



DCM077-8
Ed. 03/2024

C-PEPTIDE ELISA

per analisi di routine

Determinazione immunoenzimatica diretta del livello di C-Peptide in siero o plasma umano

IVD

LOT

Vedere etichetta esterna

2°C 8°C



Σ = 96 test

REF

DKO077

DESTINAZIONE D'USO

Il kit C-Peptide ELISA è un dosaggio immunoenzimatico diretto in fase solida per la determinazione quantitativa del C-Peptide nel siero o nel plasma umano.

Il kit C-Peptide ELISA è destinato al solo uso di laboratorio.

1. SIGNIFICATO CLINICO

C-Peptide è l'abbreviazione per peptide di collegamento, è un peptide di 31 amminoacidi. Il C-Peptide è il C-terminale liberato durante la maturazione della pro-insulina in insulina. La pro-insulina viene maturata quando è liberata dal pancreas nel circolo sanguigno – una molecola di C-Peptide per ogni molecola di insulina. Il C-Peptide è privo di attività biologica ma sembra essere necessario per mantenere l'integrità strutturale dell'insulina.

La determinazione in vitro del livello di C-Peptide e insulina aiuta nella diagnosi in caso di malattie epatiche, acromegalia, sindrome di Cushing, intolleranza ereditaria al glucosio, insulinemia, disfunzioni renali, ingestione orale accidentale di farmaci ipoglicemici o ipoglicemia C-Peptide dipendente.

Il paziente cui è diagnosticato il diabete è sottoposto alla misura dei livelli di C-Peptide, per determinare il tipo di diabete. Il pancreas dei pazienti con il diabete di tipo 1 non può produrre l'insulina e quindi avranno un livello minimo di C-Peptide, mentre i livelli di C-Peptide nel diabete di tipo 2 sono normali o superiori al normale. La misura del C-Peptide in pazienti che iniettano l'insulina può essere utile nella valutazione della secrezione endogena dell'insulina.

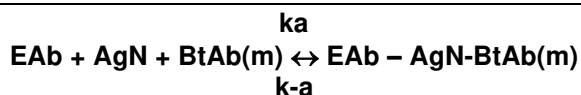
La misura del C-Peptide è analiticamente più sensibile di quella dell'insulina. L'insulina e il C-Peptide sono secreti nella circolazione portale in concentrazione equimolare, i livelli a digiuno del C-Peptide sono 5-10 volte superiori a quelli di insulina, poiché l'emivita del C-Peptide è molto più lunga. Il C-Peptide non è metabolizzato dal fegato, è rimosso dalla circolazione e degradato nei reni con una frazione che passa nelle urine senza subire modificazioni. Quindi i livelli del C-Peptide urinario

sono correlati con i livelli a digiuno del C-Peptide sierico.

2. PRINCIPIO DEL METODO

I requisiti essenziali per un saggio immunoenzimatico sono anticorpi ad alta affinità e specificità (enzima coniugato e immobilizzato), con differenti e distinti epitopi.

In questo metodo l'anticorpo si lega alla superficie del pozzetto attraverso l'interazione della streptavidina. Successivamente, nei pozzetti sono aggiunti, in eccesso, sia anticorpi anti C-Peptide monoclonali biotinilati sia anticorpi coniugati all'enzima HRP (perossidasi di rafano); entrambi i tipi di anticorpi sono ad alta affinità e specificità e riconoscono epitopi diversi. Nei pozzetti della micropiastra la reazione tra antigene nativo e gli anticorpi avviene senza competizione o impedimento sterico, e si forma un complesso sandwich solubile. L'interazione è illustrata dalla seguente equazione:



BtAb(m) = anticorpo monoclonale biotinilato (quantità in eccesso)

AgN = antigene nativo (quantità variabile)

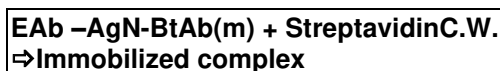
EAb = anticorpo coniugato all'enzima (quantità in eccesso)

EAb -AgN-BtAb(m) = complesso a sandwich antigene-anticorpo.

k_a = costante di associazione

k_{-a} = costante di dissociazione

Simultaneamente, Il complesso è depositato sul pozzetto attraverso la reazione ad alta affinità tra streptavidina e anticorpo biotinilato. Questa interazione è mostrata di seguito:



Streptavidin C.W. = Streptavidina immobilizzata sul pozzetto

Immobilized complex = complesso a sandwich legato al pozzetto.

All'equilibrio, la frazione di anticorpo legata è separata dall'antigene libero con un lavaggio. L'attività dell'enzima HRP nella frazione di anticorpo legata è direttamente proporzionale alla concentrazione di antigene nativo. L'attività dell'enzima presente sulla superficie del pozzetto è misurata quantitativamente con un appropriato substrato per via colorimetrica. Utilizzando alcuni differenti calibratori a valore di antigene noto, può essere generata una curva di dosaggio dalla quale può essere estrapolata la concentrazione di antigene di un campione sconosciuto.

3. REATTIVI, MATERIALI E STRUMENTAZIONE

3.1. Reattivi e materiali forniti nel kit

1. Calibrators (6 flaconi, 2 mL ciascuno, liofilizzati), ProClin <0,0015%

CAL0	REF DCE002/7706-0
CAL1	REF DCE002/7707-0
CAL2	REF DCE002/7708-0
CAL3	REF DCE002/7709-0
CAL4	REF DCE002/7710-0
CAL5	REF DCE002/7711-0

2. Conjugate (1 flacone, 13 mL)

Anticorpi anti C-Peptide coniugato a perossidasi di rafano (HRP) e anti-C-Peptide biotinilato, ProClin <0,0015% REF DCE002/7702-0

3. Coated Microplate (1 micropiastre breakable)

Micropiastre coattate con streptavidina REF DCE002/7703-0

4. TMB Substrate (1 flacone, 15 mL)

H₂O₂-TMB (0,26 g/L) (evitare il contatto con la pelle), ProClin <0,0015% REF DCE004-0

5. Stop solution (1 flacone, 15 mL)

Acido Solforico 0,15 mol/L (evitare il contatto con la pelle) REF DCE005-0

6. 50X Conc. Wash Solution (1 flacone, 20 mL)

NaCl 45 g/L; Tween-20 55 g/L, ProClin >0,0015% REF DCE006B-0

3.2. Reattivi necessari non forniti nel kit

Acqua distillata.

3.3. Materiale e strumentazione ausiliare

Dispensatori automatici.

Lettore per micropiastre (450 nm, 620-630 nm)

Note

Conservare tutti i reattivi a 2-8°C al riparo dalla luce.

Aprire la busta del reattivo 3 (Coated Microplate) solo dopo averla riportata a temperatura ambiente e chiuderla subito dopo il prelievo delle strip da utilizzare; una volta aperta è stabile fino alla data di scadenza del kit.

4. AVVERTENZE

- Questo test kit è per uso in vitro, da eseguire da parte di personale esperto. Non per uso interno o esterno su esseri Umani o Animali.
- Usare i previsti dispositivi di protezione individuale mentre si lavora con i reagenti forniti.
- Seguire le Buone Pratiche di Laboratorio (GLP) per la manipolazione di prodotti derivati da sangue.
- Tutti i reattivi di origine umana usati nella preparazione dei reagenti sono stati testati e sono risultati negativi per la presenza di anticorpi anti-HIV 1&2, per HbsAg e per anticorpi anti-HCV. Tuttavia nessun test offre la certezza completa dell'assenza di HIV, HBV, HCV o di altri agenti infettivi. Pertanto, i Calibratori devono essere maneggiati come materiali potenzialmente infettivi.
- Alcuni reagenti (wash solution) contengono piccole quantità di ProClin™ 300 (>0,0015%, <0,06%) come conservante. Evitare il contatto con pelle o mucose.
- Classificazione secondo il regolamento (CE) n. 1272/2008 [CLP]

Sensibilizzazione cutanea, categoria 1



Attenzione

Contiene: ProClin 300

Indicazioni di pericolo:

H317 - Può provocare una reazione allergica cutanea.

Consigli di prudenza:

P261 - Evitare di respirare la polvere / i fumi / i gas / la nebbia / i vapori / gli aerosol.

P280 - Indossare guanti/indumenti protettivi / proteggere gli occhi / proteggere il viso / proteggere l'udito.

P321 - Trattamento specifico (vedere istruzioni supplementari di pronto soccorso su questa etichetta).

P333+P313 - In caso di irritazione o eruzione della pelle: Consultare un medico.

P362+P364 - Togliere tutti gli indumenti contaminati e lavarli prima di indossarli nuovamente.

- Il TMB Substrato contiene un irritante, che può essere dannoso se inalato, ingerito o assorbito attraverso la cute. Per prevenire lesioni, evitare l'inalazione, l'ingestione o il contatto con la cute e con gli occhi.
- La Stop Solution è costituita da una soluzione di acido solforico diluito. L'acido solforico è velenoso e corrosivo e può essere tossico se ingerito. Per prevenire possibili ustioni chimiche, evitare il contatto con la cute e con gli occhi.
- Evitare l'esposizione del reagente TMB/H₂O₂ a luce solare diretta, metalli o ossidanti. Non congelare la soluzione.

- Questo metodo permette la determinazione quantitativa di C-Peptide da 0,2 a 10,0 ng/mL.

5. PRECAUZIONI

- Si prega di attenersi rigorosamente alla sequenza dei passaggi indicata in questo protocollo. I risultati presentati qui sono stati ottenuti usando specifici reagenti elencati in queste Istruzioni per l'Uso.
- Tutti i reattivi devono essere conservati a temperatura controllata di 2-8°C nei loro contenitori originali. Eventuali eccezioni sono chiaramente indicate. I reagenti sono stabili fino alla data di scadenza se conservati e trattati seguendo le istruzioni fornite.
- Prima dell'uso lasciare tutti i componenti dei kit e i campioni a temperatura ambiente (22-28°C) e mescolare accuratamente.
- Non scambiare componenti dei kit di lotti diversi. Devono essere osservate le date di scadenza riportate sulle etichette della scatola e di tutte le fiale. Non utilizzare componenti oltre la data di scadenza.
- Qualora si utilizzi strumentazione automatica, è responsabilità dell'utilizzatore assicurarsi che il kit sia stato opportunamente validato. Per migliorare le prestazioni del kit su strumentazione automatica, si consiglia di aumentare il numero di lavaggi.
- Un lavaggio incompleto o non accurato dei pozzetti può causare una scarsa precisione e/o un'elevato background.
- Per la riproducibilità dei risultati, è importante che il tempo di reazione di ogni pozzetto sia lo stesso. Per evitare il time shifting durante la dispensazione degli reagenti, il tempo di dispensazione dei pozzetti non dovrebbe estendersi oltre i 10 minuti. Se si protrae oltre, si raccomanda di seguire lo stesso ordine di dispensazione. Se si utilizza più di una piastra, si raccomanda di ripetere la curva di calibrazione in ogni piastra.
- L'aggiunta del TMB Substrato dà inizio ad una reazione cinetica, la quale termina con l'aggiunta della Stop Solution. L'aggiunta del TMB Substrato e della Stop Solution deve avvenire nella stessa sequenza per evitare tempi di reazione differenti.
- Osservare le linee guida per l'esecuzione del controllo di qualità nei laboratori clinici testando controlli e/o pool di sieri.
- Osservare la massima precisione nella ricostituzione e dispensazione dei reagenti.
- Non usare campioni microbiologicamente contaminati, altamente lipemici o emolizzati.
- I lettori di micropiastre leggono l'assorbanza verticalmente. Non toccare il fondo dei pozzetti.

6. PROCEDIMENTO

6.1. Preparazione dei Calibratori (C₀...C₅)

I Calibratori sono stati calibrati usando una soluzione di riferimento, la quale è stata dosata contro il WHO 1st IRR 84/510.

I Calibratori hanno le seguenti concentrazioni:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅
ng/mL	0	0,2	1,0	2,0	5,0	10,0

Ricostituire ogni flacone con 2 mL di acqua distillata o deionizzata.

I Calibratori ricostituiti sono stabili 7 giorni a 2-8°C.

Per periodi più lunghi aliquotare i Calibratori in appositi flaconcini conservarli a -20°C (stabili per 6 mesi). Scongellare una sola volta.

6.2. Preparazione della Wash Solution

Prima dell'uso, diluire il contenuto di ogni fiala di "50X Conc. Wash Solution" con acqua distillata fino al volume di 1000 mL. Per preparare volumi minori rispettare il rapporto di diluizione di 1:50. La soluzione di lavaggio diluita è stabile a 2÷8°C per almeno 30 giorni.

6.3. Preparazione del campione

Seguire le buone norme di laboratorio nell'utilizzo di prodotti a base di sangue.

Per un accurato confronto al fine di determinare i valori normali, dovrebbero essere prelevati campioni di siero la mattina a digiuno.

Per ottenere il siero, il sangue dovrebbe essere raccolto in un tubo per prelievi senza additivi o anticoagulanti; permettere al sangue di coagularsi; centrifugare il campione per separare il siero dalle cellule.

I campioni dovrebbero essere refrigerati a 2÷8°C per un periodo massimo di 5 giorni. Se non possono essere dosati entro questo tempo, dovrebbero essere conservati a -20°C fino a 30 giorni. Evitare ripetuti cicli di congelamento e scongelamento.

Campioni di pazienti con concentrazioni di C-Peptide al di sopra dei 10 ng/mL possono essere diluiti (ad esempio 1:10 o superiori) con il Calibratore 0 e testati di nuovo. La concentrazione dei campioni si ottiene moltiplicando il risultato per il fattore di diluizione.

6.4. Procedimento

- **Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (22-28°C) per almeno 30 minuti.** Al termine del dosaggio riporre immediatamente tutti i reagenti a 2-8°C: evitare lunghi periodi a temperatura ambiente.
- Le strisce di pozzetti non utilizzate devono essere rimesse immediatamente nella busta richiudibile contenente il materiale essicante e conservate a 2-8°C.
- Per evitare potenziali contaminazioni microbiche e/o chimiche non rimettere i reagenti inutilizzati nei flaconi originali.
- Al fine di aumentare l'accuratezza dei risultati del test è necessario operare in doppio, allestendo due pozzetti per ogni punto della curva di calibrazione (C₀-C₅), due per ogni Controllo, due per ogni Campione ed uno per il Bianco.

Reagente	Calibratore	Campione	Bianco
Calibratori C ₀ -C ₅	50 µL		
Campione		50 µL	
Coniugato	100 µL	100 µL	
Incubare 2 h a temperatura ambiente (22-28°C). Rimuovere il contenuto da ogni pozzetto e lavare 3 volte con 300 µL di soluzione di lavaggio diluita. Nota importante: ad ogni step di lavaggio, agitare delicatamente la piastra per 5 secondi e successivamente rimuovere l'eccesso di soluzione di lavaggio sbattendo delicatamente la micropiastra capovolta su fogli di carta assorbente. Lavaggi automatici: se si utilizza strumentazione automatica effettuare almeno 5 lavaggi.			
TMB Substrate	100 µL	100 µL	100 µL
Incubare 15 minuti a temperatura ambiente (22-28°C), al riparo dalla luce			
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL
Agitare delicatamente la micropiastra. Leggere l'assorbanza (E) a 450 nm contro una lunghezza d'onda di riferimento di 620-630 nm oppure contro il Bianco entro 5 minuti.			

7. CONTROLLO QUALITA'

Ogni laboratorio dovrebbe testare i controlli a valori bassi, medi e alti della curva di calibrazione per monitorare le performance del kit. Questi controlli dovrebbero essere trattati come sconosciuti ed i valori determinati in ogni procedura analitica eseguita. Tabelle di controllo di qualità dovrebbero essere effettuate per seguire le prestazioni dei reagenti forniti. Metodi statistici pertinenti dovrebbero essere usati per accertarne le tendenze. Deviazioni significative dalle prestazioni stabilite possono indicare un cambiamento inosservato nelle condizioni sperimentali o il decadimento dei reattivi del kit. Reattivi freschi dovrebbero essere utilizzati per determinare la causa delle variazioni.

8. RISULTATI

8.1. Note

La densità ottica (O.D.) di alcuni tra calibratori e campioni potrebbe risultare maggiore di 2,0, in questo caso, potrebbero essere fuori dal range di misura del lettore di micropiastra. È quindi necessario, per O.D. maggiori di 2,0 di effettuare una lettura 405 nm (= lunghezza d'onda del picco sulla spalla del principale) oltre che a 450 nm (lunghezza d'onda del picco principale) e a 620 nm (filtro di riferimento per la sottrazione delle interferenze dovute alla plastica).

Per lettori di micropiastre non progettati per leggere la piastra a tre differenti lunghezze d'onda allo stesso

tempo, è consigliabile di procedere nel seguente modo:

- leggere la micropiastra a 450 nm ed a 620 nm.
- leggere ancora la piastra a 405 nm ed a 620 nm.
- trovare i pozzetti le cui ODs a 450 nm sono maggiori di 2.0
- selezionare le corrispondenti OD lette a 405 nm e moltiplicare questi valori a 405 nm per il fattore di conversione 3.0 (dove $OD\ 450/OD\ 405 = 3,0$), che è: $OD\ 450\ nm = OD\ 405\ nm \times 3,0$.

Attenzione: Il fattore di conversione 3,0 è solamente suggerito. Per una migliore accuratezza, l'utente è invitato a calcolarsi il fattore di conversione specifico per il proprio lettore.

8.2. Estinzione Media

Calcolare l'estinzione media (Em) di ciascun punto della curva di calibrazione (C₀-C₅) e di ogni campione.

8.3. Curva di calibrazione - Metodo automatico

Usare la 4 parametri logistic – preferita – oppure la funzione smoothed cubic spline come algoritmo di calcolo.

8.4. Curva di calibrazione - Metodo manuale

Una curva dose-risposta è usata per determinare la concentrazione di C-Peptide in un campione sconosciuto.

Registrare le OD ottenute dal tabulato del lettore della micropiastra.

Mettere in grafico le OD per ogni duplicato degli Calibratori contro le concentrazioni corrispondenti di C-Peptide in ng/mL su carta lineare (non mediare i duplicati dei calibratori prima del plottaggio).

Disegnare la migliore curva che fitti i valori attraverso i punti disegnati.

Per determinare la concentrazione di C-Peptide per un campione incognito, localizzare la OD media dei duplicati dei campioni incogniti corrispondenti sull'asse verticale del grafico, trovare il punto di intersezione sulla curva e leggere la concentrazione (in ng/mL) sull'asse orizzontale del grafico (è possibile ricavare la media dei duplicati del campione incognito come indicato).

9. VALORI DI RIFERIMENTO

I valori di C-Peptide sono consistentemente più alti in plasma che in siero; tuttavia è preferibile usare siero. I range sono stati assegnati basandosi sui dati clinici in accordo con i lavori pubblicati in letteratura

	C-Peptide
Adulti (Normali)	0,7 – 1,9 ng/mL

È importante tenere presente che la determinazione di un range di valori attesi in un dato metodo per una popolazione "normale" è dipendente da molteplici fattori, quali la specificità e sensibilità del metodo in uso, e la popolazione in esame. Perciò ogni laboratorio dovrebbe considerare i range indicati dal Fabbriante come un'indicazione generale e produrre

range di valori attesi propri basati sulla popolazione indigena dove il laboratorio risiede.

10. PARAMETRI CARATTERISTICI

10.1. Precisione

10.1.1. Intra-Assay

La variabilità all'interno dello stesso kit è stata determinata replicando (16x) la misura di tre differenti sieri di controllo. La variabilità intra-assay è $\leq 6,2\%$.

10.1.2. Inter-Assay

La variabilità tra kit differenti è stata determinata replicando (20x) la misura di tre differenti sieri di controllo con kit appartenenti a lotti diversi. La variabilità inter-assay è $\leq 10,0\%$.

10.2. Sensibilità

La concentrazione minima di C-Peptide misurabile che può essere distinta dal Calibratore 0 è 0,01 ng/mL con un limite di confidenza del 95%.

10.3. Specificità

L'anticorpo impiegato presenta le seguenti reazioni crociate, valutata aggiungendo le sostanze interferenti. La cross reattività è stata calcolata derivando il rapporto tra dose di sostanze interferenti su dose di C-Peptide necessaria per ottenere la stessa assorbanza.

Cross Reagente	Conc. Testata	Ottenuta	Cross Reattività
C-Peptide	---	---	100 %
Insulin	10000 μ IU/mL	N.D.	Non Rilevata
Proinsulin	1000 ng/mL	N.D.	Non Rilevata

10.4. Correlazione

Il kit Dia.Metra C-Peptide ELISA è stato comparato con un kit disponibile in commercio. Sono stati testati 194 campioni di siero.

La curva di regressione è:

$$y = 1,012 x + 0,025$$

$$r^2 = 0,991$$

y = C-Peptide kit commerciale

x = C-Peptide Dia.Metra kit

11. DISPOSIZIONI PER LO SMALTIMENTO

I reagenti devono essere smaltiti in accordo con le leggi locali

BIBLIOGRAFIA

- Eastham R.D: Biochemical Values in Clinical Medicine, 7th Ed. Bristol. England. Jonh Wright & Sons, Ltd;. (1985).
- Gerbitz, V.K.D, J.Clin.Chem.Biochem. 18, 313-326 (1980)
- Boehm TM, et al Diabetes Care 479-490. (1079)
- 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).
- Turkinton RW, et al Archive of Internal Med. 142

- Sacks BD Carbohydrates in Burtis, C.A. and Ashwood, AR (Eds) Tietz Textbook OF Clinical Chemistry.2nd Ed. Philadelphia w.B. Saunders Co. 1994
- Kahn CR, et al Diabetes Care 2, 283 – 295 (1979)

Ed. 03/2024

DCM077-8



DCM077-8
Ed. 03/2024

C-PEPTIDE ELISA

for routine analysis

Direct immunoenzymatic determination of C-Peptide level in human serum or plasma

IVD

LOT

See external label

2°C  8°C



$\Sigma = 96$ tests

REF DKO077

INTENDED USE

C-Peptide ELISA kit is a direct solid phase enzyme immunoassay for quantitative determination of C-Peptide in human serum or plasma.

C-Peptide ELISA kit is intended for laboratory use only.

1. CLINICAL SIGNIFICANCE

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 split 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 hypoglycemic drugs or C-Peptide induced factitious hypoglycemia.

Newly diagnosed diabetes patient often get their C-Peptide levels measured, to find if they are 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

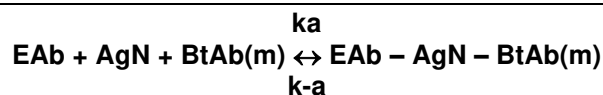
urine C-Peptide levels correlate well with fasting C-Peptide levels in serum.

2. PRINCIPLE

The essential reagents required for an immunoenzymometric assay include high affinity and specificity antibodies (enzyme-linked and immobilized), with different and distinct epitope recognition, in excess, and native antigen. In this procedure, the immobilization takes place during the assay at the surface of a microplate well through the interaction of the streptavidin coated on the well and exogenously added biotinylated monoclonal anti C-Peptide antibody (Ab).

Upon mixing the monoclonal biotinylated antibody, the enzyme-labelled antibody and a serum containing the native antigen (Ag), a reaction results between the native antigen and the antibodies, without competition or steric hindrance, to form a soluble sandwich complex.

The interaction is illustrated in the following equation:



BtAb(m) = biotinylated monoclonal antibody (excess quantity)

AgN = native antigen (variable quantity)

EAb = enzyme labelled antibody (excess quantity)

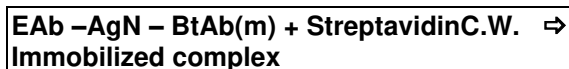
EAb – AgN – BtAb(m) = antigen-antibodies sandwich complex

k_a = rate constant of association

k_{-a} = rate constant of dissociation

Simultaneously, the complex is deposited into the well through the high affinity reaction of streptavidin and biotinylated antibody.

This interaction is illustrated below:



StreptavidinC.W. = Streptavidin immobilized on well

Immobilized complex = sandwich complex bound to the well

After equilibrium is attained, the antibody-bound fraction is separated from unbound antigen by a washing step. The enzyme activity in the antibody-bound fraction is directly proportional to the native antigen concentration. The activity of the enzyme present on the surface of the well is quantitated by reaction with a suitable substrate to produce colour. By utilizing several different calibrators of known antigen values, a dose response curve can be generated from which the antigen concentration of an unknown can be ascertained.

3. REAGENTS, MATERIALS AND INSTRUMENTATION

3.1. Reagents and materials supplied in the kit

1. Calibrators (6 vials, 2 mL each, lyophilized), ProClin <0.0015%

CAL0	REF DCE002/7706-0
CAL1	REF DCE002/7707-0
CAL2	REF DCE002/7708-0
CAL3	REF DCE002/7709-0
CAL4	REF DCE002/7710-0
CAL5	REF DCE002/7711-0

2. Conjugate (1 vial, 13 mL)

Antibodies anti C-Peptide conjugated with horseradish peroxidase (HRP) and anti biotinylated C-Peptide, ProClin <0.0015% REF DCE002/7702-0

3. Coated Microplate (1 breakable microplate)

Microplate coated with streptavidin REF DCE002/7703-0

4. TMB Substrate (1 vial, 15 mL)

H₂O₂-TMB 0.26 g/L (avoid any skin contact), ProClin <0.0015% REF DCE004-0

5. Stop Solution (1 vial, 15 mL)

Sulphuric acid 0.15 mol/L (avoid any skin contact) REF DCE005-0

6. 50X Conc. Wash Solution (1 vial, 20 mL)

NaCl 45 g/L; Tween-20 55 g/L, ProClin >0.0015% REF DCE006B-0

3.2. Reagents necessary not supplied

Distilled water.

3.3. Auxiliary materials and instrumentation

Automatic dispenser.

Microplates reader (450 nm, 620-630 nm)

Note

Store all reagents between 2-8°C in the dark.

Open the bag of reagent 3 (Coated Microplate) only when it is at room temperature and close it immediately after use; once opened, it is stable until the expiry date of the kit.

4. WARNINGS

- This kit is intended for in vitro use by professional persons only. Not for internal or external use in Humans or Animals.

- Use appropriate personal protective equipment while working with the reagents provided.
- Follow Good Laboratory Practice (GLP) for handling blood products.
- All human source material used in the preparation of the reagents has been tested and found negative for antibody to HIV 1&2, HbsAg, and HCV. No test method however can offer complete assurance that HIV, HBV, HCV or other infectious agents are absent. Therefore, the Calibrators should be handled in the same manner as potentially infectious material.
- Some reagents (wash solution) contain small amounts of ProClin™ 300 (>0.0015%, <0.06%) as preservative. Avoid contact with skin or mucosa.
- Classification according to Regulation (EC) No. 1272/2008 [CLP]

Skin sensitivity, Category 1



Warning

Contains: ProClin 300

Hazard statements:

H317 - May cause an allergic skin reaction.

Precautionary statements:

P261 - Avoid breathing dust / fume / gas / mist / vapours / spray.

P280 - Wear protective gloves/ protective clothing / eye protection / face protection / hearing protection.

P321 - Specific treatment (see supplemental first aid instruction on this label).

P333+P313 - If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/attention.

P362+P364 - Take off contaminated clothing and wash it before reuse.

- The TMB Substrate contains an irritant, which may be harmful if inhaled, ingested or absorbed through the skin. To prevent injury, avoid inhalation, ingestion or contact with skin and eyes.
- The Stop Solution consists of a diluted sulphuric acid solution. Sulphuric acid is poisonous and corrosive and can be toxic if ingested. To prevent chemical burns, avoid contact with skin and eyes.
- Avoid the exposure of reagent TMB/H₂O₂ to directed sunlight, metals or oxidants. Do not freeze the solution.
- This method allows the quantitative determination of C-Peptide from 0.2 to 10.0 ng/mL.

5. PRECAUTIONS

- Please adhere strictly to the sequence of pipetting steps provided in this protocol. The performance data represented here were obtained using specific reagents listed in this Instruction For Use.
- All reagents should be stored refrigerated at 2-8°C in their original container. Any exceptions are clearly indicated. The reagents are stable until the expiry date when stored and handled as indicated.

- Allow all kit components and specimens to reach room temperature (22-28°C) and mix well prior to use.
- Do not interchange kit components from different lots. The expiry date printed on box and vials labels must be observed. Do not use any kit component beyond their expiry date.
- If you use automated equipment, the user has the responsibility to make sure that the kit has been appropriately tested. To improve the performance of the kit on automatic systems is recommended to increase the number of washes.
- The incomplete or inaccurate liquid removal from the wells could influence the assay precision and/or increase the background.
- It is important that the time of reaction in each well is held constant for reproducible results. Pipetting of samples should not extend beyond ten minutes to avoid assay drift. If more than 10 minutes are needed, follow the same order of dispensation. If more than one plate is used, it is recommended to repeat the dose response curve in each plate
- Addition of the TMB Substrate solution initiates a kinetic reaction, which is terminated by the addition of the Stop Solution. Therefore, the TMB Substrate and the Stop Solution should be added in the same sequence to eliminate any time deviation during the reaction.
- Observe the guidelines for performing quality control in medical laboratories by assaying controls and/or pooled sera.
- Maximum precision is required for reconstitution and dispensation of reagents.
- Samples microbiologically contaminated, highly lipemic or haemolysed should not be used in the assay.
- Plate readers measure vertically. Do not touch the bottom of the wells.

6. PROCEDURE

6.1. Preparation of the Calibrator (C₀...C₅)

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

The Calibrators have the following concentration:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅
ng/mL	0	0,2	1,0	2,0	5,0	10,0

Reconstitute each Calibrator with 2 mL of distilled or deionised water.

Once reconstituted, the Calibrators are stable 7 days at 2-8°C.

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

6.2. Preparation of Wash Solution

Dilute the content of each vial of the "50X Conc. Wash Solution" with distilled water to a final volume of 1000 mL prior to use. For smaller volumes respect the 1:50 dilution ratio. The diluted wash solution is stable for 30 days at 2-8°C.

6.3. Preparation of the Sample

Follow the good laboratory procedures for handling blood products.

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

To obtain the 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 specimens cannot be assayed within this time, they must be stored at -20°C for up to 30 days. Avoid repetitive freezing and thawing.

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

6.4. procedure

- **Allow all reagents to reach room temperature (22-28°C) for at least 30 minutes.** At the end of the assay, store immediately the reagents at 2-8°C: avoid long exposure to room temperature.
- Unused coated microwell strips should be released securely in the foil pouch containing desiccant and stored at 2-8°C.
- To avoid potential microbial and/or chemical contamination, unused reagents should never be transferred into the original vials.
- As it is necessary to perform the determination in duplicate in order to improve accuracy of the test results, prepare two wells for each point of the calibration curve (C₀-C₅), two for each Control, two for each sample, one for Blank.

Reagent	Calibrator	Sample	Blank
Calibrator C ₀ -C ₅	50 µL		
Sample		50 µL	
Conjugate	100 µL	100 µL	
Incubate at room temperature (22-28°C) for 2 hours. Remove the content from each well. Wash the wells 3 times with 300 µL of diluted Wash Solution. 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: if you use automated equipment, wash the wells at least 5 times.			
TMB Substrate	100 µL	100 µL	100 µL
Incubate at room temperature (22-28°C) for 15 minutes in the dark.			
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL
Shake the microplate gently. Read the absorbance (E) at 450 nm against a reference wavelength of 620-630 nm or against Blank within 5 minutes.			

7. 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.

8. RESULTS

8.1. Note

The optical densities (O.D.) of some calibrators 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. higher than 2.0, to perform a reading at 405 nm (=wavelength of peak shoulder) in addition to 450 nm (peak wavelength) and 620 nm (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 OD 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 his own reader.

8.2. Mean Absorbance

Calculate the mean of the absorbance (Em) for each point of the calibration curve and of each sample.

8.3. Calibration curve – Automatic method

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

8.4. Calibration 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 calibrator 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).

9. REFERENCE VALUES

C-Peptide values are consistently higher in plasma than in serum; thus, serum is preferred.

In concordance with the published literature the following ranges have been assigned.

	C-Peptide
Adult (Normal)	0,7 – 1,9 ng/mL

Please pay attention to the fact that the determination of a range of expected values for a “normal” population in a given method is dependent on many factors, such as specificity and sensitivity of the method used and type of population under investigation. Therefore each laboratory should consider the range given by the Manufacturer as a general indication and produce their own range of expected values based on the indigenous population where the laboratory works.

10. PERFORMANCE AND CHARACTERISTICS

10.1. Precision

10.1.1. Intra Assay

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

10.1.2. Inter Assay

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

10.2. Sensitivity

The lowest detectable concentration of C-Peptide that can be distinguished from the Calibrator 0 is 0.01 ng/mL at the 95 % confidence limit.

10.3. Specificity

The cross reactivity of the C-Peptide ELISA 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 μ IU/mL	N.D.	Not Detected
Proinsulin	1000 ng/mL	N.D.	Not Detected

10.4. Correlation

Dia.Metra C-Peptide ELISA 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 commercial kit

x = C-Peptide Dia.Metra kit

11. WASTE MANAGEMENT

Reagents must be disposed off in accordance with local regulations.

diagnostic blood specimens by venipuncture: approved standards. 4th Ed. NCCLS Document H3-A4, Wayne, PA(1988).

- Turkinton RW., Estkowski A., Link M. Secretion of Insulin dependence of connecting peptide; a predictor of insulin or dependence of obese diabetics. *Archive of Internal Med.* 142
- Sacks BD: Carbohydrates in Burtis, C.A. and Ashwood, AR (Eds) *Tietz Textbook OF Clinical Chemistry.* 2nd Ed. Philadelphia W. .B. Saunders Co. 1994
- Kahn CR, Rosenthal AS, Immunologic reactions to insulin, insulin allergy, insulin resistance and autoimmune insulin syndrome. *Diabetes Care* 2, 283 – 295 (1979)

Ed. 03/2024

DCM077-8

BIBLIOGRAPHY

- Eastham R.D: Biochemical Values in Clinical Medicine, 7th Ed. Bristol. England. Jonh Wright & Sons, Ltd;. (1985).
- Gerbitz, V.K.D., Pancreatische B-zellen Peptide: *Kinetic and Konzentration von Proinsulin Insulin and C- Peptide* in Plasma and Urin Probleme der Mezmethoden Klinische und Literaturubersicht. *J. Clin. Chem. Biochem.* 18, 313-326. (1980)
- Boehm TM, Lebovitz HE, statistical nalysis of Glucose and Insulin responses to intravenous tolbutamide: evaluation of hypoglycemic and hyperinsulinemic states: *Diabetes Care* 479-490. (1079)
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Procedure for the collection of



DCM077-8

Ed. 03/2024

C-PEPTIDE ELISA

(PÉPTIDO C ELISA)

para análisis de rutina

Determinación inmunoenzimática directa del nivel de Péptido C en suero o plasma humano

IVD

LOT

Ver etiqueta externa

2°C 8°C



Σ = 96 ensayos

REF

DKO077

USO PREVISTO

El kit C-Peptide ELISA es un método inmunoenzimático directo en fase sólida para la determinación cuantitativa de Péptido C en suero o plasma humano.

El kit C-Peptide ELISA está destinado al uso en laboratorio exclusivamente.

1. SIGNIFICADO CLÍNICO

Péptido C es la abreviatura de péptido de conexión. Es un péptido de 31 aminoácidos. El péptido C es el terminal C liberado durante la maduración de la proinsulina a insulina. La proinsulina madura cuando es liberada por el páncreas a la circulación sanguínea, una molécula de péptido C por cada molécula de insulina. El péptido C no tiene actividad biológica, pero parece ser necesario para mantener la integridad estructural de la insulina.

La determinación in vitro del nivel de péptido C e insulina ayuda en el diagnóstico en caso de enfermedades hepáticas, acromegalia, síndrome de Cushing, intolerancia hereditaria a la glucosa, insulinemia, disfunciones renales, ingestión oral accidental de fármacos hipoglucémicos o hipoglucemia dependiente del péptido C.

El paciente al que se ha diagnosticado diabetes se somete a la medición de los niveles de péptido C para determinar el tipo de diabetes. El páncreas de los pacientes con diabetes de tipo 1 no puede producir insulina y, por lo tanto, tendrán un nivel mínimo de péptido C, mientras que los niveles de péptido C en la diabetes de tipo 2 son normales o superiores a lo normal. La medición de péptido C en pacientes que se inyectan insulina puede ser útil en la evaluación de la secreción endógena de la insulina. La medición del péptido C es analíticamente más sensible que la de la insulina. La insulina y el péptido C son secretados en la circulación portal en concentración equimolar; los niveles en ayunas de péptido C son 5-10 veces superiores a los de insulina, puesto que la vida media del péptido C es mucho más larga. El péptido C no se metaboliza por el hígado, se elimina de la circulación y se degrada en los riñones con una fracción que pasa a la orina sin sufrir modificaciones. Por lo tanto, los niveles de

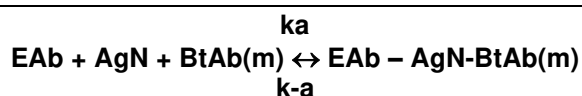
péptido C urinario están correlacionados con los niveles en ayunas de péptido C sérico.

2. PRINCIPIO DEL MÉTODO

El reactivo esencial requerido para el ensayo inmunoenzimático incluye anticuerpos específicos y con alta afinidad (conjugados con enzima e inmovilizados), con reconocimiento de epítopos distintos, en exceso, y antígeno nativo. En este procedimiento, la inmovilización se produce durante el ensayo en la superficie de los pocillos de la microplaca mediante la interacción de la estreptavidina (S. Avidin) que recubre el pocillo con el anticuerpo monoclonal anti-péptido C biotinilado (Ab).

Mezclando el anticuerpo monoclonal biotinilado, el anticuerpo conjugado con enzima y un suero que contiene el antígeno nativo (Ag), se produce la reacción entre el antígeno nativo y los anticuerpos, sin competencia o impedimento estérico, para formar un complejo sándwich soluble.

La interacción se ilustra mediante la siguiente ecuación:



BtAb(m) = anticuerpo monoclonal biotinilado (cantidad en exceso)

AgN = antígeno nativo (cantidad variable)

EAb = anticuerpo conjugado con enzima (cantidad en exceso)

EAb -AgN-BtAb(m) = complejo sándwich antígeno-anticuerpo.

k_a = constante de asociación

k_{-a} = constante de disociación

Al mismo tiempo, el complejo se deposita en el pocillo mediante la reacción de alta afinidad de la estreptavidina y el anticuerpo biotinilado. Esta interacción se muestra a continuación:

EAb -AgN-BtAb(m) + estreptavidina C.W.
⇒ **complejo inmovilizado**

Estreptavidina C.W. = estreptavidina inmovilizada en el pocillo

Complejo inmovilizado = complejo sándwich unido al pocillo.

Tras lograr el equilibrio, la fracción de anticuerpo unida se separa del antígeno libre mediante lavado. La actividad de la enzima en la fracción de anticuerpo unida es directamente proporcional a la concentración de antígeno nativo. La actividad de la enzima presente en la superficie del pocillo se mide cuantitativamente con un sustrato adecuado por vía colorimétrica. Utilizando distintos calibradores con valor de antígeno conocido se puede crear una curva de dosificación de la que se puede extrapolar la concentración de antígeno de una muestra desconocida.

3. REACTIVOS, MATERIALES E INSTRUMENTACIÓN

3.1. Reactivos y materiales suministrados en el kit

1. Calibradores 6 frascos, 2 mL cada uno, liofilizados), ProClin <0,0015%

CAL0	REF DCE002/7706-0
CAL1	REF DCE002/7707-0
CAL2	REF DCE002/7708-0
CAL3	REF DCE002/7709-0
CAL4	REF DCE002/7710-0
CAL5	REF DCE002/7711-0

2. Conjugado (1 frasco, 13 mL)

Anticuerpo anti-péptido C conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) y anticuerpo anti-péptido C biotinilado, ProClin <0,0015% REF DCE002/7702-0

3. Microplaca recubierta (1 microplaca rompible) Microplaca recubierta con estreptavidina

REF DCE002/7703-0

4. Sustrato TMB (1 frasco, 15 mL)

H₂O₂ -TMB (0,26 g/L) (evitar el contacto con la piel), ProClin <0,0015% REF DCE004-0

5. Solución de parada (1 frasco, 15 mL)

Ácido sulfúrico 0,15 mol/L (evitar el contacto con la piel) REF DCE005-0

6. Solución de lavado conc. 50X (1 frasco, 20 mL)

NaCl 45 g/L; Tween-20 55 g/L, ProClin >0,0015% REF DCE006B-0

3.2. Reactivos necesarios no suministrados en el kit

Agua destilada.

3.3. Material e instrumentación auxiliares

Dispensadores automáticos.

Lector de microplacas (450 nm, 620-630 nm)

Nota

Conservar todos los reactivos a 2÷8 °C, protegidos de la luz. Abrir la bolsa del reactivo 3 (microplaca recubierta) solo cuando se encuentre a temperatura ambiente y cerrarla inmediatamente después de extraer las tiras que se vayan a utilizar; una vez abierta, permanece estable hasta la fecha de caducidad del kit.

4. ADVERTENCIAS

- Este kit de ensayo está previsto para usarse in vitro y por personal experto. No es para uso interno o externo en humanos o animales.
- Usar los equipos de protección individual previstos al trabajar con los reactivos suministrados.
- Siga las Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP) en el manejo de las muestras sanguíneas y sus derivados.
- Todos los reactivos de origen humano usados en la preparación de los reactivos se han comprobado y han resultado negativos para la presencia de anticuerpos anti-VIH, para HbsAg y para anticuerpos anti-VHC. Sin embargo, ningún ensayo ofrece seguridad absoluta de la ausencia de VIH, VHB, VHC o de otros agentes infecciosos. Por lo tanto, los Calibradores deben manipularse como material potencialmente infeccioso.
- Algunos reactivos (solución de lavado) contienen pequeñas cantidades de ProClin™ 300 (>0,0015%, <0,06%) como conservante. Evite el contacto con la piel o las mucosas.
- Clasificación según Reglamento (UE) n° 1272/2008 [CLP] Sensibilización cutánea, categoría 1



Atención

Contiene: ProClin 300

Indicaciones de peligro:

H317 - Puede provocar una reacción alérgica en la piel.

Consejos de prudencia:

P261 - Evitar respirar el polvo / el humo / el gas / la niebla / los vapores / el aerosol.

P280 - Llevar guantes / ropa de protección / equipo de protección para los ojos / la cara / los oídos.

P321 - Se necesita un tratamiento específico (ver instrucciones de primeros auxilios en esta etiqueta).

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.

- El cromógeno TMB contiene un irritante que puede ser dañino si se inhala, se ingiere o se absorbe a través de la piel. Para prevenir lesiones, evitar la inhalación, la ingestión o el contacto con la piel y con los ojos.
- La Solución de Parada está formada por una solución de ácido sulfúrico diluido. El ácido sulfúrico es venenoso y corrosivo, y puede ser tóxico si se ingiere. Para prevenir posibles quemaduras químicas, evitar el contacto con la piel y con los ojos.
- Evite la exposición de los reactivos TMB/H₂O₂ a la luz solar directa, metales u oxidantes. No congelar la solución.

- Este método permite la determinación cuantitativa de péptido C de 0,2 a 10,0 ng/mL.

5. PRECAUCIONES

- Respetar rigurosamente la secuencia de los pasos indicados en este protocolo. Los resultados aquí presentados se han obtenido utilizando los reactivos específicos que figuran en estas instrucciones de uso.
- Todos los reactivos deben conservarse a una temperatura controlada de 2-8°C en sus recipientes originales. Todas las excepciones están claramente marcadas. Los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad cuando se almacenan y manipulan de acuerdo con las instrucciones proporcionadas.
- Antes del uso, esperar hasta que todos los componentes del kit y las muestras se encuentren a temperatura ambiente (22-28°C) y mezclar cuidadosamente.
- No mezclar componentes de kits de lotes distintos. Se debe observar la fecha de caducidad indicada en la etiqueta de la caja y de todas las ampollas. No usar componentes después de la fecha de caducidad.
- Si utiliza un equipo automático, es responsabilidad del usuario asegurar que la metodología aplicada haya sido debidamente validada.
- 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, se recomienda aumentar el número de lavados.
- Para la reproducibilidad de los resultados, es importante que el tiempo de reacción sea igual para cada pocillo. El tiempo de dispensación de los pocillos no debe superar los 10 minutos; si se prolongara más allá de los 10 minutos, respétese el orden de dispensación. Si utiliza más de una placa, se recomienda repetir la curva de calibración en cada placa.
- Al añadir el Sustrato TMB se inicia una reacción cinética que termina al agregar la Solución de Parada. Tanto el Sustrato TMB como la Solución de Parada deben agregarse en la misma secuencia para evitar diferentes tiempos de reacción.
- Observar las directrices para la ejecución del control de calidad en los laboratorios clínicos al comprobar controles y/o pool de sueros.
- Observar la máxima precisión en la reconstitución y dispensación de los reactivos.
- No use muestras con contaminación microbiana, altamente lipémicas o hemolizadas.
- Los lectores de microplacas leen las DO verticalmente, por tanto no debe tocarse el fondo de los pocillos.

6. PROCEDIMIENTO

6.1. Preparación de los Calibradores (C₀...C₅)

Los Calibradores se han calibrado usando una solución de referencia, que se ha ensayado frente a la WHO 1ª IRR 84/510. Los Calibradores tienen las siguientes concentraciones:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅
ng/mL	0	0,2	1,0	2,0	5,0	10,0

Reconstituir cada frasco con 2 mL de agua destilada o desionizada.

Los Calibradores reconstituidos se mantienen estables 7 días a 2-8°C. Para períodos más largos, conservar los Calibradores en alícuotas en frascos adecuados a -20°C (estables durante 6 meses). Descongelar una sola vez. Contiene conservantes.

6.2. Preparación de la solución de lavado

Antes del uso, diluir el contenido de cada ampolla de "Solución de lavado conc. 50X" con agua destilada hasta un volumen de 1000 mL. Para preparar volúmenes menores, respetar la relación de dilución de 1:50. La solución de lavado diluida se mantiene estable a 2-8°C durante al menos 30 días.

6.3. Preparación de la muestra

Seguir las buenas normas de laboratorio al utilizar los productos a base de sangre.

Obtener las muestras de suero por la mañana y en ayunas para una comparación precisa que permita determinar los valores normales.

Para obtener el suero, la sangre se debe recoger en un tubo de extracción sin aditivos ni anticoagulantes. Permitir que la sangre se coagule. Centrifugar las muestras para separar el suero de las células.

Las muestras deben conservarse a 2-8°C durante un período máximo de 5 días. Si no se van a utilizar en este tiempo, pueden conservarse a -20°C hasta 30 días.

Evitar ciclos repetidos de congelación y descongelación.

Las muestras de pacientes con concentraciones de péptido C superiores a 10 ng/mL pueden diluirse (por ejemplo, 1:10 o superior) con el Calibrador 0 y comprobarse de nuevo. La concentración de las muestras se obtiene multiplicando el resultado por el factor de dilución.

6.4. Procedimiento

- **Esperar hasta que todos los reactivos se encuentren a temperatura ambiente (22-28°C) durante al menos 30 minutos.** Al final del ensayo inmediatamente poner todos los reactivos a 2-8°C para evitar largos periodos a temperatura ambiente.
- Las tiras de pocillos no utilizados se deben guardar de inmediato en la bolsa desechable que contiene desecantes y almacenarse a 2-8°C.
- Para evitar la contaminación microbiana y/o química no regrese porciones de reactivos no usados en los viales originales.

- Para aumentar la precisión de los resultados de la prueba es necesario trabajar en duplicado: preparar dos pocillos para cada punto de la curva de calibración (C_0 - C_5), dos para cada control, dos para cada muestra, uno para el blanco.

Reactivo	Calibrador	Muestra	Blanco
Calibrador C_0 - C_5	50 μ L		
Muestra		50 μ L	
Conjugado	100 μ L	100 μ L	
Incubar 2 h a temperatura ambiente ($22 \pm 28^\circ\text{C}$). Retirar el contenido de cada pocillo y lavar 3 veces con 300 μ L de solución de lavado diluida. 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 golpéeela repetidas veces contra una servilleta de papel absorbente. Lavados automático: si está utilizando una lavadora automática, lavar los pocillos al menos 5 veces.			
Substrato TMB	100 μ L	100 μ L	100 μ L
Incubar 15 minutos a temperatura ambiente ($22 \pm 28^\circ\text{C}$), en la oscuridad.			
Solución de parada	100 μ L	100 μ L	100 μ L
Agitar la microplaca con cuidado. Leer la absorbancia (E) a 450 nm frente una segunda lectura de referencia a 620-630 nm o frente al blanco dentro de los 5 minutos.			

7. CONTROL DE CALIDAD

Cada laboratorio debe analizar los controles a niveles de los rangos bajo, medio y alto de la curva de calibración para supervisar el rendimiento del kit. Estos controles deben tratarse como desconocidos y sus valores deben determinarse en cada procedimiento de ensayo realizado. Se deben mantener los gráficos de control de calidad para seguir el rendimiento de los reactivos suministrados. Se deben emplear métodos estadísticos adecuados para determinar las tendencias. Desviaciones significativas del rendimiento establecido pueden indicar un cambio inadvertido en las condiciones experimentales o la degradación de los reactivos del kit. Se deben usar reactivos frescos para determinar la causa de las variaciones.

8. RESULTADOS

8.1. Nota

Las densidades ópticas (DO) de algunos calibradores y muestras pueden ser superiores a 2,0. En ese caso, podrían estar fuera del rango de medición del lector de microplacas. Por lo tanto, para

DO superiores a 2,0, es necesario realizar una lectura a 405 nm (= longitud de onda de entrada pico principal) además de a 450 nm (longitud de onda pico principal) y a 620 nm (filtro de referencia para la disminución de interferencias debidas al plástico). Con lectores de microplacas no diseñados para leer la placa a tres longitudes de onda distintas a la vez, se recomienda proceder del siguiente modo:

- Leer la microplaca a 450 nm y a 620 nm.
- Volver a leer la placa a 405 nm y a 620 nm.
- Seleccionar los pocillos cuyas DO a 450 nm sean superiores a 2,0.
- Seleccionar las DO correspondientes leídas a 405 nm y multiplicar estos valores a 405 nm por el factor de conversión 3,0 (donde $DO_{450}/DO_{405} = 3,0$), es decir: $DO_{450\text{ nm}} = DO_{405\text{ nm}} \times 3,0$.

Atención: El factor de conversión 3,0 es solo una sugerencia. Para mayor precisión, se recomienda calcular el factor de conversión específico para el lector empleado.

8.2. Absorbancia media

Calcular la absorbancia media (E_m) de cada punto de la curva de calibración (C_0 - C_5) y de cada muestra.

8.3. Curva de calibración – Método automático

Usar el modelo logístico de 4 parámetros (preferido) o la función spline cúbico suavizado como algoritmo de cálculo.

8.4. Curva de calibración – Método manual

Se usa una curva de respuesta para determinar la concentración de péptido C en una muestra desconocida.

Registrar las DO obtenidas en el informe impreso del lector de microplacas.

Introducir en el gráfico las DO para cada duplicado de los Calibradores frente a las concentraciones correspondientes de péptido C en ng/mL en papel lineal (no calcular los duplicados de los calibradores antes del trazado).

Dibujar la curva que mejor se adapte a los valores a través de los puntos dibujados.

Para determinar la concentración de péptido C de una muestra desconocida, localizar la DO media de los duplicados de las muestras desconocidas correspondientes en el eje vertical del gráfico, localizar el punto de intersección de la curva y leer la concentración (en ng/mL) en el eje horizontal del gráfico (se puede calcular el promedio de los duplicados de la muestra desconocida como se indica).

9. VALORES DE REFERENCIA

Los valores de péptido C son considerablemente más altos en plasma que en suero, pero es preferible usar suero.

Los rangos se han asignado tomando como base los datos clínicos, de acuerdo con los trabajos publicados en la literatura:

	Péptido C
Adultos (normales)	0,7 – 1,9 ng/mL

Es importante señalar que la determinación de un rango de valores esperados en un método dado para una población "normal" depende de muchos factores, tales como la especificidad y sensibilidad del método en uso, y la población en estudio. Por lo tanto, cada laboratorio debe considerar el intervalo especificado por el fabricante como una guía general y producir su propio rango de valores calculados en base al estadístico obtenido por el laboratorio, donde reside la población local.

10. PARÁMETROS CARACTERÍSTICOS

10.1. Precisión

10.1.1. Intraensayo

La variabilidad dentro del mismo kit se ha determinado replicando (16x) la medición de tres sueros de control distintos. La variabilidad intraensayo es $\leq 6,2\%$.

10.1.2. Interensayo

La variabilidad entre distintos kits se ha determinado replicando (20x) la medición de tres sueros de control distintos con kits pertenecientes a lotes distintos. La variabilidad interensayo es $\leq 10,0\%$.

10.2. Sensibilidad

La concentración mínima de péptido C medible que puede distinguirse del Calibrador 0 es 0,01 ng/mL con un límite de confianza del 95%.

10.3. Especificidad

El anticuerpo empleado presenta las siguientes reacciones cruzadas, evaluadas añadiendo las sustancias interferentes. La reactividad cruzada se calculó evaluando la relación entre la dosis de la sustancia interferente y la dosis de péptido C necesaria para obtener la misma absorbancia.

Reactivo cruzado	Solución Comprobada	Obtenida	Reactividad cruzada
Péptido C	---	---	100 %
Insulina	10000 μ IU/mL	N.D.	No detectada
Proinsulina	1000 ng/mL	N.D.	No detectada

10.4. Correlación

El kit C-Peptide ELISA (Dia.Metra) se ha comparado con un kit disponible en el mercado. Se han comprobado 194 muestras de suero.

La curva de regresión es:

$$y = 1,012 x + 0,025$$

$$r^2 = 0,991$$

y = kit Péptido C comercial

x = kit Péptido C Dia.Metra

11. DISPOSICIONES PARA LA ELIMINACIÓN

Los reactivos deben eliminarse de acuerdo con las leyes locales.

BIBLIOGRAFÍA

- Eastham R.D: Biochemical Values in Clinical Medicine, 7th Ed. Bristol. England. Jonh Wright & Sons, Ltd;. (1985).
- Gerbitz, V.K.D, J.Clin.Chem.Biochem. 18, 313-326 (1980)
- Boehm TM, et al Diabetes Care 479-490. (1079)
- 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).
- Turkinton RW, et al Archive of Internal Med. 142
- Sacks BD Carbohydrates in Burtis, C.A. and Ashwood, AR (Eds) Tietz Textbook OF Clinical Chemistry. 2nd Ed. Philadelphia w.B. Saunders Co. 1994
- Kahn CR, et al Diabetes Care 2, 283 – 295 (1979)

Ed. 03/2024

DCM077-8

	DE ES FR EN IT PT	<i>In vitro</i> Diagnostikum Producto sanitario para diagnóstico <i>In vitro</i> Dispositif medical de diagnostic <i>in vitro</i> <i>In vitro</i> Diagnostic Medical Device Dispositivo medico-diagnostico <i>in vitro</i> Dispositivos medicos de diagnostico <i>in vitro</i>		DE ES FR EN IT PT	Hergestellt von Elaborado por Fabriqué par Manufacturer Produttore Produzido por
	DE ES FR EN IT PT	Achtung, Begleitdokumente Precaución, consulte los documentos adjuntos Attention, veuillez consulter les documents d'accompagnement Caution, consult accompanying documents Attenzione, consultare la documentazione allegata Atenção, consultar os documentos de acompanhamento	 yyyy-mm	DE ES FR EN IT PT	Herstellungs datum Fecha de fabricacion Date de fabrication Date of manufacture Data di produzione Data de produção
 yyyy-mm-dd	DE ES FR EN IT PT	Verwendbar bis Estable hasta (usar antes de último día del mes) Utiliser avant (dernier jour du mois indiqué) Use by (last day of the month) Utilizzare prima del (ultimo giorno del mese) Utilizar (antes ultimo día do mês)		DE ES FR EN IT PT	Biogefährdung Riesco biológico Risque biologique Biological risk Rischio biologico Risco biológico
	DE ES FR EN IT PT	Gebrauchsanweisung beachten Consultar las instrucciones Consulter le mode d'emploi Consult instructions for use Consultare le istruzioni per l'uso Consultar instruções para uso		DE ES FR EN IT PT	Chargenbezeichnung Codigo de lote Numero de lot Batch code Codice del lotto Codigo do lote
 $\Sigma = xx$	DE ES FR EN IT PT	Ausreichend für "n" Tests Contenido suficiente para "n" tests Contenu suffisant pour "n" tests Contains sufficient for "n" tests Contenuto sufficiente per "n" saggi Contém o suficiente para "n" testes		DE ES FR EN IT PT	Inhalt Contenido del estuche Contenu du coffret Contents of kit Contenuto del kit Conteúdo do kit
 Max Min	DE ES FR EN IT PT	Temperaturbereich Limitación de temperatura Limites de température de conservation Temperature limitation Limiti di temperatura Temperaturas limites de conservação		DE ES FR EN IT PT	Bestellnummer Número de catálogo Références du catalogue Catalogue number Numero di Catalogo Número do catálogo
	DE ES FR EN IT PT	Vor direkter Sonneneinstrahlung schützen Mantener alejado de la luz solar Tenir à l'écart de la lumière du soleil Keep away from sunlight Tenere lontano dalla luce solare Mantenha longe da luz solar			