

Instructions for use
C-Peptide ELISA

Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit

1 INTENDED USE

The **C-Peptide ELISA** is an enzyme immunoassay for the quantitative *in vitro diagnostic* measurement of C-Peptide in serum, plasma (EDTA, lithium heparin or citrate plasma) and urine.

1.1 Summary and Explanation

Insulin is synthesized in the pancreatic beta cells as a 6000 MW component of an 86 amino acid polypeptide called proinsulin (1, 2, 3). Proinsulin is subsequently cleaved enzymatically, releasing insulin into the circulation along with a residual 3000 MW fragment called connection ("C") peptide, so-named because it connects A and B chains of insulin within the proinsulin molecule (1, 2, 3, 4). Human C-Peptide, a 31 amino acid residue peptide, has a molecular mass of approximately 3000 daltons. C-Peptide has no metabolic function. However, since C-Peptide and insulin are secreted in equimolar amounts, the immunoassay of C-Peptide permits the quantitation of insulin secretion (4, 5, 6). This is the reason for the clinical interest of serum and urinary determinations of C-Peptide. Moreover, C-Peptide measurement has several advantages over immunoassays of insulin.

The half-life of C-Peptide in the circulation is between two and five times longer than that of insulin (7). Therefore, C-Peptide levels are a more stable indicator of insulin secretion than the more rapidly changing levels of insulin. A very clear practical advantage of C-Peptide measurement arising from its relative metabolic inertness as compared to insulin is that C-Peptide levels in peripheral venous blood are about 5–6 times greater than insulin levels (3). Also, relative to an insulin assay, the C-Peptide assay's advantage is its ability to distinguish endogenous from injected insulin.

Thus, low C-Peptide levels are to be expected when insulin is diminished (as in insulin-dependent diabetes) or suppressed (as a normal response to exogenous insulin), whereas elevated C-Peptide levels may result from the increased β -cell activity observed in insulinomas (3, 6, 9).

C-Peptide has also been measured as an additional means for evaluating glucose tolerance and glibenclamide glucose tests (2, 3, 9, 10).

C-Peptide levels are in many ways a better measurement of endogenous insulin secretion than peripheral insulin levels. C-Peptide may be measured in either blood or urine (9). With improved sensitive C-Peptide immunoassays, it is now possible to measure C-Peptide values at extremely low levels. The clinical indications for C-Peptide measurement include diagnosis of insulinoma and differentiation from factitious hypoglycemia, follow-up of pancreatectomy, and evaluation of viability of islet cell transplants (11, 12, 13). Recently, these indications have been dramatically expanded to permit evaluation of insulin dependence in maturity onset diabetes mellitus.

1.2 Clinical Indications for the C-Peptide ELISA

- Assessment of residual β -cell function in diabetics under insulin therapy
- Detection and monitoring of the remission phase of type I diabetes
- Adjunct in the differential diagnosis between type I (insulin dependent) and type II (non-insulin-dependent) diabetes
- Diagnosis of insulin-induced factitious hypoglycemia
- Contribution to the diagnosis of insulinoma (insulin suppression test)
- Prognostic index of fetal outcome in pregnant diabetic women
- Evaluation of insulin secretion in liver disease
- Monitoring of pancreatectomy

2 PRINCIPLE OF THE TEST

The C-Peptide ELISA Kit is a solid phase enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), based on the **principle of competitive binding**.

The microtiter wells are coated with anti-mouse antibodies, which in turn bind monoclonal antibodies directed against an epitope of the C-peptide molecule.

During an incubation, C-Peptide in the added sample competes with the added enzyme conjugate, which is C-Peptide conjugated to horseradish peroxidase, for the free binding sites on the immobilised antibodies.

After a washing step to remove all unbound substances, the solid phase is incubated with the substrate solution. The colorimetric reaction is stopped by addition of stop solution, and optical density (OD) of the resulting yellow product is measured. The intensity of colour is inversely proportional to the concentration of the analyte in the sample.

A standard curve is constructed by plotting OD values against concentrations of standards, and concentrations of unknown samples are determined using this standard curve.

3 WARNINGS AND PRECAUTIONS

1. This kit is for in vitro diagnostic use only. For professional use only.
2. All reagents of this test kit which contain human serum or plasma have been tested and confirmed negative for HIV I/II, HBsAg and HCV by FDA approved procedures. All reagents, however, should be treated as potential biohazards in use and for disposal.
3. Before starting the assay, read the instructions completely and carefully. Use the valid version of instructions for use provided with the kit. Be sure that everything is understood.
4. The microplate contains snap-off strips. Unused wells must be stored at 2 °C – 8 °C in the sealed foil pouch and used in the frame provided.
5. Pipetting of samples and reagents must be done as quickly as possible and in the same sequence for each step.
6. Use reservoirs only for single reagents. This especially applies to the substrate reservoirs. Using a reservoir for dispensing a substrate solution that had previously been used for the conjugate solution may turn solution coloured. Do not pour reagents back into vials as reagent contamination may occur.
7. Mix the contents of the microplate wells thoroughly to ensure good test results. Do not reuse microwells.
8. Do not let wells dry during assay; add reagents immediately after completing the rinsing steps.
9. Allow the reagents to reach room temperature (20 °C – 26 °C) before starting the test. Temperature will affect the absorbance readings of the assay. However, values for the patient samples will not be affected.
10. Never pipet by mouth and avoid contact of reagents and specimens with skin and mucous membranes.
11. Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics in areas where specimens or kit reagents are handled.
12. Wear disposable latex gloves when handling specimens and reagents. Microbial contamination of reagents or specimens may give false results.
13. Handling should be done in accordance with the procedures defined by an appropriate national biohazard safety guideline or regulation.
14. Do not use reagents beyond expiry date as shown on the kit labels.
15. All indicated volumes have to be performed according to the protocol. Optimal test results are only obtained when using calibrated pipettes and microtiter plate readers.
16. Do not mix or use components from kits with different lot numbers. It is advised not to exchange wells of different plates even of the same lot. The kits may have been shipped or stored under different conditions and the binding characteristics of the plates may result slightly different.
17. Avoid contact with *Stop Solution* containing 0.5 M H₂SO₄. It may cause skin irritation and burns.
18. Some reagents contain Proclin 300, BND and/or MIT as preservatives. In case of contact with eyes or skin, flush immediately with water.
19. TMB substrate has an irritant effect on skin and mucosa. In case of possible contact, wash eyes with an abundant volume of water and skin with soap and abundant water. Wash contaminated objects before reusing them. If inhaled, take the person to open air.
20. Chemicals and prepared or used reagents have to be treated as hazardous waste according to the national biohazard safety guideline or regulation.
21. For information on hazardous substances included in the kit please refer to Safety Data Sheets. Safety Data Sheets for this product are available upon request directly from the manufacturer.

4 REAGENTS

4.1 Reagents provided

ME E-0131  96 **Microtiterwells**
12 x 8 (break apart) strips, 96 wells,
wells coated with anti-mouse-antibody

Standards

	Cat. no.	Standard	Concentration	Volume/Vial
STANDARD A	ME E-0101	Standard A	0–16 ng/ml (see exact value on the vial label or on the QC- Datasheet)	0.75 ml
STANDARD B	ME E-0102	Standard B		0.75 ml
STANDARD C	ME E-0103	Standard C		0.75 ml
STANDARD D	ME E-0104	Standard D		0.75 ml
STANDARD E	ME E-0105	Standard E		0.75 ml
STANDARD F	ME E-0106	Standard F		0.75 ml

lyophilized

The standards are calibrated against WHO approved International Reference Reagent IRR C-Peptide, NIBSC code 84/510.

See „Preparation of Reagents“;

Contain non-mercury preservative.

ME E-0160 **SAMPLE-DIL** **Sample Diluent**

1 vial, 3 ml, ready to use;
Contains non-mercury preservative.

ME E-0110 **AS** **Antiserum**

1 vial, 7 ml, ready to use,
monoclonal mouse anti C-Peptide antibody;
Contains non-mercury preservative.

ME E-0140 **CONJUGATE** **Enzyme Conjugate**

1 vial, 14 ml, ready to use,
biotinylated C-Peptide;
Contains non-mercury preservative.

ME E-0141 **ENZYME** **Enzyme Complex**

1 vial, 14 ml, ready to use,
contains horseradish Peroxidase;
Contains non-mercury preservative.

FR E-0055 **SUBSTRATE** **Substrate Solution**

1 vial, 14 ml, ready to use,
TMB

FR E-0080 **STOP-SOLN** **Stop Solution**

1 vial, 14 ml, ready to use,
contains 0.5 M H₂SO₄;
Avoid contact with the Stop Solution. It may cause skin irritations and burns.

Hazards

identification:



H290 May be corrosive to metals.

H314 Causes severe skin burns and eye damage.

FR E-0030 **WASH-CONC 40x** **Wash Solution**

1 vial, 30 ml (40X concentrated),
see „Preparation of Reagents“

Note: Additional *Sample Diluent* for sample dilution is available upon request.

4.2 Materials required but not provided

- A calibrated microtiter plate reader (450 nm, with reference wavelength at 620 nm to 630 nm)
- Calibrated variable precision micropipettes
- Manual or automatic equipment for rinsing microtiter plates
- Absorbent paper
- Distilled water
- Timer
- Semi logarithmic graph paper or software for data reduction

4.3 Storage Conditions

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

4.4 Reagent Preparation

Bring all reagents and required number of strips to room temperature (20 °C to 26 °C) prior to use.

Standards

Reconstitute the lyophilized contents of each standard vial with 0.75 ml distilled water and let stand for 10 minutes in minimum. Mix several times before use.

Note: The reconstituted standards are stable for 3 days at 2 °C – 8 °C.

For longer storage the reconstituted standards should be aliquoted and stored at -20 °C.

Wash Solution

Add distilled water to the 40X concentrated Wash Solution.

Dilute 30 ml of concentrated *Wash Solution* with 1170 ml distilled water to a final volume of 1200 ml.

The diluted *Wash Solution* is stable for 1 week at room temperature.

4.5 Disposal of the Kit

The disposal of the kit must be made according to the national regulations. Special information for this product is given in the Safety Data Sheet.

4.6 Damaged Test Kits

In case of any severe damage to the test kit or components, the manufacturer has to be informed in writing, at the latest, one week after receiving the kit. Severely damaged single components should not be used for a test run. They have to be stored until a final solution has been found. After this, they should be disposed according to the official regulations.

5 SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Serum, plasma (EDTA, lithium heparin or citrate plasma) or urine can be used in this assay.

Note: Samples containing sodium azide should not be used in the assay.

In general, it should be avoided to use haemolytic, icteric, or lipaemic specimens. For further information refer to chapter "Interfering Substances".

5.1 Specimen Collection

Serum:

Collect blood by venipuncture (e.g. Sarstedt Monovette for serum), allow to clot, and separate serum by centrifugation at room temperature. Do not centrifuge before complete clotting has occurred. Patients receiving anticoagulant therapy may require increased clotting time.

Plasma:

Whole blood should be collected into centrifuge tubes containing anti-coagulant (e.g. Sarstedt Monovette with the appropriate plasma preparation) and centrifuged immediately after collection.

Urine:

The total volume of urine excreted during a 24-hour-period should be collected and mixed in a single container.

Note: Specimens should be stored at 2 °C – 8 °C during collection period and total volume collected should be recorded.

5.2 Specimen Storage and Preparation

Serum / Plasma:

Specimens should be capped and may be stored for up to 24 hours at 2 °C to 8 °C prior to assaying.

Specimens held for a longer time (up to 12 months) should be frozen only once at -20 °C prior to assay. Thawed samples should be inverted several times prior to testing.

Urine:

Aliquot a well-mixed sample to be used in the assay. Centrifuge sample to clear. Urine samples may be stored for up to 36 hours at 2 °C – 8 °C prior to assaying.

Specimens held for a longer time (up to 12 months) should be frozen only once at -20 °C prior to assay.

5.3 Specimen Dilution

Serum / Plasma Samples

If in an initial assay, a specimen is found to contain more than the highest standard, the specimens can be diluted with *Sample Diluent* and reassayed as described in Assay Procedure.

For the calculation of the concentrations this dilution factor has to be taken into account.

Example:

a) dilution 1:10: 10 µl sample + 90 µl *Sample Diluent* (mix thoroughly)

b) dilution 1:100: 10 µl dilution a) 1:10 + 90 µl *Sample Diluent* (mix thoroughly).

Urine Samples

Prior to use dilute urine samples 1:20 with *Sample Diluent*.

If the *Sample Diluent* included in the kit is insufficient, you can order additional *Sample Diluent* (40 ml).

6 ASSAY PROCEDURE

6.1 General Remarks

- All reagents and specimens must be allowed to come to room temperature before use. All reagents must be mixed without foaming.
- Once the test has been started, all steps should be completed without interruption.
- Use new disposal plastic pipette tips for each standard, control or sample in order to avoid cross contamination.
- Optical density is a function of the incubation time and temperature. Before starting the assay, it is recommended that all reagents are ready, caps removed, all needed wells secured in holder, etc. This will ensure equal elapsed time for each pipetting step without interruption.
- As a general rule the enzymatic reaction is linearly proportional to time and temperature.

6.2 Test Procedure

Each run must include a standard curve.

1.	Secure the desired number of Microtiter wells in the frame holder.
2.	Dispense 100 µl of each <i>Standard</i> , control and sample <u>with new disposable tips</u> into appropriate wells.
3.	Dispense 50 µl <i>Antiserum</i> into each well.
4.	Dispense 100 µl <i>Enzyme Conjugate</i> into each well. Thoroughly mix for 10 seconds. It is important to have a complete mixing in this step.
5.	Incubate for 60 minutes at room temperature with shaking (500–600 rpm).
6.	Briskly shake out the contents of the wells. Rinse the wells 3 times with diluted Wash Solution (400 µl per well). Strike the wells sharply on absorbent paper to remove residual droplets. Important note: The sensitivity and precision of this assay is markedly influenced by the correct performance of the washing procedure!
7.	Add 100 µl of <i>Enzyme Complex</i> to each well.
8.	Incubate for 30 minutes at room temperature with shaking (500–600 rpm).
9.	Briskly shake out the contents of the wells. Rinse the wells 3 times with diluted Wash Solution (400 µl per well). Strike the wells sharply on absorbent paper to remove residual droplets.
10.	Add 100 µl of <i>Substrate Solution</i> to each well.
11.	Incubate for 20 minutes at room temperature.
12.	Stop the enzymatic reaction by adding 100 µl of <i>Stop Solution</i> to each well.
13.	Measure the optical density of the solution in each well at 450 nm (reading) and at 620 nm to 630 nm (background subtraction, recommended) with a microtiter plate reader. It is recommended that the wells be read within 10 minutes after adding the <i>Stop Solution</i> .

6.3 Calculation of Results

1. Calculate the average optical density (OD) values for each set of standards, controls and patient samples.
2. Using semi-logarithmic graph paper, construct a standard curve by plotting the mean OD obtained from each standard against its concentration with OD value on the vertical (Y) axis and concentration on the horizontal (X) axis.
3. Using the mean OD value for each sample determine the corresponding concentration from the standard curve.
4. Automated method: The results in the Instructions for Use have been calculated automatically using a 4-Parameter curve fit. (4 Parameter Rodbard or 4 Parameter Marquardt are the preferred methods.) Other data reduction functions may give slightly different results.
5. The concentration of the samples can be read directly from this standard curve. Samples with concentrations higher than that of the highest standard have to be further diluted or reported as > 16 ng/ml. For the calculation of the concentrations this dilution factor has to be taken into account.

6.3.1 Example of Typical Standard Curve

The following data is for demonstration only and **cannot** be used in place of data generations at the time of assay.

Standard	Optical Density (450 nm)
Standard A (0.0 ng/ml)	1.82
Standard B (0.2 ng/ml)	1.64
Standard C (0.7 ng/ml)	1.46
Standard D (2.0 ng/ml)	1.02
Standard E (6.0 ng/ml)	0.47
Standard F (16.0 ng/ml)	0.21

7 EXPECTED NORMAL VALUES

It is strongly recommended that each laboratory should determine its own normal and abnormal values.

In a study conducted with apparently normal healthy adults, using the C-Peptide ELISA the following values are observed:

	n	Mean $\pm$ 2SD
Serum (Post 12-hour Fasting)	60	0.5–3.2 ng/ml

	n	Range (min. – max.)	Mean	Median	50 th Percentile	95 th Percentile
Serum (females < 50 years)	42	0.1–5.8 ng/ml	1.0 ng/ml	0.7 ng/ml	0.2 ng/ml	3.9 ng/ml
Urine (males and females)	10	1–200 μ g/day	108 μ g/day	116 μ g/day	5 μ g/day	199 μ g/day

The results alone should not be the only reason for any therapeutic consequences. The results should be correlated to other clinical observations and diagnostic tests.

8 QUALITY CONTROL

Good laboratory practice requires that controls be run with each calibration curve. A statistically significant number of controls should be assayed to establish mean values and acceptable ranges to assure proper performance.

It is recommended to use control samples according to state and federal regulations. The use of control samples is advised to assure the day to day validity of results. Use controls at both normal and pathological levels.

The controls and the corresponding results of the QC-Laboratory are stated in the QC certificate added to the kit. The values and ranges stated on the QC sheet always refer to the current kit lot and should be used for direct comparison of the results.

It is also recommended to make use of national or international Quality Assessment programs in order to ensure the accuracy of the results.

Employ appropriate statistical methods for analysing control values and trends. If the results of the assay do not fit to the established acceptable ranges of control materials patient results should be considered invalid.

In this case, please check the following technical areas: Pipetting and timing devices; photometer, expiration dates of reagents, storage and incubation conditions, aspiration and washing methods.

After checking the above mentioned items without finding any error contact your distributor or the manufacturer directly.

9 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

9.1 Assay Dynamic Range

The range of the assay is between 0.06–16 ng/ml.

9.2 Specificity of Antibodies (Cross Reactivity)

The cross-reactivity of intact or split-Proinsulin is clinically not significant.

9.3 Sensitivity

The analytical sensitivity [$\text{Mean OD}_{(\text{Standard A})} - 2 \times \text{SD}$, $n = 20$] was calculated to be 0.064 ng/ml.

9.4 Reproducibility

9.4.1 Intra-Assay

The within assay variability is shown below:

Sample	n	Mean (ng/ml)	CV (%)
1	20	0.48	6.5
2	20	2.30	6.7
3	20	3.86	5.1

9.4.2 Inter-Assay

The between assay variability is shown below:

Sample	n	Mean (ng/ml)	CV (%)
1	12	0.42	9.3
2	12	2.05	9.9
3	12	4.23	8.4

9.4.3 Inter-Lot

The inter-assay (between-lots) variation was determined by measuring each sample 6 times with 3 different kit lots:

Sample	n	Mean (ng/ml)	CV (%)
1	21	1.86	4.8
2	21	5.05	3.2
3	21	13.9	2.9

9.5 Recovery

Samples have been spiked by adding C Peptide solutions with known concentrations.

The recovery (%) was calculated by multiplying the ratio of measured and expected values with 100.

Sample	1	2	3	4	5	6
Sample type	Serum	Serum	Serum	Urine	Urine	Urine
Concentration (ng/ml)	5.36	9.70	12.12	0.34	1.45	1.58
Average Recovery (%)	98.7	94.3	102.3	95.3	96.9	89.6
Range of Recovery (%)	from 96.5 to 101.7	87.3 104.8	88.1 110.4	85.4 106.4	88.7 105.5	85.4 100.1

9.6 Linearity

Samples were measured undiluted and in serial dilutions with Standard A. The recovery (%) was calculated by multiplying the ratio of expected and measured values with 100.

Sample	1	2	3	4	5	6
Sample Type	Serum	Serum	Serum	Urine	Urine	Urine
Concentration (ng/ml)	6.10	9.90	13.25	8.70	9.20	13.90
Average Recovery (%)	107.6	107.2	102.0	97.1	99.1	97.9
Range of Recovery (%)	from 105.3 to 110.6	100.2 112.8	97.1 105.1	92.4 100.2	97.4 102.2	95.0 103.6

10 LIMITATIONS OF USE

Reliable and reproducible results will be obtained when the assay procedure is performed with a complete understanding of the package insert instruction and with adherence to good laboratory practice.

Any improper handling of samples or modification of this test might influence the results.

10.1 Interfering Substances

Haemoglobin (up to 4 mg/ml), Bilirubin (up to 0.5 mg/ml) and Triglyceride (up to 30 mg/ml) have no influence on the assay results.

A biotin concentration of up to 1200 ng/ml in a sample has no influence on the assay results.

10.2 Drug Interferences

Until today no substances (drugs) are known to us, which have an influence to the measurement of C-Peptide in a sample.

10.3 High-Dose-Hook Effect

A High-Dose-Hook Effect is not known for competitive assays.

11 LEGAL ASPECTS

11.1 Reliability of Results

The test must be performed exactly as per the manufacturer's instructions for use. Moreover, the user must strictly adhere to the rules of GLP (Good Laboratory Practice) or other applicable national standards and/or laws. This is especially relevant for the use of control reagents. It is important to always include, within the test procedure, a sufficient number of controls for validating the accuracy and precision of the test.

The test results are valid only if all controls are within the specified ranges and if all other test parameters are also within the given assay specifications. In case of any doubt or concern please contact the manufacturer.

11.2 Therapeutic Consequences

Therapeutic consequences should never be based on laboratory results alone even if all test results are in agreement with the items as stated under point 11.1. Any laboratory result is only a part of the total clinical picture of a patient.

Only in cases where the laboratory results are in acceptable agreement with the overall clinical picture of the patient should therapeutic consequences be derived.

The test result itself should never be the sole determinant for deriving any therapeutic consequences.

11.3 Liability

Any modification of the test kit and/or exchange or mixture of any components of different lots from one test kit to another could negatively affect the intended results and validity of the overall test. Such modification and/or exchanges invalidate any claim for replacement.

Claims submitted due to customer misinterpretation of laboratory results subject to point 11.2 are also invalid. Regardless, in the event of any claim, the manufacturer's liability is not to exceed the value of the test kit. Any damage caused to the test kit during transportation is not subject to the liability of the manufacturer.

12 REFERENCES / LITERATURE

1. Ashby, J. and Frier, B.: Circulating C-Peptide: Measurement and Clinical Applications. *Annals of Clinical Biochemistry*. 18:125, 1981
2. Beischer, W.: Proinsulin and C-Peptide in Humans. *Hormones in Normal and Abnormal Human Tissues*. Volume 3K, Fotherby and Pal, S., ed. (Berlin: Walter DeGruyter). pp. 1-43, 1983
3. Beyer, J., Krause V., Cordes V.: C-Peptide: Its Biogenesis, Structure, Determination and Clinical Significance. *Giornale Italiano di Chimica Clinica* 4 Supp. 9:22, 1979
4. Bongers, A. and Garcia-Webb, P.: C-Peptide Measurement: Methods and Clinical Utility. *CRC Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*. 19:297, 1984.
5. Blix, P., Boddie-Wills, C., Landau, R., Rochman, H. Rubenstein, A.: Urinary C-Peptide: An Indicator of Beta-Cell Secretion under Different Metabolic Conditions. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 54:574, 1982.
6. Rendell, M.: C-Peptide Levels as a Criterion in Treatment of Maturity-Onset Diabetes. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 57 (6): 1198, 1983
7. Horwitz, D., et al.: Proinsulin, Insulin and C-Peptide concentrations in Human Portal and Peripheral Blood. *Journal of Clinical Investigation*. 55:1278, 1975
8. Horwitz, D., Kurzuya, H., Rubenstein, A.: Circulating Serum C-Peptide. *The New England Journal of Medicine*. 295:207, 1976
9. Rendell, M.: The Expanding Clinical Use of C-Peptide, Radioimmunoassay. *Acta Diabetologica Latina*. 20:105, 1983
10. Heding, L. and Rasmussen, S.: Human C-Peptide in Normal and Diabetic Subjects. *Diabetologica*. 11:201, 1975

11. Canivet, B., Harter, M., Viot, G., Balgrac, N., Krebs, B.: Residual β -Cell Function in Insulin-Dependent Diabetes: Evaluation by Circadian Determination of C-Peptide Immuno reactivity. Journal of Endocrinological Investigation. 3:107, 1980.
12. Starr, J., Horwitz, D., Rubenstein, A., Mako, M.: Insulin, Proinsulin and C-Peptide. Methods of Hormone Radioimmunoassay 2nd Ed., Academic Press Inc., 1979
13. Rubenstein, A., Kuruya, H., Horwitz, D.: Clinical Significance of Circulating C-Peptide in Diabetes Mellitus and Hypoglycemic Disorders. Archives of Internal Medicine. Vol. 137:625, May 1977.
14. Yalow, R., Berson, S.: Introduction and General Considerations. Principles of Competitive Protein Binding Assays. Ch. 2, Eds. Odell, W. and Daugheday, W., J.B. Lippincott Co., Philadelphia, 1971

Symbols:

	Storage temperature		Manufacturer		Contains sufficient for <n> tests
	Expiry date		Batch code		For in-vitro diagnostic use only!
	Consult instructions for use		Content		CE labelled
	Caution		Catalogue number		

1 ZWECKBESTIMMUNG

Der **C-Peptide ELISA** wird zur quantitativen Bestimmung C-Peptid in Serum, Plasma (EDTA-, Lithium-Heparin- oder Zitratplasma) und Urin eingesetzt.

Nur für In-vitro Diagnostik.

Insulin wird in den β -Zellen des Pankreas als 6000-MW-Komponente in Form eines aus 86 Aminosäuren bestehenden Polypeptids, genannt Proinsulin, gebildet (1, 2, 3). Das Proinsulin besteht aus der A- und B-Kette des Insulins und dem die beiden Ketten verbindenden C-Peptid, einem aus 31 Aminosäuren bestehenden Peptid mit einer molekularen Masse von ca. 3000 Dalton. Bei der enzymatischen Spaltung von Proinsulin wird Insulin sezerniert und in den Blutkreislauf abgegeben, zusammen mit dem als C-Peptid bezeichneten Rest-Fragment.

C-Peptid hat keine metabolische Funktion. Da C-Peptid und Insulin jedoch in äquimolaren Mengen sezerniert werden, erlaubt der Immunoassay von C-Peptid die Quantifizierung der Insulinsekretion (4, 5, 6). Dies ist der Grund für das klinische Interesse an Serum- und Urinbestimmungen von C-Peptid. Darüber hinaus hat die C-Peptid-Messung mehrere Vorteile gegenüber Immunoassays für Insulin. Die Halbwertszeit von C-Peptid im Blutkreislauf beträgt jedoch das Zwei- bis Fünffache der Halbwertszeit des Insulins (7).

Daher sind die C-Peptid-Spiegel ein stabilerer Indikator für die Insulinsekretion als die sich schneller ändernden Insulinspiegel. Ein ganz klarer praktischer Vorteil der C-Peptid-Messung, der sich aus seiner relativen Stoffwechselträgheit im Vergleich zu Insulin ergibt, ist, dass die C-Peptid-Spiegel im peripheren Venenblut etwa 5–6 mal höher sind als die Insulinspiegel (3). Der Vorteil des C-Peptid-Assays im Vergleich zu einem Insulin-Assay ist außerdem die Fähigkeit, endogenes von injiziertem Insulin zu unterscheiden.

Niedrige C-Peptid-Konzentrationen sind zu erwarten, wenn Insulin vermindert ist (bei Insulin-abhängiger Diabetes) oder bei Insulin-Suppression (als normale Antwort auf exogene Insulingaben). Erhöhte C-Peptid-Werte sind dagegen bei erhöhter β -Zellaktivität zu erwarten, die bei Insulinompatienten festgestellt wurde (3, 6, 9).

C-Peptid wurde auch als zusätzliches Mittel zur Bewertung der Glukosetoleranz und des Glibenclamid-Glukosetests gemessen (2, 3, 9, 10).

Der C-Peptidspiegel ist in vielerlei Hinsicht ein besseres Maß für die endogene Insulinsekretion als der periphere Insulinspiegel. C-Peptid kann entweder im Blut oder im Urin gemessen werden (9). Mit verbesserten empfindlichen C-Peptid-Immunoassays ist es jetzt möglich, C-Peptid-Werte bei extrem niedrigen Werten zu messen.

Neben der Ermittlung der Insulinsekretion umfasst die klinische Bedeutung der C-Peptid Bestimmung die Insulinom-Diagnose, Differenzierung von Hypoglycaemia factitia, Verlaufskontrolle nach Pankreasektomie und Einschätzung der Erfolgsaussichten bei Inselzell-Transplantationen (11, 12, 13). Kürzlich wurden diese Indikationen drastisch erweitert, um die Bewertung der Insulinabhängigkeit bei Diabetes mellitus im Reifestadium zu ermöglichen.

Indikation

- Beurteilung der β -Zellfunktion bei Diabetikern unter Insulin-Therapie
- Nachweis und Verlaufskontrolle der Remissionsphase bei Typ I-Diabetes
- Beitrag zur Differentialdiagnose von Typ I (Insulin-abhängiger) und Typ II (Insulin-unabhängiger) Diabetes
- Diagnose der Insulin-induzierten Hypoglycaemia factitia
- Diagnostik des Insulinoms (Insulin-Suppressionstest)
- Beurteilung der Situation des Feten bei mütterlicher Diabetes mellitus
- Bestimmung der Insulin-Sekretion bei Lebererkrankungen
- Verlaufskontrolle nach Pankreasektomie

2 TESTPRINZIP

Der C-Peptide ELISA ist ein Festphasen-Enzymimmunoassay, der auf dem **Prinzip der kompetitiven Bindung** basiert.

Die Vertiefungen der Mikrotiterplatte sind mit Anti-Maus-Antikörpern beschichtet, die wiederum monoklonale Antikörper binden, die gegen ein Epitop des C-Peptid-Moleküls gerichtet sind.

Während der Inkubation konkurriert das C-Peptid in der zugegebenen Probe mit dem Enzymkonjugat (C-Peptid, konjugiert an Meerrettichperoxidase) um die freien Bindungsstellen an den immobilisierten Antikörpern.

Nach einem Waschschriff, um alle ungebundenen Substanzen zu entfernen, wird die feste Phase mit der Substratlösung inkubiert. Die Farbreaktion wird durch die Zugabe der Stopplösung beendet und die optische Dichte (OD) des resultierenden gelben Produktes gemessen. Die Intensität der Farbe ist umgekehrt proportional zur Konzentration des Analyten in der Probe.

Durch Auftragen der OD-Werte gegen die Konzentrationen der Standards wird eine Standardkurve erstellt, und die Konzentrationen der unbekannten Proben werden anhand dieser Standardkurve bestimmt.

3 VORSICHTSMAßNAHMEN

1. Dieser Kit ist nur zum in vitro diagnostischen Gebrauch geeignet. Nur für den professionellen Gebrauch.
2. Alle Reagenzien dieses Testkits, die humanes Serum oder Plasma enthalten, wurden durch von der FDA zugelassene Verfahren auf HIV I/II, HBsAg und HCV getestet und als negativ bestätigt. Alle Reagenzien sollten jedoch im Gebrauch und bei der Entsorgung als potentielle biologische Gefahrenstoffe behandelt werden.
3. Vor Beginn des Tests ist die Gebrauchsanweisung vollständig und sorgfältig zu lesen. Verwenden Sie nur die gültige, im Testkit enthaltene, Gebrauchsanweisung. Stellen Sie sicher, dass alles verstanden wurde.
4. Die Mikrotiterplatte besteht aus einzeln herausnehmbaren und abbrechbaren Streifen. Ungenutzte Vertiefungen müssen bei 2 °C bis 8 °C im verschlossenen Folienbeutel gelagert und im mitgelieferten Rahmen verwendet werden.
5. Das Pipettieren der Proben und Reagenzien muss so schnell wie möglich und für jeden Schritt in der gleichen Reihenfolge erfolgen.
6. Behältnisse jeweils nur für ein einziges Reagenz verwenden. Dies gilt insbesondere für die Substrat-Behälter. Die Verwendung eines Behälters zum Pipettieren der Substratlösung, der zuvor für die Konjugatlösung verwendet wurde, kann zu einer Verfärbung der Lösung führen. Gießen Sie keine Reagenzien zurück in die originalen Fläschchen, da es zu einer Kontamination der Reagenzien kommen kann.
7. Mischen Sie den Inhalt der Mikrotiterplatten-Vertiefungen gründlich, um gute Testergebnisse zu gewährleisten. Mikrotiterplatten-Vertiefungen nicht wiederverwenden.
8. Kavitäten während des Assays nicht trocknen lassen; Reagenzien unmittelbar nach Ende des Waschschriffs hinzufügen.
9. Lassen Sie die Reagenzien vor Testbeginn Raumtemperatur (20 °C bis 26 °C) erreichen. Die Temperatur wirkt sich auf die Messungen der optischen Dichte des Assays aus. Die Werte für die Patientenproben werden jedoch nicht beeinflusst.
10. Niemals mit dem Mund pipettieren und den Kontakt von Reagenzien und Proben mit Haut und Schleimhäuten vermeiden.
11. In Bereichen, in denen Proben oder Kit-Reagenzien verwendet werden, darf nicht geraucht, gegessen, getrunken oder Kosmetika aufgetragen werden.
12. Beim Umgang mit Proben und Reagenzien Einweg-Latexhandschuhe tragen. Eine mikrobielle Kontamination von Reagenzien oder Proben kann zu falschen Ergebnissen führen.
13. Die Handhabung sollte in Übereinstimmung mit den Verfahren erfolgen, die in einer entsprechenden nationalen Richtlinie oder Vorschrift zur Biogefährdung definiert sind.
14. Reagenzien nicht über das auf den Kit-Etiketten angegebene Verfallsdatum hinaus verwenden.
15. Alle im Kit-Protokoll angegebenen Volumina müssen genau eingehalten werden. Optimale Ergebnisse können nur durch Verwendung kalibrierter Pipetten und Mikrotiterplatten-Lesegeräte erreicht werden.
16. Komponenten aus Kits mit unterschiedlichen Chargennummern dürfen nicht gemischt oder zusammen verwendet werden. Es wird empfohlen, keine Wells von verschiedenen Platten zusammen zu verwenden, auch nicht, wenn es sich um die gleiche Charge handelt. Die Kits können unter unterschiedlichen Bedingungen versandt oder gelagert worden sein, so dass die Bindungscharakteristik der Platten leicht unterschiedlich ausfällt.
17. Kontakt mit der Stopplösung (*Stop Solution*) sollte vermieden werden, da sie 0,5 M H₂SO₄ enthält. Schwefelsäure kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen.
18. Einige Reagenzien enthalten ProClin 300, BND und/oder MIT als Konservierungsmittel. Bei Kontakt mit Augen oder Haut sofort mit Wasser spülen.
19. TMB-Substrat hat eine reizende Wirkung auf Haut und Schleimhäute. Bei möglichem Kontakt Augen mit reichlich Wasser und Haut mit Seife und reichlich Wasser spülen. Kontaminierte Gegenstände vor der Wiederverwendung waschen. Falls eingeatmet, die Person an die frische Luft bringen.
20. Die Reagenzien des Kits sind als gesundheitsgefährdende Abfälle zu betrachten und gemäß den nationalen Vorschriften zu entsorgen.
21. Informationen zu den im Kit enthaltenen gefährlichen Substanzen entnehmen Sie bitte dem Sicherheitsdatenblatt. Sicherheitsdatenblätter für dieses Produkt sind auf Anfrage direkt vom Hersteller erhältlich.

4 BESTANDTEILE DES KITS

4.1 Kitinhalt

ME E-0131  96 **Microtiterwells**
96 Wells, 12 x 8 Wells (einzeln brechbar),
mit anti-Maus Antikörper beschichtet

Standards

	Atikelnr.	Standard	Konzentration	Volumen/Flasche
STANDARD A	ME E-0101	Standard A	0–16 ng/ml (für exakte Werte siehe Etiketten oder QC-Datenblatt)	0,75 ml
STANDARD B	ME E-0102	Standard B		0,75 ml
STANDARD C	ME E-0103	Standard C		0,75 ml
STANDARD D	ME E-0104	Standard D		0,75 ml
STANDARD E	ME E-0105	Standard E		0,75 ml
STANDARD F	ME E-0106	Standard F		0,75 ml

lyophilisiert

Die Standards sind kalibriert gegen das WHO Internationale Referenzmaterial IRR C-Peptide, NIBSC Code 84/510.

Siehe „Vorbereitung der Reagenzien“;

Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.

ME E-0160 **SAMPLE-DIL** **Sample Diluent** (Probenverdünnungsmedium)

1 Fläschchen, 3 ml, gebrauchsfertig;

Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.

ME E-0110 **AS** **Antiserum**

1 Fläschchen, 7 ml, gebrauchsfertig,

monoklonaler Maus anti-C-Peptid-Antikörper;

Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.

ME E-0140 **CONJUGATE** **Enzyme Conjugate** (Enzymkonjugat)

1 Fläschchen, 14 ml, gebrauchsfertig,

biotinyliertes C-Peptid;

Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.

ME E-0141 **ENZYME** **Enzyme Complex** (Enzymkomplex)

1 Fläschchen, 14 ml, gebrauchsfertig,

enthält Meerrettichperoxidase;

Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.

FR E-0055 **SUBSTRATE** **Substrate Solution** (Substratlösung)

1 Fläschchen, 14 ml, gebrauchsfertig,

Substratlösung TMB

FR E-0080 **STOP-SOLN** **Stop Solution** (Stopplösung)

1 Fläschchen, 14 ml, gebrauchsfertig,

enthält 0,5 M H₂SO₄;

Kontakt mit der Stop Solution vermeiden! Kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen.

Mögliche

Gefahren:



H290 Kann gegenüber Metallen korrosiv sein.

H314 Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden.

FR E-0030 **WASH- CONC 40x** **Wash Solution** (Waschlösung)

1 Fläschchen, 30 ml, 40-fach konzentriert,

siehe „Vorbereitung der Reagenzien“

Anmerkung: Zusätzliches *Sample Diluent* zur Probenverdünnung ist auf Anfrage erhältlich.

4.2 Erforderliche aber nicht enthaltene Geräte und Materialien

- Kalibriertes Mikrotiterplattenlesegerät (450 nm, mit Referenzwellenlänge bei 620 nm bis 630 nm)
- Kalibrierte variable Präzisions-Mikropipette
- Manuelle oder automatische Waschvorrichtung für Mikrotiterplatten
- Saugfähiges Papier
- Destilliertes Wasser
- Laborwecker
- Millimeterpapier oder Software zur Datenauswertung

4.3 Lagerung und Haltbarkeit des Kits

Die ungeöffneten Reagenzien behalten bei Lagerung um 2 °C – 8 °C ihre Reaktivität bis zum Verfallsdatum. Nach dem Verfallsdatum die Reagenzien nicht mehr verwenden.

Nach dem Öffnen sollten alle Reagenzien bei 2 °C – 8 °C gelagert werden.

Die Mikrotiterwells sollten bei 2 °C – 8 °C gelagert werden. Der einmal geöffnete Folienbeutel sollte stets sehr sorgfältig wieder verschlossen werden. Unter den beschriebenen Lagerbedingungen behalten geöffnete Kits 2 Monate ihre Reaktivität.

4.4 Vorbereitung der Reagenzien

Alle Reagenzien sowie die benötigte Anzahl von Wells sollen vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur (20 °C bis 26 °C) gebracht werden.

Standards

Rekonstituieren Sie den lyophilisierten Inhalt der Standardfläschchen mit 0,75 ml destilliertem Wasser und lassen Sie die Fläschchen mindestens 10 Minuten ruhen. Vor Gebrauch mehrmals vorsichtig schütteln.

Achtung: Bei 2 °C bis 8 °C sind die rekonstituierten Standards 3 Tage haltbar.

Für eine längere Aufbewahrung aliquotieren und bei -20 °C einfrieren.

Wash Solution

Die 40-fach konzentrierte Wash Solution (30 ml) mit 1170 ml destilliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 1200 ml verdünnen. Die verdünnte Waschlösung ist bei Raumtemperatur für 1 Woche stabil.

4.5 Entsorgung des Kits

Die Entsorgung des Kits muss gemäß den nationalen gesetzlichen Vorschriften erfolgen. Spezielle Informationen für dieses Produkt finden Sie im Sicherheitsdatenblatt, Abschnitt 13.

4.6 Beschädigte Testkits

Im Falle einer starken Beschädigung des Testkits oder der Komponenten muss der Hersteller in schriftlicher Form spätestens eine Woche nach Erhalt des Kits informiert werden. Stark beschädigte Einzelkomponenten sollten nicht für den Testlauf verwendet werden. Sie müssen gelagert werden, bis eine endgültige Lösung gefunden wurde. Danach sollten Sie gemäß den offiziellen Richtlinien entsorgt werden.

5 PROBENVORBEREITUNG

Serum oder Plasma (EDTA-, Lithium-, Heparin- oder Zitratplasma) und Urin kann in diesem Test als Probenmaterial eingesetzt werden.

Achtung: Proben, die Natriumazid enthalten, sollten nicht verwendet werden.

Generell sollte die Verwendung von hämolytischen, ikterischen oder lipämischen Proben vermieden werden. Weitere Informationen finden Sie im Kapitel „Interferenzen“.

5.1 Probenentnahme

Serum:

Blut durch Venenpunktion entnehmen (z.B. mit Sarstedt Monovette für Serum), gerinnen lassen und das Serum durch Zentrifugation bei Raumtemperatur abtrennen. Vor der Zentrifugation muss die Gerinnung vollständig abgeschlossen sein. Bei Patienten, die Antikoagulantien erhalten, kann die Gerinnungszeit länger dauern.

Plasma:

Die Blutentnahme erfolgt mit Röhrchen, die ein Antikoagulant enthalten (z.B.: Sarstedt Monovette – mit entsprechender Plasma-Präparierung). Das Plasma wird als Überstand nach einer Zentrifugation gewonnen.

Urin:

Urinproben werden über einen Zeitraum von 24 Stunden gesammelt und gekühlt bei 4 °C aufbewahrt.

Das Gesamtvolumen wird gemessen, der Urin gut durchmischt und eine Teilmenge für den Testansatz abgefüllt.

5.2 Probenaufbewahrung

Serum / Plasma

Proben sollten stets gut verschlossen sein und können vor Testbeginn bis zu 24 Stunden bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden.

Für eine längere Aufbewahrung (bis zu 12 Monate) sollten die Proben eingefroren bei -20 °C bis zum Testbeginn gelagert werden. Nur einmal einfrieren. Aufgetaute Proben sollten vor Testbeginn vorsichtig durchmischt werden, ohne Schaumbildung.

Urin:

Urinproben aliquotieren und zentrifugieren. Werden die Bestimmungen innerhalb von 36 Stunden durchgeführt, können die Proben bei 2 °C – 8 °C aufbewahrt werden. Für längere Aufbewahrung (bis zu 12 Monate) Proben bei -20 °C oder tiefer einfrieren.

5.3 Probenverdünnung

Serum / Plasma

Wenn in einem ersten Testdurchlauf bei einer Probe eine Konzentration höher als der höchste Standard gefunden wird, kann diese Probe mit *Sample Diluent* weiter verdünnt und nochmals bestimmt werden. Die Verdünnung muss jedoch bei der Berechnung der Konzentration beachtet werden.

Beispiel:

- a) Verdünnung 1:10: 10 µl Probe + 90 µl *Sample Diluent* (gründlich mischen)
- b) Verdünnung 1:100: 10 µl Verdünnung a) 1:10 + 90 µl *Sample Diluent* (gründlich mischen).

Urin:

Urinproben müssen vor dem Einsatz **1:20** mit *Sample Diluent* verdünnt werden.

Sollte das im Kit enthaltene *Sample Diluent* nicht ausreichen, kann zusätzliches *Sample Diluent* (40 ml) bestellt werden.

6 TESTDURCHFÜHRUNG

6.1 Allgemeine Hinweise

- Alle Reagenzien und Proben müssen vor Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht und gut durchmischt werden. Dabei sollte Schaumbildung vermieden werden.
- Wenn die Testdurchführung einmal begonnen wurde, muss sie ohne Unterbrechung zu Ende geführt werden.
- Für jeden Standard, jede Kontrolle oder Probe eine neue Plastikspitze verwenden, um Verschleppungen zu vermeiden.
- Die Optische Dichte ist abhängig von Inkubationszeit und Temperatur. Deshalb ist es notwendig, vor Beginn der Testdurchführung alle Reagenzien in einen arbeitsbereiten Zustand zu bringen, die Deckel der Fläschchen zu öffnen, alle benötigten Wells in den Halter zu setzen. Nur eine solche Vorbereitung garantiert gleiche Zeiten für jeden Pipettiervorgang ohne Pausen.
- Als generelle Regel gilt, dass die enzymatische Reaktion linear proportional zu Zeit und Temperatur ist.

6.2 Testdurchführung

Jeder Lauf muss eine Standardkurve beinhalten.

1.	Die benötigte Anzahl Wells in der Halterung befestigen.
2.	Je 100 µl <i>Standard</i> , Kontrolle und Probe <u>mit neuen Plastikspitzen</u> in die entsprechenden Wells geben.
3.	50 µl <i>Antiserum</i> in jedes Well geben.
4.	100 µl <i>Enzyme Conjugate</i> in jedes Well geben. Für 10 Sekunden gut schütteln. Es ist sehr wichtig, in diesem Schritt eine komplette Durchmischung zu erreichen.
5.	60 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Schüttler (500–600 rpm) inkubieren.
6.	Den Inhalt der Wells kräftig ausschütteln. Wells 3-mal mit verdünnter Waschlösung waschen. Verbleibende Flüssigkeit durch Ausklopfen der Wells auf saugfähigem Papier entfernen. Achtung: Die Sensitivität und Präzision dieses Assays wird erheblich beeinflusst von der korrekten Durchführung des Waschschrilles!
7.	100 µl <i>Enzyme Complex</i> in jedes Well geben.
8.	30 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Schüttler (500–600 rpm) inkubieren.
9.	Den Inhalt der Wells kräftig ausschütteln. Wells 3-mal mit verdünnter Waschlösung waschen. Verbleibende Flüssigkeit durch Ausklopfen der Wells auf saugfähigem Papier entfernen.
10.	100 µl <i>Substrate Solution</i> in jedes Well geben.
11.	20 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
12.	Die enzymatische Reaktion durch Zugabe von 100 µl <i>Stop Solution</i> in jedes Well abstoppen.
13.	Die Optische Dichte (OD) bei 450 nm (Messung) und 620 nm bis 630 nm (Abzug des Hintergrundes, empfohlen) mit einem Mikrotiterplattenleser innerhalb von 10 Minuten nach Zugabe der <i>Stop Solution</i> bestimmen.

6.3 Ergebnisermittlung

1. Die durchschnittlichen Werte der Optischen Dichte (OD) für jedes Set von Standards, Kontrollen und Patientenproben bestimmen.
2. Eine Standardkurve ermitteln durch Auftragen der mittleren Optischen Dichte jedes Standards gegen die Konzentration, wobei der OD-Wert auf der vertikalen (Y) Achse und die Konzentration auf der horizontalen (X) Achse eingetragen wird.
3. Unter Verwendung der mittleren OD wird für jede Probe die entsprechende Konzentration aus der Standardkurve ermittelt.
4. Automatische Methode: Die in der Gebrauchsanweisung angegebenen Werte wurden automatisch mit Hilfe der 4 Parameter-Gleichung bestimmt. (4 Parameter Rodbard oder 4 Parameter Marquardt sind die bevorzugten Methoden.) Andere Auswertungsfunktionen können leicht abweichende Werte ergeben.
5. Die Konzentration der Proben kann direkt von der Standardkurve abgelesen werden. Proben, die eine höhere Konzentration als die des höchsten Standards enthalten, müssen verdünnt werden. Dieser Verdünnungsfaktor muss bei der Berechnung der Konzentration beachtet werden.

6.3.1 Beispiel für eine Standardkurve

Nachfolgend wird ein typisches Beispiel für eine Standardkurve mit dem ELISA gezeigt. Diese Werte sollten **nicht** zur Berechnung von Patientendaten verwendet werden.

Standard	Optische Dichte (450 nm)
Standard A (0,0 ng/ml)	1,82
Standard B (0,2 ng/ml)	1,64
Standard C (0,7 ng/ml)	1,46
Standard D (2,0 ng/ml)	1,02
Standard E (6,0 ng/ml)	0,47
Standard F (16,0 ng/ml)	0,21

7 ERWARTETE WERTE

Es wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen normalen und abnormalen Werte ermittelt.

In einer Studie wurden die Proben von gesunden Erwachsenen untersucht. Dabei ergaben sich mit dem C-Peptide ELISA folgende Werte:

	n	Mittelwert $\pm$ 2 SD
Serum (nach 12 Stunden Fasten)	60	0,5–3,2 ng/ml

	n	Bereich (min. – max.)	Mittelwert	Median	5. Perzentile	95. Perzentile
Serum (Frauen < 50 Jahre)	42	0,1–5,8 ng/ml	1,0 ng/ml	0,7 ng/ml	0,2 ng/ml	3,9 ng/ml
Urin (Männer und Frauen)	10	1–200 μ g/Tag	108 μ g/Tag	116 μ g/Tag	5 μ g/Tag	199 μ g/Tag

8 QUALITÄTSKONTROLLE

Es wird empfohlen, die Kontrollproben gemäß den nationalen gesetzlichen Bestimmungen einzusetzen. Durch die Verwendung von Kontrollproben wird eine Tag-zu-Tag Überprüfung der Ergebnisse erzielt. Es sollten Kontrollen sowohl mit normalem als auch pathologischem Level eingesetzt werden.

Die Kontrollen mit den entsprechenden Ergebnissen des QC-Labors sind im QC-Zertifikat, das dem Kit beiliegt, aufgeführt. Die im QC-Blatt angegebenen Werte und Bereiche beziehen sich stets auf die aktuelle Kitcharge und sollten zum direkten Vergleich der Ergebnisse verwendet werden.

Es wird ebenfalls empfohlen, an nationalen oder internationalen Qualitätssicherungs-Programmen teilzunehmen, um die Genauigkeit der Ergebnisse zu sichern.

Es sollten geeignete statistische Methoden zur Analyse von Kontroll-Werten und Trends angewendet werden. Wenn die Ergebnisse des Assays nicht mit den angegebenen Akzeptanzbereichen des Kontrollmaterials übereinstimmen, sollten die Patientenergebnisse als ungültig eingestuft werden.

In diesem Fall überprüfen Sie bitte die folgenden Bereiche: Pipetten und Zeitnehmer, Photometer, Verfallsdatum der Reagenzien, Lagerungs- und Inkubationsbedingungen, Absaug- und Waschmethode.

Sollten Sie nach Überprüfung der vorgenannten Bereiche keinen Fehler erkannt haben, setzen Sie sich bitte mit Ihrem Lieferanten oder direkt mit dem Hersteller in Verbindung.

9 ASSAY-CHARAKTERISTIKA

9.1 Messbereich

Der Messbereich des Testes liegt zwischen 0,06–16 ng/ml.

9.2 Spezifität der Antikörper (Kreuzreaktivität)

Die Kreuzreaktivität von intaktem oder gespaltenem Proinsulin ist klinisch nicht signifikant.

9.3 Sensitivität

Die analytische Sensitivität (Mittlere OD_(Standard A) – 2 × SD, n = 20) beträgt 0,064 ng/ml.

Die Daten zu:

9.4 Reproduzierbarkeit (Präzision)

9.5 Wiederfindung

9.6 Linearität

entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Version der Gebrauchsanweisung.

10 GRENZEN DES TESTS

Zuverlässige und reproduzierbare Ergebnisse werden erzielt, wenn das Testverfahren mit vollständigem Verständnis der Anweisungen in der Gebrauchsanleitung und unter Befolgung der GLP (Good Laboratory Practice)-Richtlinien durchgeführt wird.

Jede unsachgemäße Behandlung von Proben oder Modifikation dieses Tests können die Ergebnisse beeinflussen.

10.1 Interferenzen

Hämoglobin (bis zu 4 mg/ml), Bilirubin (bis zu 0,5 mg/ml) und Triglyceride (bis zu 30 mg/ml) haben keinen Einfluss auf das Testergebnis.

Bis zu einer Konzentration von 1200 ng/ml hat Biotin in Proben keinen Einfluss auf die Testergebnisse.

10.2 Beeinflussung durch Medikamente

Uns sind bislang keine Stoffe (Medikamente) bekannt geworden, deren Einnahme die Messung des C-Peptid-Gehaltes der Probe beeinflussen würde.

10.3 High-Dose-Hook Effekt

Ein Hook-Effekt ist für kompetitive Assays nicht bekannt.

11 RECHTLICHE GRUNDLAGEN

11.1 Zuverlässigkeit der Ergebnisse

Der Test muss exakt gemäß der Testanleitung des Herstellers abgearbeitet werden. Darüber hinaus muss der Benutzer sich strikt an die Regeln der GLP (Good Laboratory Practice) oder andere eventuell anzuwendende Regeln oder nationale gesetzliche Vorgaben halten. Dies betrifft besonders den Gebrauch der Kontrollreagenzien. Es ist sehr wichtig, bei der Testdurchführung stets eine ausreichende Anzahl Kontrollen zur Überprüfung der Genauigkeit und Präzision mitlaufen zu lassen.

Die Testergebnisse sind nur gültig, wenn alle Kontrollen in den vorgegebenen Bereichen liegen, und wenn alle anderen Testparameter die vorgegebenen Spezifikationen für diesen Assay erfüllen. Wenn Sie bezüglich eines Ergebnisses Zweifel oder Bedenken haben, setzen Sie sich bitte mit dem Hersteller in Verbindung.

11.2 Therapeutische Konsequenzen

Therapeutische Konsequenzen sollten keinesfalls nur aufgrund von Laborergebnissen erfolgen, selbst dann nicht, wenn alle Testergebnisse mit den in 11.1 genannten Voraussetzungen übereinstimmen. Jedes Laborergebnis ist nur ein Teil des klinischen Gesamtbildes eines Patienten.

Nur in Fällen, in denen die Laborergebnisse in akzeptabler Übereinstimmung mit dem allgemeinen klinischen Bild des Patienten stehen, sollten therapeutische Konsequenzen eingeleitet werden.

Das Testergebnis allein sollte niemals als alleinige Grundlage für die Einleitung therapeutischer Konsequenzen dienen.

11.3 Haftung

Jegliche Veränderungen des Testkits und/oder Austausch oder Vermischung von Komponenten unterschiedlicher Chargen von einem Testkit zu einem anderen, können die gewünschten Ergebnisse und die Gültigkeit des gesamten Tests negativ beeinflussen. Solche Veränderungen und/oder Austausch haben den Ausschluss jeglicher Ersatzansprüche zur Folge.

Reklamationen, die aufgrund von Falschinterpretation von Laborergebnissen durch den Kunden gemäß Punkt 11.2 erfolgen, sind ebenfalls abzuweisen. Im Falle jeglicher Reklamation ist die Haftung des Herstellers maximal auf den Wert des Testkits beschränkt. Jegliche Schäden, die während des Transports am Kit entstanden sind, unterliegen nicht der Haftung des Herstellers.

12 REFERENZEN / LITERATUR

1. Ashby, J. and Frier, B.: Circulating C-Peptide: Measurement and Clinical Applications. Annals of Clinical Biochemistry. 18:125, 1981
2. Beischer, W.: Proinsulin and C-Peptide in Humans. Hormones in Normal and Abnormal Human Tissues. Volume 3K, Fotherby and Pal, S., ed. (Berlin: Walter DeGruyter). pp. 1-43, 1983
3. Beyer, J., Krause V., Cordes V.: C-Peptide: Its Biogenesis, Structure, Determination and Clinical Significance. Giornale Italiano di Chimica Clinica 4 Supp. 9:22, 1979
4. Bonger, A. and Garcia-Webb, P.: C-Peptide Measurement: Methods and Clinical Utility. CRC Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences. 19:297, 1984.
5. Blix, P. Boddie-Wills, C., Landau, R., Rochman, H. Rubenstein, A.: Urinary C-Peptide: An Indicator of Beta-Cell Secretion under Different Metabolic Conditions. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. 54:574, 1982.
6. Rendell, M.: C-Peptide Levels as a Criterion in Treatment of Maturity-Onset Diabetes. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. 57 (6): 1198, 1983
7. Horwitz, D., et al.: Proinsulin, Insulin and C-Peptide concentrations in Human Portal and Peripheral Blood. Journal of Clinical Investigation. 55:1278, 1975
8. Horwitz, D., Kurzuya, H., Rubenstein, A.: Circulating Serum C-Peptide. The New England Journal of Medicine. 295:207, 1976
9. Rendell, M.: The Expanding Clinical Use of C-Peptide, Radioimmunoassay. Acta Diabetologica Latina. 20:105, 1983
10. Heding, L. and Rasmussen, S.: Human C-Peptide in Normal and Diabetic Subjects. Diabetologica. 11:201, 1975
11. Canivet, B., Harter, M., Viot, G., Balgrac, N., Krebs, B.: Residual β -Cell Function in Insulin-Dependent Diabetes: Evaluation by Circadian Determination of C-Peptide Immuno reactivity. Journal of Endocrinological Investigation. 3:107, 1980.
12. Starr, J., Horwitz, D., Rubenstein, A., Mako, M.: Insulin, Proinsulin and C-Peptide. Methods of Hormone Radioimmunoassay 2nd Ed., Academic Press Inc., 1979
13. Rubenstein, A., Kuruya, H., Horwitz, D.: Clinical Significance of Circulating C-Peptide in Diabetes Mellitus and Hypoglycemic Disorders. Archives of Internal Medicine. Vol. 137:625, May 1977.
14. Yalow, R., Berson, S.: Introduction and General Considerations. Principles of Competitive Protein Binding Assays. Ch. 2, Eds. Odell, W. and Daugheday, W., J.B. Lippincott Co., Philadelphia, 1971

Symbole:

	Lagertemperatur		Hersteller		Enthält Testmaterial für <n> Teste
	Verwendbar bis		Chargennummer		In vitro Diagnostikum
	Vor Gebrauch Packungsbeilage lesen		Inhalt		CE gekennzeichnet
	Achtung		Katalog-Nummer		