	1,25	1,45	115,80

PLASMA PROBE	VER-DÜNNUNGS-FAKTOR	ERWARTET pmol/l	ERGEBNIS pmol/l	WIEDERF. (%)
Plasma 1	1	51,50	51,10	100,00
	2	25,55	29,44	115,20
	4	12,78	15,78	123,50
Plasma 2	1	54,13	54,13	100,00
	2	27,07	29,87	110,40
	4	13,53	15,97	118,00
Plasma 3	1	47,15	47,15	100,00
	2	23,58	26,63	113,00
	4	11,79	15,01	127,30
Plasma 4	1	36,85	36,85	100,00
	2	18,43	19,64	106,60
	4	9,21	11,37	123,40
Plasma 5	1	38,38	38,38	100,00
	2	19,19	21,30	111,00
	4	9,60	11,31	117,90

## INTERFERENZEN

Patientenproben können humane anti-Maus-Antikörper (HAMAs) enthalten, die zu inkorrekten Ergebnissen führen können. Um Interferenzen durch HAMAs zu minimieren, wird im Test ein HAMA-Blockierungspuffer verwendet. Eine unvollständige Eliminierung der HAMA Interferenz bei allen Patientenproben kann nicht ausgeschlossen werden. Intakt Proinsulin Resultate, die nicht mit den klinischen Diagnosen und der Patientenhistorie übereinstimmen, sollten überprüft werden. Proben von LADA-Patienten können sehr hohe Konzentrationen an HAMAs und anderen nicht-spezifischen Antikörpern enthalten.

## KREUZREAKTIONEN

Für die genannten Konzentrationen der folgenden Peptide wurden keine Kreuzreaktionen gemessen:

Humanes Insulin	< 10 000 pmol/L
Humane 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

\* liegt in Serum- und Plasmaproben nicht vor

## BEMERKUNG

Die Daten, die in dieser Anleitung aufgeführt sind, dienen nur zur Illustration. Jedes Labor sollte eigene Normal- und pathologische Bereiche für intaktes Proinsulin gemäß GLP-Richtlinien ermitteln und festlegen.

# TECO® human Intakt Proinsulin

## TESTDURCHFÜHRUNG – KURZBESCHREIBUNG

- Proben und Reagenzien auf RT bringen. Proben durchmischen.
- Proinsulin 0-Standard **A** : 2 Flaschen lyophil. 0-Standard mit je 3 ml Aqua dest auflösen.
- Blockierungspuffer-Gebrauchslösung vorbereiten: 1 Teil Blockierungspuffer **2** plus 4 Teile 0-Standard **A** : z.B. 1,2 ml Blockierungspuffer + 4,8 ml Proinsulin 0-Standard mischen (Aufbewahren bei -20°C)
- Waschlösung vorbereiten: 1 Flasche (40 ml) konzentrierter Waschpuffer **5** bis auf 400 ml Endvolumen mit Aqua dest auffüllen.
- Lyophilisierte Standard **B** bis **F** und Kontrollen **L** + **H** mit je 1 ml Aqua dest rekonstituieren.

benötigte Teststreifen **1** vorbereiten

**50 µl** Blockierungspuffer-Gebrauchslösung in alle Kavitäten pipettieren

**50 µl** Standards **A** bis **F** Kontrollen **L** + **H** und Proben pipettieren

**60 min** bei 20–25 °C auf einem Plattenschüttler bei 400 rpm inkubieren

Absaugen und **3 x** mit **300 µl** Waschpuffer waschen, absaugen und auf saugfähiger Unterlage ausklopfen

**100 µl** Antikörper-HRP-Konjugat **3** in alle Kavitäten pipettieren.

**60 min** bei 20–25 °C auf einem Plattenschüttler bei 400 rpm inkubieren

Absaugen und **3 x** mit **300 µl** Waschlösung waschen, absaugen und auf saugfähiger Unterlage ausklopfen

**150 µl** TMB Substrat **4** in alle Kavitäten pipettieren.

**15-25 min** bei 20 – 25° C auf einem Plattenschüttler bei 400 rpm inkubieren

**100 µl Stopplösung** **6** in alle Kavitäten pipettieren und 5 Sekunden schütteln

**Extinktion bei 450 nm** bestimmen, Standard **A** bis **E**

**Extinktion bei 405 nm** bestimmen, Standard **A** bis **F**

(Quantifizierungssoftware, 4-Parameter:

$y = (A-D)/(1+(x/C)^B)+D$ ) Referenzwellenlänge 590–650 nm)



Bitte lesen Sie die Testanleitung bevor Sie mit der Kurzbeschreibung arbeiten.