

# C-Peptide



**Only for in-vitro diagnostic use**

## **Instructions for use / Instrucciones de uso**

|   |    |
|---|----|
| English .....   | 2  |
| Español .....   | 7  |
| Bibliography / Bibliografía .....                       | 14 |
| Abbreviations / Abreviaciones .....                     | 14 |
| Packaging materials / Materiales de embalaje .....      | 14 |
| Symbols Key / Símbolos .....                            | 15 |
| Summary of Test Procedure / Resumen de la técnica ..... | 16 |

## ENGLISH

### 1. INTRODUCTION

---

C-peptide is the abbreviation for connecting peptide; it is a 31-aminoacid peptide. C-peptide of insulin is the C-terminal cleavage product produced during processing of the insulin prohormone to the mature insulin molecule. Proinsulin is cleaved when it is released from the pancreas into the blood - one C-peptide for each insulin molecule. C-Peptide is devoid of any biological activity but appears to be necessary to maintain the structural integrity of Insulin.

In-vitro determination of Insulin and C-Peptide level help in differential diagnosis of liver disease, acromegaly, Cushing syndrome, familial glucose intolerance, Insulinemia, renal failure, ingestion of accidental oral hypoglycaemic drugs or C-peptide induced factitious hypoglycaemia.

Newly diagnosed diabetes patient often get their C-peptide levels measured, to find if they have type 1 diabetes or type 2 diabetes. The pancreas of patients with type 1 diabetes is unable to produce insulin and they will therefore usually have a decreased level of C-peptide, while C-peptide levels in type 2 patients is normal or higher than normal. Measuring C-peptide in patients injecting insulin can help to determine how much of their own natural insulin these patients are still producing.

C-peptide assays may be analytically more sensitive than insulin assays. Measurement of the C-peptide may be useful in evaluating endogenous insulin secretion in a variety of clinical conditions. Insulin and C-Peptide are secreted into portal circulation in equimolar concentrations; fasting levels of C-Peptide are 5 – 10 fold higher than those of Insulin owing to the longer half-life of C-Peptide. The liver does not extract C-Peptide however; it is removed from the circulation by degradation in the kidneys with a fraction passing out unchanged in urine. Hence the urine C-Peptide levels correlate well with fasting C-Peptide levels in serum.

### 2. INTENDED USE

---

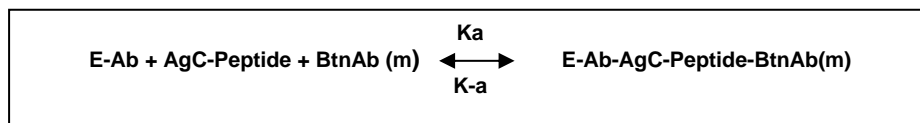
Immunoenzymatic colorimetric method for quantitative determination of C-Peptide in human serum or plasma.

### 3. PRINCIPLE OF THE ASSAY

---

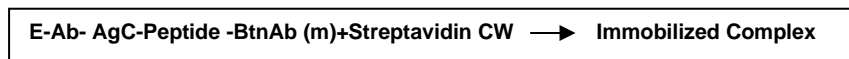
In this method, C-Peptide calibrators, patient specimens and/or controls containing the native antigen are first added to streptavidin coated wells. Biotinylated monoclonal and horseradish peroxidase (HRP) labelled antibodies are added and the reactants are mixed. The different types of antibodies used have high affinity and specificity and are directed against distinct and different epitopes of C-Peptide. Reaction between the various C-Peptide antibodies and native C-Peptide occurs in the microwells without competition or steric hindrance forming a soluble sandwich complex.

The interaction is illustrated by the following equation:



|                                |  |
|--------------------------------|--|
| BtnAb(m)                       | Biotinylated Monoclonal Antibody (Excess Quantity) |
| AgC-Peptide                    | Native Antigen (Variable Quantity)                 |
| E-Ab                           | enzyme labeled Antibody (Excess Quantity)          |
| HRP-Ab(p)-AgC-Peptide-BtnAb(m) | Antigen-Antibodies Sandwich Complex                |
| Ka                             | Rate Constant of Association                       |
| K-a                            | Rate Constant of Dissociation                      |

Simultaneously, the complex is fixed to the well through the high affinity reaction of streptavidin and biotinylated antibody. This interaction is illustrated below:



|                     |                                    |
|---------------------|------------------------------------|
| Streptavidin CW     | Streptavidin immobilized on well.  |
| Immobilized Complex | Antibodies-Antigen sandwich bound. |

After equilibrium is attained, the antibody-bound fraction is separated from unbound antigen by aspiration. The native antigen concentration is directly proportional to the HRP activity in the antibody-bound fraction. The activity of the conjugated HRP is quantitated by reaction with TMB substrate to produce blue colour. The reaction is terminated by adding stop solution which turns the blue colour into yellow. The absorbance is measured on a plate reader.

### 4. MATERIALS

---

#### 4.1. Reagents supplied

- **Microtiterplate:** 12 breakapart 8-well snap-off strips coated with streptavidin; in aluminium foil.
- **Conjugate:** 1 bottle containing 13 ml of horseradish peroxidase labelled anti-C-Peptide antibodies and biotinylated monoclonal mouse anti-C-Peptide antibodies; contains  $\leq 0.0015\%$  (v/v) CMIT/ MIT (3:1).
- **TMB Substrate Solution:** 1 bottle containing 15 ml 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine ( $\text{H}_2\text{O}_2$ -TMB 0.26 g/l) (avoid any skin contact); contains  $\leq 0.0015\%$  (v/v) CMIT/ MIT (3:1).
- **Wash solution 50x conc.:** 1 bottle containing 20 ml (NaCl 45 g/l, Tween-20 55 g/l); contains  $< 0.06\%$  (v/v) CMIT/MIT (3:1).
- **Stop Solution:** 1 bottle containing 15 ml sulphuric acid, 0.15 mol/l (avoid any skin contact).

- **Standards:** 6 bottles containing lyophilised standards; contain  $\leq 0.0015\%$  (v/v) CMIT/ MIT (3:1).  
The approx. concentrations after reconstitution are:

|            |            |
|------------|------------|
| Standard 0 | 0 ng/ml    |
| Standard 1 | 0.2 ng/ml  |
| Standard 2 | 1.0 ng/ml  |
| Standard 3 | 2.0 ng/ml  |
| Standard 4 | 5.0 ng/ml  |
| Standard 5 | 10.0 ng/ml |

For hazard and precautionary statements see 13.1.

## 4.2. Materials supplied

- 1 Cover foil
- 1 Instructions for use (IFU)

## 4.3. Materials and Equipment needed

- ELISA microwell plate reader, equipped for the measurement of absorbance at 450 nm, 620-630 nm
- Manual or automatic equipment for rinsing wells
- Distilled water
- Timer

## 5. STABILITY AND STORAGE

---

The closed reagents are stable up to the expiry date stated on the label when stored at 2...8° C in the dark.  
Opened reagents are stable for 60 days when stored at 2...8° C.

## 6. REAGENT PREPARATION

---

*It is very important to bring all reagents, samples and standards to room temperature (22...28°C) for at least 30 minutes before starting the test run! At the end of the assay, store immediately the reagents at 2-8°C; avoid long exposure to room temperature.*

### 6.1. Microtiterplate

The ready to use break apart snap-off strips are coated with streptavidin. Store at 2...8°C. Open the bag only when it is at room temperature. *Immediately after removal of strips, the remaining strips should be resealed in the aluminium foil along with the desiccant supplied and stored at 2...8°C. After first opening stability until expiry date when stored at 2...8°C.*

### 6.2. Conjugate

The conjugate is ready to use.

### 6.3. Standards

The standards are lyophilised. Reconstitute each standard with 2 ml of distilled or deionised water.

Once reconstituted the standards are stable 7 days at 2...8°C.

In order to store for a longer period aliquot the reconstituted standards in vials and store at -20°C (stable for 6 months). Do not freeze thaw more than once.

A preservative has been added.

The standards, human serum based, were calibrated using a reference preparation, which was assayed against the WHO 1st IRR 84/510.

### 6.4. TMB Substrate Solution

The bottle contains 15 ml of a tetramethylbenzidine/hydrogen peroxide system. The reagent is ready to use and has to be stored at 2...8°C in the dark. *The solution should be colourless or could have a slight blue tinge. If the substrate turns into blue, it may have become contaminated and should be thrown away.*

### 6.5. Stop Solution

The bottle contains 15 ml 0.15 M sulphuric acid solution. This ready to use solution has to be stored at 2...8°C.

### 6.6. Wash Solution

Dilute the concentrated wash solution to 1000 ml distilled or deionised water. For smaller volumes respect the 1:50 ratio. The diluted wash solution is stable for 30 days at 2...8°C.

## 7. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

---

Follow Good laboratory procedures for handling blood products.

For accurate comparison to established normal values, a fasting morning serum sample should be obtained.

In order to obtain serum, the blood should be collected in a venipuncture tube without additives or anti-coagulants. Allow the blood to clot. Centrifuge the specimen to separate the serum from the cells.

Samples may be refrigerated at 2...8°C for a maximum period of 5 days. If the specimen(s) cannot be assayed within this time, the sample(s) may be stored at temperatures of -20°C for up to 30 days.

Avoid repetitive freezing and thawing.

Patient specimens with C-peptide concentrations above 10.0 ng/ml may be diluted (for example 1/10 or higher) with zero standard (C-peptide 0 ng/ml) and re-assayed. The sample's concentration is obtained by multiplying the result by the dilution factor.

## 8. ASSAY PROCEDURE

---

### 8.1. Test Preparation

Please read the test instructions for use carefully **before** performing the assay. Result reliability depends on strict adherence to the instructions for use as described. Prior to commencing the assay, the distribution and identification plan for all specimens and controls should be carefully established. Select the required number of microtiter strips or wells and insert them into the holder. Pipetting of samples should not extend beyond ten minutes to avoid assay drift. If more than one plate is used, it is recommended to repeat the dose response curve. Please allocate at least:

|         |              |                |
|---------|--------------|----------------|
| 1 well  | e.g. A1)     | for blank      |
| 2 wells | (e.g. B1+C1) | for standard 0 |
| 2 wells | (e.g. D1+E1) | for standard 1 |
| 2 wells | (e.g. F1+G1) | for standard 2 |
| 2 wells | (e.g. H1+A2) | for standard 3 |
| 2 wells | (e.g. B2+C2) | for standard 4 |
| 2 wells | (e.g. D2+E2) | for standard 5 |

*It is recommended to determine standards and patient samples in duplicate.*

Perform all assay steps in the order given and without any appreciable delays between the steps.

A clean, disposable tip should be used for dispensing each standard and each patient sample.

1. Dispense 50 µl standards and samples (and controls) into their respective wells.
2. Dispense 100 µl conjugate in each well except blank. Cover with a foil.
3. **Incubate for 2 hours at room temperature (22 – 28°C).**
4. When incubation has been completed, remove the foil, aspirate the content of the wells and wash each well three times with 300µl diluted wash solution. Avoid overflows from the reaction wells.

**Important note:** During each washing step, gently shake the plate for 5 seconds and remove excess solution by tapping the inverted plate on an absorbent paper towel.

**Automatic washer:** In case you use automatic equipment, wash the wells at least 5 times.

*Note: Washing is critical! Insufficient washing results in poor precision and falsely elevated absorbance values.*

5. Dispense 100 µl TMB Substrate Solution into all wells.
6. **Incubate for 15 min at room temperature (+22...+28°C) in the dark.**
7. Dispense 100 µl Stop Solution into all wells in the same order and at the same rate as for the TMB Substrate Solution. Shake the microplate gently.  
*Any blue colour developed during the incubation turns into yellow.*
8. Measure the absorbance of the specimen at 450 nm against a reference wavelength of 620-630 nm or against blank within 5 minutes.

## 9. QUALITY CONTROL

---

Each laboratory should assay controls at levels in the low, medium and high ranges of the dose response curve for monitoring assay performance. These controls should be treated as unknowns and values determined in every test procedure performed. Quality control charts should be maintained to follow the performance of the supplied reagents. Pertinent statistical methods should be employed to ascertain trends. Significant deviation from established performance can indicate unnoticed change in experimental conditions or degradation of kit reagents. Fresh reagents should be used to determine the reason for the variations.

## 10. RESULTS

---

### 10.1. Note

The absorbance (OD) of standard 5 should be  $\geq 1.0$ .

The optical densities (O.D.s) of some standards and samples may be higher than 2.0, in such a case, they could be out of the measurement range of the microplate reader. It is therefore necessary, for O.D.s higher than 2.0, to perform a reading at 405 nm (=wavelength of peak shoulder) in addition to 450 nm (peak wavelength) and 620 (reference filter for the subtraction of interferences due to the plastic).

For microplate readers unable to read the plate at 3 wavelengths at the same time, it is advisable to proceed as follows:

- Read the microplate at 450 nm and at 620 nm.
- Read again the plate at 405 nm and 620 nm.
- Find out the wells whose ODs at 450 nm are higher than 2.0
- Select the corresponding ODs read at 405 nm and multiply these values at 405 nm by the conversion factor 3.0 (where  $OD_{450}/OD_{405} = 3.0$ ), that is:  $OD_{450\text{ nm}} = OD_{405\text{ nm}} \times 3.0$ .

Warning: The conversion factor 3.0 is suggested only. For better accuracy, the user is advised to calculate the conversion factor specific for its own reader.

### 10.2. Calculation of results

Calculate the mean absorbance for each point of the standard curve and each sample.

#### Standard Curve – Automatic method

Use the 4 parameters logistic – preferred – or the smoothed cubic spline function as calculation algorithm.

### Standard Curve – Manual method

A dose response curve is used to ascertain the concentration of C-Peptide in unknown specimens.

Record the OD obtained from the printout of the microplate reader. Plot the OD for each duplicate standard versus the corresponding C-Peptide concentration in ng/ml on linear graph paper (do not average the duplicates of the calibrators before plotting).

Draw the best-fit curve through the plotted points.

To determine the concentration of C-Peptide for an unknown, locate the average absorbance of the duplicates for each unknown on the vertical axis of the graph, find the intersecting point on the curve, and read the concentration (in ng/ml) from the horizontal axis of the graph (the duplicates of the unknown may be averaged as indicated).

### 10.3. Reference values

C-Peptide values are consistently higher in plasma than in serum; thus, serum is preferred. Based on the clinical data gathered in concordance with the published literature the following ranges have been assigned.

These ranges should be used as guidelines only:

Adult (Normal) 0.7 – 1.9 ng/ml

## 11. SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

---

The results refer to the groups of samples investigated; these are not guaranteed specifications.

### 11.1. Sensitivity

The lowest detectable concentration of C-Peptide that can be distinguished from the zero standard is 0.01 ng/ml at the 95% confidence limit.

### 11.2. Specificity

The cross reactivity of the C-peptide method to selected substances was evaluated by adding the interfering substance. The cross reactivity was calculated by deriving a ratio between dose of interfering substance to dose of C-Peptide needed to produce the same absorbance.

| Cross Reagent | Conc. tested | Obtained | Cross Reactivity |
|---------------|--------------|----------|------------------|
| C-Peptide     | ---          | ---      | 100 %            |
| Insulin       | 10000 µIU/ml | N.D.     | Not Detected     |
| Proinsulin    | 1000 ng/ml   | N.D.     | Not Detected     |

### 11.3. Precision

#### Intra Assay Variation

Within run variation was determined by replicate determination (16x) of three different control sera in one assay. The within assay variability is ≤ 6.2%.

#### Inter Assay Variation

Between run variation was determined by replicate measurements (20x) of three different control sera in different lots. The between assay variability is ≤ 10.0%.

### 11.4. Correlation with RIA

The C-Peptide was compared to another commercially available C-Peptide assay. 194 serum samples were analysed according in both test systems.

The linear regression curve was calculated:

$$y = 1.012 x + 0.025$$

$$r^2 = 0.991$$

y = C-Peptide Predicate kit

x = C-Peptide ELISA

## 12. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

---

Bacterial contamination or repeated freeze-thaw cycles of the specimen may affect the absorbance values.

## 13. PRECAUTIONS AND WARNINGS

---


- The test procedure, the information, the precautions and warnings in the instructions for use have to be strictly followed. The use of the testkits with analyzers and similar equipment has to be validated. Any change in design, composition and test procedure as well as for any use in combination with other products not approved by the manufacturer is not authorized; the user himself is responsible for such changes. The manufacturer is not liable for false results and incidents for these reasons. The manufacturer is not liable for any results by visual analysis of the patient samples.
- Only for in-vitro diagnostic use.
- All components of human origin used for the production of these reagents have been tested for anti-HIV 1+2 antibodies, anti-HCV antibodies and HBsAg and have been found to be non-reactive. Nevertheless, all materials should still be regarded and handled as potentially infectious.
- Do not interchange reagents or strips of different production lots.
- No reagents of other manufacturers should be used along with reagents of this test kit.

- Do not use reagents after expiry date stated on the label.
- Use only clean pipette tips, dispensers, and lab ware.
- Do not interchange screw caps of reagent vials to avoid cross-contamination.
- Close reagent vials tightly immediately after use to avoid evaporation and microbial contamination.
- After first opening and subsequent storage check conjugate and control vials for microbial contamination prior to further use.
- To avoid cross-contamination and falsely elevated results pipette patient samples and dispense conjugate without splashing accurately to the bottom of wells.
- Do not use heavily haemolysed or highly lipemic samples.
- Plate readers measure vertically. Do not touch the bottom of the wells.
- The incomplete or inaccurate liquid removal from the wells could influence the assay precision and/or increase the background. To improve the performance of the kit on automatic systems is recommended to increase the number of washes.
- Maximum precision is required for dispensation of the reagents.
- Avoid the exposure of TMB substrate to direct sunlight, metal or oxidants.
- Some reagents (wash solution) contain small amounts of CMIT/MIT as preservative. Avoid contact with skin or mucosa.
- Avoid contact with reagents containing hydrogen peroxide, sulphuric and preservatives, which may be toxic if ingested. Do not pipette by mouth.

### 13.1. Safety note for reagents containing hazardous substances

Reagents may contain CMIT/MIT (3:1) (refer to 4.1).

Therefore, the following hazard and precautionary statements apply.

|   |                |           |  |
|---|----------------|-----------|--|
|  | <b>Warning</b> | H317      | May cause an allergic skin reaction.                                       |
|   |                | P261      | Avoid breathing dust/fumes/gas/mist/vapours/spray.                         |
|   |                | P280      | Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection. |
|   |                | P302+P352 | IF ON SKIN: Wash with plenty of water.                                     |
|   |                | P333+P313 | If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/attention.           |
|   |                | P362+P364 | Take off contaminated clothing and wash it before reuse.                   |

Further information can be found in the safety data sheet.

### 13.2. Disposal Considerations

Residues of chemicals and preparations are generally considered as hazardous waste. The disposal of this kind of waste is regulated through national and regional laws and regulations. Contact your local authorities or waste management companies which will give advice on how to dispose hazardous waste.

For information about the packaging materials refer to PACKAGING MATERIALS.

## 14. ORDERING INFORMATION

---

|     |         |           |                     |
|-----|---------|-----------|---------------------|
| REF | DNOV112 | C-Peptide | (96 Determinations) |
|-----|---------|-----------|---------------------|

# ESPAÑOL

## 1. INTRODUCCIÓN

Péptido-C es la abreviatura para péptido de conexión, este es un péptido de 31 aminoácidos. El Péptido-C de la insulina es el producto C-terminal de la división generada durante el procesamiento de la prohormona insulina a la molécula de insulina madura. La proinsulina se divide cuando es liberada desde el páncreas a la sangre – una molécula de Péptido-C por cada molécula de insulina. El Péptido-C está desprovisto de alguna actividad biológica pero su aparición es necesaria para mantener la integridad estructural de la insulina.

La determinación in-vitro de los niveles de Insulina y el Péptido-C ayudan al diagnóstico diferencial de enfermedad del hígado, acromegalia, síndrome de Cushing, intolerancia familiar a la glucosa, insulinemia, falla renal, ingestión accidental de hipoglicemiantes orales ó Péptido-C inducido por hipoglucemia facticia.

Paciente recientemente diagnosticados con diabetes a menudo tienen medidos sus niveles de Péptido-C, para encontrar si ellos tienen Diabetes Tipo 1 o Diabetes Tipo 2. Los páncreas de los pacientes con diabetes tipo 1 no son capaces de producir insulina y usualmente tendrán los niveles de Péptido-C disminuidos, mientras que en pacientes con diabetes tipo 2 los niveles de Péptido-C están normales o más altos de lo normal. Medir Péptido-C en pacientes con insulina inyectada puede ayudar a determinar cuanta de su propia insulina están produciendo todavía.

Determinar Péptido-C puede ser analíticamente más sensible que determinar insulina. La medición de Péptido-C puede ser más útil en la evaluación de secreción de insulina endógena en una variedad de condiciones clínicas. La insulina y el Péptido-C son secretados dentro de la circulación portal en concentraciones equimolares; los niveles en ayunas de Péptido-C son 5 a 10 veces mayores que los de insulina debido a la vida media tan larga del Péptido-C. El hígado no extrae el Péptido-C, sin embargo; este es removido de la circulación por la degradación en los riñones con una fracción sin cambios que sale a través de la orina. Por lo tanto los niveles de Péptido-C correlacionan bien con los niveles séricos de Péptido-C en ayunas.

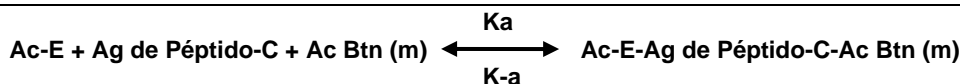
## 2. USO PREVISTO

Método inmunoenzimático colorimétrico para la determinación cuantitativa de Péptido-C en suero o plasma humano.

## 3. FUNDAMENTO DE LA PRUEBA

En este método, los calibradores de Péptido-C los especímenes de los pacientes y/o controles conteniendo el antígeno nativo son primero agregados a los pozos recubiertos con estreptavidina. Anticuerpos monoclonales biotinilados y anticuerpos marcados con peroxidasa de rábano (HRP) son agregados y los reactivos son mezclados. Los diferentes tipos de anticuerpos usados tienen alta afinidad y especificidad y están dirigidos contra distintos epítopes del Péptido-C. La reacción entre los diferentes anticuerpos anti-Péptido C y el Péptido-C nativo ocurre en los micropozos sin competencia o impedimento estérico formando un complejo en sándwich soluble.

La interacción es ilustrada por la siguiente ecuación:



Ac Btn (m) Anticuerpo monoclonal biotinilado (Exceso de cantidad)

Ag de Péptido-C Antígeno nativo (Cantidad variable)

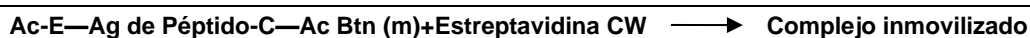
Ac-E Anticuerpo marcado con enzima (Exceso de cantidad)

Ac-HRP(p)- Ag de Péptido-C-Ac Btn: Complejo en sándwich antígeno-anticuerpo

Ka Tasa constante de asociación

K-a Tasa constante de disociación

Simultáneamente, el complejo es fijado a los pozos a través de una reacción de alta afinidad entre la estreptavidina y el anticuerpo biotinilado. La interacción está ilustrada a continuación:



Estreptavidina CW Estreptavidina inmovilizada sobre el pozo

Complejo Inmovilizado Anticuerpos-Antígeno en sándwich fijados.

Después que el equilibrio es alcanzado, la fracción ligada del anticuerpo es separada del antígeno no unido por aspiración. La concentración del antígeno nativo es directamente proporcional a la actividad de la HRP en la fracción ligada del anticuerpo. La actividad del conjugado con HRP es cuantificada por la reacción con el substrato TMB para producir color azul. La reacción es terminada por la adición de la solución STOP la cual cambia el color azul a amarillo. La absorbancia es medida sobre un lector de placa.

## 4. MATERIALES

### 4.1. Reactivos suministrados

- **Placa de Microtitulación:** 12 tiras de 8 pozos separables cubiertos con estreptavidina, en una bolsa de aluminio.
- **Conjugado:** Una botella contiene 13 ml de anticuerpos contra Péptido-C marcados con peroxidasa de rábano y anticuerpos monoclonales de ratón biotinilados anti-Péptido-C; contiene  $\leq 0,0015$  % (v/v) CMIT/MIT (3:1).
- **Solución substrato TMB:** 1 botella contiene 15 ml de 3,3',5, 5'-tetrametilbenzidina ( $\text{H}_2\text{O}_2$ -TMB 0.26 g/l) (evite cualquier contacto con la piel); contiene  $\leq 0,0015$  % (v/v) CMIT/MIT (3:1).
- **Solución de lavado concentrada 50X:** 1 botella contiene 20 ml (NaCl 45 g/l, Tween 20 55 g/l); contiene  $< 0.06$  % (v/v) CMIT/MIT (3:1).
- **Solución Stop:** 1 botella contiene 15 ml de ácido sulfúrico, 0.15 mol/l (evite el contacto con la piel).

- **Estándares:** 6 botellas que contienen estándares liofilizados; contienen  $\leq 0,0015\%$  (v/v) CMIT/MIT (3:1). Las concentraciones aproximadas después de la reconstitución son:  
Estándar 0: 0 ng/ml  
Estándar 1: 0.2 ng/ml  
Estándar 2: 1.0 ng/ml  
Estándar 3: 2.0 ng/ml  
Estándar 4: 5.0 ng/ml  
Estándar 5: 10.0 ng/ml

Para indicaciones de peligro y consejos de prudencia consulte el cap. 13.1.

## 4.2. Materiales suministrados

- 1 lámina autoadhesiva
- 1 instrucciones de uso

## 4.3. Materiales y equipos necesarios

- Lector de ELISA para microplaca, equipado para medidas de absorbancia a 450 nm, 620-630 nm
- Lavador para pozos automático o manual
- Agua destilada
- Cronómetro

## 5. PRECAUCIONES

---

Los reactivos sin abrir son estables hasta la fecha de expiración impresa en la etiqueta cuando son conservados de 2 a 8° C en oscuridad. Una vez abiertos los reactivos son estables por 60 días cuando son almacenados de 2 a 8° C.

## 6. ESTABILIDAD Y ALMACENAMIENTO

---

*Es muy importante que todos los reactivos, muestras y estándares se encuentren a temperatura ambiente (22...28° C) durante al menos 30 minutos antes de iniciar el procesamiento de la prueba. ¡Al final del ensayo inmediatamente poner todos los reactivos a 2 – 8° C para evitar largos periodos a temperatura ambiente !*

### 6.1. Placa de Microtitulación

Las tiras partibles listas para el uso están recubiertas con estreptavidina. Almacenar de 2 a 8° C. Abra la bolsa solamente cuando está se encuentre a temperatura ambiente. *Inmediatamente después de remover las tiras a utilizar; guarde las tiras restantes en la bolsa de aluminio junto con el desecante proveído y almacénelas de 2...8°C. El producto se conserva hasta la fecha de caducidad indicada.*

### 6.2. Conjugado

El conjugado viene listo para el uso

### 6.3. Estándares

Los estándares están liofilizados. Reconstituya cada estándar con 2 ml de agua destilada o agua desionizada.

Una vez reconstituidos los estándares son estables 7 días almacenados de 2 a 8° C.

En orden de almacenar por un período más largo, haga alícuotas de los estándares reconstituidos en viales y almacénelos a -20° C (son estables por 6 meses).

No los congele y descongele más de una vez.

Un preservativo ha sido agregado.

Los estándares, preparados a partir de suero humano, fueron calibrados usando una preparación de referencia, la cual fue ensayada contra el primer IRR 84/510 de la OMS

### 6.4. Solución Substrato TMB

La botella contiene 15 ml de sistema Tetrametilbenzidina/Peróxido de Hidrogeno. El reactivo viene listo para el uso y debe ser almacenado de 2 a 8° C en oscuridad. *La solución debe ser incolora o puede tener un ligero tinte azul. Si el substrato cambia a un color azul, esté podría estar contaminado y debe ser descartado.*

### 6.5. Solución Stop

La botella contiene 15 ml de solución de ácido sulfúrico 0.15 M. La solución vienen lista para el uso y debe ser almacenada de 2 a 8° C.

### 6.6. Solución de lavado

Diluir el contenido de la solución de lavado concentrada con agua destilada o desionizada para un volumen final de 1000 ml antes de ser usada. Para volúmenes menores respete la relación de dilución de 1:50. La solución de lavado diluida es estable por 30 días de 2 a 8° C.

## 7. RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

---

Siga los procedimientos de las Buenas Prácticas de Laboratorio para la manipulación de productos sanguíneos.

Para la comparación exacta con los valores normales establecidos, debe ser obtenida una muestra de suero en ayunas.

Para la obtención del suero, la sangre debe ser recolectada por venopunción en un tubo sin aditivos o anticoagulantes; permita la formación del coagulo y centrifugue la muestra para separar el suero de las células.

Las muestras pueden ser refrigeradas de 2 a 8° C por un período máximo de 5 días. Si los especímenes no van a ser procesados dentro de este tiempo, pueden ser almacenados por 30 días a -20° C. Evite ciclos de congelamiento y descongelamiento. Las muestras de pacientes con concentraciones de Péptido-C superiores a 10.0 ng/ml pueden ser diluidas (por ejemplo 1:10 o mayores) con el estándar 0 (Péptido-C 0 ng/ml) y re-ensayadas. La concentración de las muestras es obtenida multiplicando el resultado por el factor de dilución.

## 8. PROCEDIMIENTOS

---

### 8.1. Preparación de la prueba

Por favor, lea detenidamente las instrucciones de uso de la prueba **antes** de realizar el ensayo. La confiabilidad de los resultados depende del seguimiento estricto de las instrucciones de uso de la prueba tal cual se describe en el inserto. Antes de comenzar el ensayo, el plan de distribución e identificación de los especímenes y controles debe ser establecido cuidadosamente. Seleccione el número requerido de tiras ó pozos e insértelas dentro del soporte. El pipeteo de las muestras no puede extenderse más allá de 10 minutos para evitar la deriva del análisis. Si más de una placa es usada, es recomendable que repita la curva de calibración. Por favor asigne al menos:

- 1 pozo (ejemplo A1) para blanco
- 2 pozos (ejemplo B1+C1) para el estándar 0
- 2 pozos (ejemplo D1+E1) para el estándar 1
- 2 pozos (ejemplo F1+G1) para el estándar 2
- 2 pozos (ejemplo H1+A2) para el estándar 3
- 2 pozos (ejemplo B2+C2) para el estándar 4
- 2 pozos (ejemplo D2+E2) para el estándar 5

*Es recomendable determinar los estándares y pacientes por duplicado*

Realice todos los pasos del ensayo, en el orden dado y sin demoras apreciables entre cada uno.

Una punta limpia desechable debe ser usada para dispensar cada estándar y cada muestra.

1. Dispense 50 µl de cada estándar y muestra (y controles) dentro de su respectivo pozo.
2. Dispense 100 µl de conjugado en cada pozo excepto en el blanco. Cubra con la lámina autoadhesiva.
3. **Incube por 2 horas a temperatura ambiente (22-28°C)**
4. Cuando la incubación ha sido completada, remueva la lámina autoadhesiva, aspire el contenido de los pozos y lave cada pozo tres veces con 300 µl de solución de lavado diluida. Evite el desborde de los pozos de reacción

**Nota importante:** Agite suavemente la placa durante 5 segundos en cada paso del lavado. Después del último lavado asegúrese haber eliminado completamente la solución de lavado de los pozos, invierta la placa y golpéela repetidas veces contra una servilleta de papel absorbente.

**Lavados automático:** Si está utilizando una lavadora automática, hacer 5 lavados.

*Nota: El paso del lavado es crítico. Un lavado insuficiente resulta en una mala precisión y valores de absorbancias falsamente elevados.*

5. Dispense 100 µl de la solución de sustrato TMB en todos los pozos.
6. **Incube por exactamente 15 minutos a temperatura ambiente (22 a 28°C) en oscuridad.**
7. Dispense 100 µl de la solución Stop en todos los pozos en el mismo orden y a la misma velocidad que la solución sustrato de TMB. Agite la microplaca gentilmente.  
*Cualquier color azul desarrollado durante el tiempo de incubación cambia a amarillo.*
8. Mida la absorbancia de los especímenes a 450 nm frente una segunda lectura de referencia a 620-630 nm o frente al blanco entre 5 minutos.

## 9. CONTROL DE CALIDAD

---

Cada laboratorio puede incluir controles con rangos en el nivel normal, alto y bajo para monitorear el comportamiento del ensayo. Estos controles deben ser tratados como muestras desconocidas y los valores determinados cada vez que el ensayo es realizado. Los gráficos de control de calidad deben ser mantenidos para el seguimiento del desempeño de los reactivos suministrados. Los métodos estadísticos pertinentes deben ser empleados para comprobar las tendencias. Una desviación significativa del desempeño establecido puede indicar un cambio no detectado en las condiciones del experimento o la degradación de los reactivos del kit. Reactivos nuevos deben ser usados para determinar la razón para estas variaciones.

## 10. RESULTADOS

---

### 10.1. Nota

La absorbancia (DO) del estándar 5 debe ser  $\geq 1.0$

Las densidades ópticas (DOs) de algunos calibradores y muestras puede ser mayor de 2.0 en cuyo caso, estas podrían estar fuera del rango de medida del lector de microplaca. Por esto es necesario, para DO mayores de 2.0, realizar una lectura a 405 nm en adición a la de 450 nm y 620 nm (filtro de referencia para la substracción de interferencias debido al plástico).

Para lectores de microplaca que no tengan disponible la opción de leer en 3 filtros al mismo tiempo, es aconsejable aplicar el siguiente procedimiento:

- Lea la microplaca a 450 nm y 620 nm
- Lea la microplaca nuevamente a 405 nm y 620 nm
- Identifique los pozos que tengan DOs a 450 nm mayores de 2.0

- Seleccione las correspondientes lecturas de 405 nm y multiplica este valor a 405 nm por el factor de conversión 3.0 (donde DO 450/DO 405=3.0), que es: DO 405 nm X 3.0.

Advertencia: El factor de conversión 3.0 solamente es sugerido. Para una mejor exactitud, es aconsejable que el usuario establezca el factor de conversión específico para su propio lector.

## 10.2. Cálculo de resultados

Calcule la absorbancia media para cada punto de la curva de calibración y cada muestra.

### Curva de calibración- Método automático

Use preferiblemente una curva logística de 4 parámetros o una función de interpolación segmentaria cúbica como cálculo algorítmico.

### Curva de calibración- Método manual

Una curva de calibración es usada para comprobar la concentración de Péptido-C en especímenes desconocidos.

Registre la DO obtenida en la impresión del lector de microplaca. Ubique la DO para cada duplicado de los estándares versus la correspondiente concentración de Péptido-C en ng/mL sobre un papel de gráfica lineal (no promedie los duplicados de los calibradores antes de trazarlos).

Dibuje la mejor curva de ajuste a través de los puntos trazados.

La determinación de la concentración de Péptido-C para una muestra desconocida, localice el promedio de la absorbancia de los duplicados de cada uno en el eje vertical de la gráfica, encuentre el punto de intercepto sobre la curva, lea la concentración (en ng/mL) en el eje horizontal de la gráfica (los duplicados de la muestras desconocidas pueden ser promediados como es indicado).

## 10.3. Valores de referencia

Los valores de Péptido-C son consistentemente más altos en plasma que en suero; así, que es preferible el suero. Basados en los datos clínicos reunidos en concordancia con la literatura publicada los siguientes rangos han sido asignados.

Estos rangos deben ser usados únicamente como guía.

Adulto (Normal) 0.7-1.9 ng/ml

## 11. CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DE DESEMPEÑO

Los resultados están basados en el grupo de pruebas investigado; no se trata de especificaciones garantizadas.

### 11.1. Sensibilidad

La concentración más baja detectable de Péptido-C que puede ser distinguida del estándar cero es 0.01 ng/ml con un 95% de límite de confianza.

### 11.2. Especificidad

La reacción cruzada del ensayo del método ELISA para Péptido-C para sustancias seleccionadas fue evaluada por la adición de la sustancia interferente. La reactividad cruzada fue calculada por el cociente entre la dosis de la sustancia interferente y la dosis de Péptido-C necesaria para producir la misma absorbancia.

| Reactivo interferente | Concentración probada | Resultado | Reactividad cruzada |
|-----------------------|-----------------------|-----------|---------------------|
| Péptido-C             | -----                 | ---       | 100%                |
| Insulina              | 10000 µUI/ml          | N.D       | No detectado        |
| Proinsulina           | 1000 ng/ml            | N.D       | No detectado        |

### 11.3. Precisión

#### Variación intra-ensayo

La variación dentro de una misma corrida fue determinada por la medida replicada (16X) de tres diferentes sueros control en un ensayo. La variabilidad en un mismo ensayo es  $\leq 6.2\%$ .

#### Variación inter-ensayo

La variación entre corridas fue determinada por la medida replicada (20X) de tres diferentes sueros control con diferentes lotes de reactivo. La variabilidad entre los ensayos es  $\leq 10.0\%$ .

### 11.4. Correlación con RIA

La Péptido-C fue comparada con otro ensayo comercialmente disponible. 194 sueros fueron analizados de acuerdo a ambos sistemas de prueba.

La curva de regresión lineal fue calculada:

$$y = 1.012 x + 0.025$$

$$r^2 = 0.991$$

y: Kit predicado para Péptido-C

x: C-Péptido ELISA

## 12. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Contaminación bacteriana o ciclos repetidos de congelación-descongelación de las muestras pueden afectar los valores de absorbancia.

### 13. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

- El procedimiento de prueba, la información, precauciones y advertencias contenidas en las instrucciones de uso deben ser seguidas estrictamente. El uso de los kits con analizadores y equipos similares debe ser validado. No está autorizado realizar ningún cambio en el diseño, composición y procedimiento del ensayo, así como ningún uso en combinación con otros productos no aprobados por el fabricante; el usuario es responsable de tales cambios. El fabricante no se hace responsable por resultados falsos o por cualquier incidente causado por esta razón. El fabricante no se responsabiliza por los resultados obtenidos mediante el análisis visual de las muestras de los pacientes.
- Solo para uso diagnóstico In-vitro.
- Todos los componentes de origen humano usados para la producción de estos reactivos han sido analizados para Anticuerpos HIV 1+2, anticuerpos anti-HCV y HBsAg y han sido encontradas como No Reactivas. Sin embargo, todos los materiales deben ser considerados y manipulados como potencialmente infecciosos.
- No intercambie reactivos o tiras de diferentes lotes de producción.
- No se deben usar reactivos de otros fabricantes con los reactivos de este kit de prueba.
- No utilice los reactivos después de la fecha de expiración impresa en la etiqueta.
- Utilice solo puntas limpias, dispensadores y material de laboratorio.
- No intercambie las tapas de los reactivos para evitar contaminación cruzada.
- Cierre bien los frascos de los reactivos inmediatamente después del uso para evitar la evaporación y contaminación bacteriana.
- Después de la primera apertura y subsecuente almacenamiento, chequee los viales del conjugado y los controles para detectar contaminación bacteriana antes de cada uso.
- Para evitar contaminación cruzada y resultados falsamente elevados pipetee las muestras de los pacientes y dispense el conjugado sin salpicaduras exactamente en el fondo de los pozos.
- No utilice muestras altamente lipémicas o fuertemente hemolizadas.
- La máxima precisión es requerida para el dispensado de los reactivos.
- Los lectores de microplacas leen las DO verticalmente, por tanto no debe tocarse el fondo de los pocillos.
- Un lavado incompleto o impreciso y la aspiración insuficiente del líquido de los micropozos ELISA pueden causar una precisión pobre y/o un elevado fondo. Para mejorar el rendimiento del kit en los sistemas automatizados de ELISA, se recomienda aumentar el número de lavados.
- Evite la exposición del sustrato TMB a la luz solar directa, metales o oxidantes.
- Algunos reactivos (solución de lavado) contienen pequeñas cantidades de CMIT/MIT como conservante. Evite el contacto con la piel o mucosas.
- Evite el contacto con reactivos que contengan peróxido de hidrogeno, preservativos y sulfúrico, los cuales pueden ser tóxicos si son ingeridos. No pipetee con la boca.

#### 13.1. Nota de seguridad para los reactivos que contienen sustancias peligrosas

Los reactivos pueden contener CMIT/MIT (3:1) (consulte el cap 4.1)

Por lo tanto, se aplican las indicaciones de peligro y consejos de prudencia.

#### Atención



|           |   |
|-----------|---|
| H317      | Puede provocar una reacción alérgica en la piel.                      |
| P261      | Evitar respirar el gas/la niebla/los vapores/el aerosol.              |
| P280      | Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección.                   |
| P302+P352 | EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con abundante agua.            |
| P333+P313 | En caso de irritación o erupción cutánea: Consultar a un médico.      |
| P362+P364 | Quitar las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas. |

Se puede encontrar más información en la ficha de datos de seguridad.

#### 13.2. Consideraciones para el descarte

Los residuos de productos y preparaciones químicos generalmente son considerados como residuos peligrosos. La eliminación de éste tipo de residuos está regulada por leyes y regulaciones nacionales y regionales. Póngase en contacto con las autoridades locales o empresas de manejo de residuos para que lo asesoren sobre cómo eliminar los residuos peligrosos.

Para obtener información sobre los materiales de embalaje, consulte MATERIALES DE EMBALAJE.

### 14. INFORMACIÓN PARA PEDIDOS

|     |         |           |                     |
|-----|---------|-----------|---------------------|
| REF | DNOV112 | C-Peptide | (96 Determinations) |
|-----|---------|-----------|---------------------|






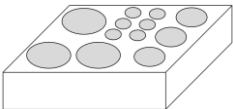


## BIBLIOGRAPHY / BIBLIOGRAFIA

1. Eastham R.D: Biochemical Values in Clinical Medicine, 7th Ed. Bristol. England. Jonh Wright & Sons, Ltd;. (1985).
2. Gerbitz, V.K.D, J.Clin.Chem.Biochem. 18, 313-326 (1980)
3. Boehm TM and Lebovitz HE. Diabetes Care 479-490. (1979)
4. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Procedure for the collection of diagnostic blood specimens by venipuncture: approved standards. 4th Ed. NCCLS Document H3-A4, Wayne, PA (1988).
5. Turkinton RW, et al. Archive of Internal Med. 142, 1102 – 1105 (1982)
6. Sacks BD: Carbohydrates in Burtis, C.A. and Ashwood, AR (Eds ) Tietz Textbook OF Clinical Chemistry.2nd Ed. Philadelphia w. B. Saunders Co. 1994
7. Kahn CR et Rosenthal AS Diabetes Care 2, 283 – 295 (1979)







## ABBREVIATIONS / ABREVIACIONES

|      |  |
|------|--|
| CMIT | 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one |
| MIT  | 2-methyl-2H-isothiazol-3-one           |

## PACKAGING MATERIALS / MATERIALES DE EMBALAJE

|   |   |  |  |
|---|---|--|--|
|  <p>PAP 21</p> |  <p>PAP 21</p> |  <p>PAP 22</p> | <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">MTP</div>                       |
|   |   |  |  <p>ALU / LDPE 90</p> |

## SYMBOLS KEY / SIMBOLOS

|   |   |
|---|---|
|    | Manufactured by / Fabricado por   |
| <b>IVD</b>  | In Vitro Diagnostic Medical Device / Producto para diagnóstico In vitro |
| <b>LOT</b>  | Lot Number / Número de lot / Número de lote                             |
|    | Expiration Date / Fecha de caducidad                                    |
|    | Storage Temperature / Temperatura de almacenamiento                     |
|    | Keep away from sunlight / Mantener alejado de la luz solar              |
| <b>CE</b>   | CE Mark / Marca CE  |
| <b>REF</b>  | Catalogue Number / Número de Catálogo                                   |
|    | Consult Instructions for Use / Consulte las Instrucciones de Uso        |
| <b>MTP</b>  | Microtiterplate / Placa de Microtitulación                              |
| <b>CONJ</b>   | Conjugate conc./ Conjugado conc.  |
| <b>CAL</b>   x   <b>LYO</b>   | Calibrator resp. Standard / Calibrador o Estándar                       |
| <b>SOLN</b>   <b>STOP</b>   | Stop solution / Solución de parada                                      |
| <b>SUB</b>   <b>TMB</b>   | TMB Substrate solution / Solución substrato TMB                         |
| <b>WASH</b>   <b>BUF</b>   <b>50x</b>   | Washing solution 50x concentrated / Solución de lavado concentrado x50  |
|  | Contains sufficient for "n" tests / Contenido suficiente para "n" tests |

# SCHEME OF THE ASSAY

C-Peptide

## Test Preparation

Prepare reagents and samples as described.  
 Establish the distribution and identification plan for all specimens and control.  
 Select the required number of microtiter strips or wells and insert them into the holder.

## Assay Procedure

|  | Blank  | Standard 0 - 5 | Sample |
|--|--------|----------------|--------|
| Standard/ control  | -      | 50 µl          | -      |
| Sample   | -      | -              | 50 µl  |
| Diluted conjugate  | -      | 100 µl         | 100 µl |
| Cover wells with foil supplied in the kit<br><b>Incubate for 2 hours at room temperature</b><br>Wash each well <b>three times</b> with <b>300 µl</b> diluted Wash Solution<br><b>In case you use automatic equipment, wash the wells at least 5 times.</b> |        |                |        |
| TMB Substrate  | 100 µl | 100 µl         | 100 µl |
| <b>Incubate for exactly 15 min at room temperature in the dark</b>   |        |                |        |
| Stop solution  | 100 µl | 100 µl         | 100 µl |
| Shake the microplate gently<br>Photometric measurement at 450 nm, 620-630 nm   |        |                |        |



### Gold Standard Diagnostics Frankfurt GmbH

Waldstrasse 23 A6

63128 Dietzenbach, Germany

Tel.: +49 6074 23698-0

Fax: +49 6074 23698-900

E-Mail: [info.frankfurt@eu.goldstandarddiagnostics.com](mailto:info.frankfurt@eu.goldstandarddiagnostics.com)

Website: [clinical.goldstandarddiagnostics.com](http://clinical.goldstandarddiagnostics.com)