



C-PEP II-RIA-CT

KIP0409 - KIP0408

Distributed By:



Immuno-Biological Laboratories, Inc. (IBL-America)
8201 Central Ave. NE, Suite P
Minneapolis, Minnesota 55432, USA
Phone: (888) 523-1246
Fax.: (763) 780-2988
Email: info@ibl-america.com
Web: www.ibl-america.com

LOT : 110218/1



en

Read entire protocol before use.

C-PEP II-RIA-CT

I. INTENDED USE

Radioimmunoassay for the in vitro quantitative measurement of human C-Peptide in serum.

II. GENERAL INFORMATION

A. Proprietary name : DIAsource C-PEP II-RIA-CT Kit

B. Catalog number : KIP0409 : 96 tests
KIP0408: 4 x 96 tests

C. Manufactured by : DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

For technical assistance or ordering information contact :
Tel : +32 (0)10 84.99.11 Fax : +32 (0)10 84.99.90

III. CLINICAL BACKGROUND

A. Biological Activity

Insulin is synthesized in the beta-cells of the islets of Langerhans as a precursor molecule, proinsulin. In the secretory granules of the beta-cells, proinsulin is cleaved into insulin and into a 31-amino-acid peptide, called the Connecting Peptide or C-Peptide. Insulin and C-Peptide are secreted in equimolar amounts. However, because of its longer half-life, the plasma concentration of C-peptide is higher than that of insulin.

The determination of plasma C-Peptide allows an assessment of the endogenous insulin production, even in the presence of exogenous insulin administration or in the presence of circulating anti-insulin antibodies.

Moreover, the determination of C-Peptide in urine provides a reliable index of the insulin production when blood sampling is difficult or when an integrated estimation of C-Peptide secretion over a period of several hours is requested.

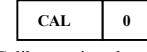
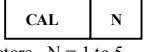
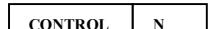
B. Clinical applications

- Assessment of residual beta-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 hypoglycaemia
- Contribution to the diagnosis of insulinoma (insulin suppression test)
- Prognostic index of foetal outcome in pregnant diabetic women
- Evaluation of insulin secretion in liver disease
- Monitoring of pancreatectomy

IV. PRINCIPLES OF THE METHOD

A fixed amount of ^{125}I labelled Tyr-C-Peptide competes with the C-Peptide to be measured present in the sample or in the calibrator for a fixed amount of antibody sites being immobilized to the wall of a polystyrene tube. Neither extraction nor chromatography is required. After 3 hours incubation at room temperature, an aspiration step terminates the competition reaction. The tubes are then washed with 3 ml of wash solution and aspirated again. A calibration curve is plotted and the C-Peptide concentrations of the samples are determined by dose interpolation from the calibration curve.

V. REAGENTS PROVIDED

Reagents	96 Test Kit	4 x 96 tests Kit	Colour Code	Reconstitution
Tubes coated with anti C-Peptide	2 x 48	8 x 48	orange	Ready for use
 TRACER: ^{125}I odine labelled Tyr-C-Peptide (HPLC grade) in phosphate buffer with bovine gelatin and azide (<0.1%)	1 vial lyophil. 175 kBq	4 vials lyophil. 4x175 kBq	red	Add 6 ml distilled water
 Zero Calibrator in human serum and thymol	1 vial Lyophil.	2 vials Lyophil.	yellow	Add 3 ml distilled water
 Calibrators - N = 1 to 5 (see exact values on vial labels) in human serum and thymol	5 vials Lyophil.	10 vials Lyophil.	yellow	Add 1 ml distilled water
 Wash solution (TRIS-HCl)	1 vial 10 ml	4 vials 10 ml	brown	Dilute 70 x with distilled water (use a magnetic stirrer).
 Controls - N = 1 or 2 in human serum with thymol	2 vials Lyophil.	4 vials Lyophil.	silver	Add 1 ml distilled water

- Note : 1.** Use the zero calibrator for sera dilutions.
2. 1 ng of the calibrator preparation is equivalent to 1 ng NIBSC IRR 84/510

VI. SUPPLIES NOT PROVIDED

The following material is required but not provided in the kit:

1. Distilled water
2. Pipettes for delivery of 50 μl , 100 μl and 1 ml (the use of accurate pipettes with disposable plastic tips is recommended)
3. Disposable polystyrene tubes (12 x 75 mm)
4. Vortex mixer
5. Magnetic stirrer
6. 5 ml automatic syringe (Cornwall type) for washing
7. Aspiration system (optional)
8. Any gamma counter capable of measuring ^{125}I may be used (minimal yield 70%).

VII. REAGENT PREPARATION

- Calibrators:** Reconstitute the zero calibrator with 3.0 ml distilled water and the other calibrators with 1.0 ml distilled water.
- Controls:** Reconstitute the controls with 1.0 ml distilled water.
- Tracer:** Reconstitute the tracer with 6.0 ml distilled water.
- Working Wash solution:** Prepare an adequate volume of Working Wash solution by adding 69 volumes of distilled water to 1 volume of Wash Solution (70x). Use a magnetic stirrer to homogenize. Discard unused Working Wash solution at the end of the day

VIII. STORAGE AND EXPIRATION DATING OF REAGENTS

- Before opening or reconstitution, all kits components are stable until the expiry date, indicated on the label, if kept at 2 to 8°C.
- **After reconstitution, tracer must be used immediately or stored at - 20°C, until the expiration date.**
- After reconstitution, **calibrators and controls** are very unstable, use them immediately after reconstitution. For longer storage periods, aliquots should be made and kept at -20°C for maximally 3 months. Avoid subsequent freeze-thaw cycles.
- Freshly prepared Working Wash solution should be used on the same day.
- Alterations in physical appearance of kit reagents may indicate instability or deterioration.

IX. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

- Serum samples must be kept at 2-8°C.
- If the test is not run within 8 hrs, storage in aliquots at -20°C is recommended.
- Avoid subsequent freeze-thaw cycles.

X. PROCEDURE

A. Handling notes

Do not use the kit or components beyond expiry date.
 Do not mix materials from different kit lots.
 Bring all the reagents to room temperature prior to use.
 Thoroughly mix all reagents and samples by gentle agitation or swirling.
 Use a clean disposable pipette tip for addition of each different reagent and sample in order to avoid cross-contamination. High precision pipettes or automated pipetting equipment will improve the precision.
 Respect the incubation times.
 Prepare a calibration curve for each run, do not use data from previous runs.

B. Procedure

1. Label coated tubes in duplicate for each calibrator, control and sample. For the determination of total counts, label 2 normal tubes
2. Briefly vortex calibrators, controls and samples and dispense 100 μl of each into the respective tubes.
This operation must be achieved within 15 minutes.
3. Dispense 50 μl of ^{125}I odine labelled Tyr-C-Peptide into each tube, including the uncoated tubes for total counts.
4. Shake the tube rack gently by hand to liberate any trapped air bubbles.
5. Incubate for 3 hours at room temperature.
6. Aspirate (or decant) the content of each tube (except total counts). Be sure that the plastic tip of the aspirator reaches the bottom of the coated tube in order to remove all the liquid.
7. Wash tubes with 3 ml Working Wash solution (except total counts) and aspirate (or decant). Avoid foaming during the addition of the Working Wash solution.
8. Let the tubes stand upright for two minutes and aspirate the remaining drop of liquid.
9. Count tubes in a gamma counter for 60 seconds.

XI. CALCULATION OF RESULTS

1. Calculate the mean of duplicate determinations.
2. Calculate the bound radioactivity as a percentage of the binding determined at the zero calibrator point (0) according to the following formula :

$$\text{B/B0}(\%) = \frac{\text{Counts (Calibrator or sample)}}{\text{Counts (Zero Calibrator)}} \times 100$$

3. Using a 3 cycle semi-logarithmic or logit-log graph paper, plot the (B/B0(%)) values for each calibrator point as a function of the C-Peptide concentration of each calibrator point. Reject obvious outliers.
4. Computer assisted methods can also be used to construct the calibration curve. If automatic result processing is used, a 4-parameter logistic function curve fitting is recommended.
5. By interpolation of the sample (B/B0 (%)) values, determine the C-Peptide concentrations of the samples from the calibration curve.
6. For each assay, the percentage of total tracer bound in the absence of unlabelled C-Peptide (B₀/T) must be checked.

XII. TYPICAL DATA

The following data are for illustration only and should never be used instead of the real time calibration curve.

C-Peptide	cpm	B/Bo (%)
Total count	75295	
Calibrator		
0.0 pmol/ml	17690	100.0
0.09 pmol/ml	14319	80.9
0.29 pmol/ml	11618	65.7
0.95 pmol/ml	6534	36.9
2.98 pmol/ml	3361	19.0
9.94 pmol/ml	1379	7.8

XIII. PERFORMANCE AND LIMITATIONS

A. Detection limit

Twenty zero calibrators were assayed along with a set of other calibrators. The detection limit, defined as the apparent concentration two standard deviations below the average counts at zero binding, was 0.04 pmol/ml.

B. Specificity

The percentage of cross-reaction estimated by comparison of the concentration yielding a 50% inhibition are respectively:

Compound	Cross-Reactivity (%)
Biosynthetic human Proinsulin	5.6%
Human Glucagon	-
Human Insulin	-

C. Precision

INTRA-ASSAY PRECISION

INTER-ASSAY PRECISION

Serum	N	$\langle X \rangle \pm SD$ (pmol/ml)	CV (%)	Serum	N	$\langle X \rangle \pm SD$ (pmol/ml)	CV (%)
A	24	0.28 ± 0.03	10.7	A	21	0.28 ± 0.03	10.7
B	26	1.21 ± 0.04	3.3	B	21	1.12 ± 0.11	9.8
C	24	0.18 ± 0.01	5.6	C	22	0.17 ± 0.02	11.8
D	24	0.68 ± 0.04	5.9	D	22	0.65 ± 0.05	7.7
E	24	1.60 ± 0.11	6.9	E	22	1.68 ± 0.12	7.1

SD: Standard Deviation; CV: Coefficient of variation

D. Accuracy

DILUTION TEST

Sample	Dilution	Theoretical Concent. (pmol/ml)	Measured Concent. (pmol/ml)
Serum	1/1	-	6.99
	1/2	3.50	3.04
	1/4	1.75	1.56
	1/8	0.87	0.80
	1/16	0.44	0.46
	1/32	0.22	0.28
	1/64	0.11	0.07

Samples were diluted with zero calibrator.

RECOVERY TEST

Sample	added C-Peptide (pmol/ml)	Recovered C-Peptide (pmol/ml)	Recovered (%)
Serum	0.14	0.14	100
	0.17	0.19	112
	0.22	0.22	100
	0.39	0.44	113
	1.14	1.12	98
	3.14	3.02	96

Conversion factor :

From ng/ml to pmol/ml : : 3

E. Time delay between last calibrator and sample dispensing

As shown hereafter, the dispensing of samples must be done within a maximum delay of 15 minutes after the calibrator dispensing.

TIME DELAY

Serum pmol/ml	0'	5'	10'	15'	20'	30'
C1	0.66	0.53	0.55	0.61	0.52	0.41
C2	2.27	2.14	2.58	1.90	1.79	2.07

XIV. INTERNAL QUALITY CONTROL

- If the results obtained for Control 1 and/or Control 2 are not within the range specified on the vial label, the results cannot be used unless a satisfactory explanation for the discrepancy has been given.
- If desirable, each laboratory can make its own pools of control samples, which should be kept frozen in aliquots.
- Acceptance criteria for the difference between the duplicate results of the samples should rely on Good Laboratory Practises.

XV. REFERENCE INTERVALS

These values are given only for guidance; each laboratory should establish its own normal range of values.

In a group of 79 normal subjects, the mean human C-Peptide concentration found was 1.02 pmol/ml (range, based on 2.5% to 97.5% percentiles: 0.59 - 1.56 pmol/ml).

XVI. PRECAUTIONS AND WARNINGS

Safety

For *in vitro* diagnostic use only.

This kit contains ^{125}I (half-life: 60 days), emitting ionizing X (28 keV) and γ (35.5 keV) radiations.

This radioactive product can be transferred to and used only by authorized persons; purchase, storage, use and exchange of radioactive products are subject to the legislation of the end user's country. In no case the product must be administered to humans or animals.

All radioactive handling should be executed in a designated area, away from regular passage. A logbook for receipt and storage of radioactive materials must be kept in the lab. Laboratory equipment and glassware, which could be contaminated with radioactive substances, should be segregated to prevent cross contamination of different radioisotopes.

Any radioactive spills must be cleaned immediately in accordance with the radiation safety procedures. The radioactive waste must be disposed of following the local regulations and guidelines of the authorities holding jurisdiction over the laboratory. Adherence to the basic rules of radiation safety provides adequate protection.

The human blood components included in this kit have been tested by European approved and/or FDA approved methods and found negative for HbsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 and 2. No known method can offer complete assurance that human blood derivatives will not transmit hepatitis, AIDS or other infections. Therefore, handling of reagents, serum or plasma specimens should be in accordance with local safety procedures.

All animal products and derivatives have been collected from healthy animals. Bovine components originate from countries where BSE has not been reported. Nevertheless, components containing animal substances should be treated as potentially infectious.

Avoid any skin contact with reagents (sodium azide as preservative). Azide in this kit may react with lead and copper in the plumbing and in this way form highly explosive metal azides. During the washing step, flush the drain with a large amount of water to prevent azide build-up.

Do not smoke, drink, eat or apply cosmetics in the working area. Do not pipette by mouth. Use protective clothing and disposable gloves.

XVII. BIBLIOGRAPHY

1. BEISCHER, W. et al. (1976). **Human C-Peptide. Part I Radioimmunoassay.** Klin. Wschr. 54, 709.
2. BEISCHER, W. et al. (1976). **Human C-Peptide. Part II: Clinical studies.** Klin. Wschr. 54, 717.

3. BLIX, P.M. et al. (1982).
Urinary C-Peptide: an indicator of β-cell secretion under different metabolic conditions.
J. Clin. Endocrinol. Metab., 54/3, 574.
4. BONSER, A et al. (1984).
C-Peptide measurement: method and clinical utility.
CRC Critical Review in Clinical Laboratory Sciences, 19 297.
5. HORWITZ, D.L. et al. (1975).
Proinsulin, insulin and C-Peptide concentrations in human portal and peripheral blood.
J. Clin. Invest., 55, 1278.
6. RENDELL, M. (1983).
C-Peptide levels as a criterion in treatment of maturity onset diabetes.
J. Clin. Endocrinol. Metab., 57/6, 1198.
7. RUBENSTEIN, A.H. et al. (1977).
Clinical significance of circulating proinsulin and C-Peptide.
Rec. Prog. Horm. Res., 33, 435.
8. TROPEANO, G. et al. (1994).
Insulin, C-Peptide, androgens, and beta endorphin response to oral glucose in patients with polycystic ovary syndrome.
J. Clin. Endocrinol. Metab., 78/2, 305-9.
9. CONGEL, I. et al. (1993).
Effect of hyperlipidemia on plasma C-Peptide concentration during euglycemic hyperinsulinemic clamp.
Diabetes Res., 22/1, 41-8.

10. KREW, M.A. et al. (1994).
Relation of amniotic fluid C-Peptide levels to neonatal body composition.
Obstet. Gynecol., 84/1, 96-100.

XVIII. SUMMARY OF THE PROTOCOL

	TOTAL COUNTS µl	CALIBRATORS µl	SAMPLE (S) CONTROLS µl
Calibrators (0 to 5) Samples, Controls Tracer	- - 50	100 - 50	- 100 50
Incubation	3 hours at room temperature		
Separation Working Wash solution Separation	-	Aspirate (or decant) 3.0 ml Aspirate (or decant)	
Counting	Count tubes for 60 seconds		

DIAsource Catalogue Nr : KIP0409 – KIP0408	P.I. Number : 1700444/en	Revision nr : 110218/1
---	-----------------------------	---------------------------

Revision date : 2011-02-18

Lire entièrement le protocole avant utilisation.

C-PEP II-RIA-CT

I. BUT DU DOSAGE

Trousse de dosage radio-immunologique pour la mesure quantitative *in vitro* du C Peptide dans le sérum humain.

II. INFORMATIONS GENERALES

- A. Nom du produit : DIAsource C-PEP II-RIA-CT kit
- B. Numéro de catalogue: KIP0409 : 96 tests
KIP0408 : 4 x 96 tests
- C. Fabriqué par : DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgique.

Pour une assistance technique ou une information sur une commande :
Tel : +32 (0)10 84.99.11 Fax : +32 (0)10 84.99.90

III. CONTEXTE CLINIQUE

A. Activités biologiques

L'insuline est synthétisée dans les cellules bêta des îlots de Langerhans comme une molécule de précurseur, la proinsuline. Dans les granules sécrétoires des cellules bêta, la proinsuline est scindée en insuline et en un peptide de 31 acides aminés, le Peptide de Connexion ou le C Peptide. L'insuline et le C Peptide sont sécrétés en quantités équimolaires. Pourtant, la concentration en plasma du C Peptide est plus élevée que celle de l'insuline à cause de sa demi-vie plus longue.

La détermination du C Peptide en plasma permet une évaluation de la production d'insuline endogène, même en cas d'administration d'insuline exogène ou en cas d'anticorps anti-insuline circulants.

En plus, la détermination du C Peptide dans l'urine offre un index fiable de la production d'insuline si des échantillons de sang sont difficiles à obtenir ou si une évaluation intégrée de la sécrétion de C Peptide pour une période de plusieurs heures est nécessaire.

B. Applications cliniques

- Evaluation de la fonction résiduelle des cellules bêta chez des diabétiques traités à l'insuline
- Détection et suivi de la phase de rémission des diabètes de type I
- Complément dans le diagnostic différentiel entre diabète de type I (insulino-dépendant) et de type II (non-insulino-dépendant)
- Diagnostic de l'hypoglycémie induite par l'insuline
- Contribution au diagnostic de l'insulinome (test de suppression de l'insuline)
- Index pronostique de l'issue foetale chez la femme diabétique enceinte
- Evaluation de la sécrétion de l'insuline en cas de maladie du foie
- Suivi de la pancréatectomie

IV. PRINCIPE DU DOSAGE

Une quantité fixe de C peptide marquée à ^{125}I est en compétition avec le C peptide à mesurer et présent dans l'échantillon ou dans le calibrateur pour une quantité fixe d'anticorps immobilisés sur les parois du tube en polystyrène. Ni extraction, ni phase de pré-traitement ne sont exigés pour la mesure de C peptide dans les échantillons. Après 3 heures d'incubation à température ambiante, le liquide est aspiré pour terminer la réaction de compétition. Les tubes sont lavés avec 3 ml de Solution de Lavage et aspirés à nouveau. Une courbe de calibration est réalisée et la concentration en C peptide des échantillons est déterminée par interpolation de la dose sur la courbe de calibration.

V. REACTIFS FOURNIS

Réactifs	96 Tests	4 x 96 Tests	Code couleur	Reconstitution
	2 x 48	8 x 48	Orange	Prêt à l'emploi
	1 flacon Lyophilisé 175 kBq	2 flacons Lyophilisés 4 x 175 kBq	Rouge	Ajouter 6 ml d'eau distillée
	1 flacon lyophilisé	2 flacons lyophilisés	Jaune	Ajouter 3 ml d'eau distillée
	5 flacons lyophilisés	10 flacons lyophilisés	Jaune	Ajouter 1 ml d'eau distillée
	1 flacon 10 ml	4 flacons 10 ml	Brun	Diluer 70x avec de l'eau distillée (utiliser un agitateur magnétique).
	2 flacons lyophilisés	4 flacons lyophilisés	Gris	Ajouter 1 ml d'eau distillée

Note: 1. Utiliser le calibrateur zéro pour la dilution des échantillons.
2. 1 ng de la préparation du calibrateur est équivalent à 1 ng de NIBSC IRR 84/510.

VI. MATERIEL NON FOURNI

Le matériel mentionné ci-dessous est requis mais non fourni avec la trousse:

- Eau distillée
- Pipettes pour distribuer: 50 μl , 100 μl et 1 ml (l'utilisation de pipettes précises et de pointes jetables en plastique est recommandée)
- Tubes en polystyrène jetables (12 x 75 mm)
- Agitateur vortex
- Agitateur magnétique
- Seringue automatique de 5 ml (type Cornwall) pour les lavages
- Système d'aspiration
- Tout compteur gamma capable de mesurer ^{125}I peut être utilisé (rendement minimum 70%).

VII. PREPARATION DES REACTIFS

- Calibrateurs:** Reconstituer le calibrateur zéro avec 3 ml d'eau distillée et les autres calibrateurs avec 1 ml d'eau distillée.
- Contrôles :** Reconstituer les contrôles avec 1 ml d'eau distillée.
- Traceur :** Reconstituer le traceur avec 6 ml d'eau distillée.
- Solution de Lavage :** Préparer un volume adéquat de Solution de Lavage en ajoutant 69 volumes d'eau distillée à 1 volume de Solution de Lavage (70x). Utiliser un agitateur magnétique pour homogénéiser. Eliminer la Solution de Lavage non utilisée à la fin de la journée.

VIII. STOCKAGE ET DATE D'EXPIRATION DES REACTIFS

- Avant l'ouverture ou la reconstitution, tous les composants de la trousse sont stables jusqu'à la date d'expiration, indiquée sur l'étiquette, si la trousse est conservée entre 2 et 8°C.
- Après reconstitution, le traceur doit être utilisé immédiatement ou être conservé à -20°C jusqu'à la date de validité.
- Après reconstitution, les calibrateurs et les contrôles sont très instables, les utiliser immédiatement après la reconstitution. Congelez-les immédiatement dans des aliquots et garder-les à -20°C pendant 3 mois. Eviter des cycles de congélation et décongélation successifs.
- La Solution de Lavage préparée doit être utilisée le jour même.
- Des altérations dans l'apparence physique des réactifs de la trousse peuvent indiquer une instabilité ou une détérioration.

IX. PREPARATION ET STABILITE DE L'ECHANTILLON

- Les échantillons de sérum doivent être gardés entre 2 et 8°C.
- Si le test n'est pas réalisé dans les 8 heures, un stockage à -20°C est recommandé.
- Eviter des cycles de congélation et décongélation successifs.

X. MODE OPERATOIRE

A. Notes de manipulation

Ne pas utiliser la trousse ou ses composants après avoir dépassé la date d'expiration. Ne pas mélanger du matériel provenant de trousse de lots différents. Mettre tous les réactifs à température ambiante avant utilisation. Mélanger à fond tous les réactifs et les échantillons sous agitation douce. Pour éviter toute contamination croisée, utiliser une nouvelle pointe de pipette pour l'addition de chaque réactif et échantillon. Des pipettes de haute précision ou un équipement de pipetage automatique permettent d'augmenter la précision. Respecter les temps d'incubation. Préparer une courbe de calibration pour chaque nouvelle série d'expériences, ne pas utiliser les données d'expériences précédentes.

B. Mode opératoire

- Identifier les tubes recouverts fournis dans la trousse en double pour chaque calibrateur, échantillon, contrôle. Pour la détermination de l'activité totale, identifier 2 tubes non recouverts.
- Agiter au vortex brièvement les calibrateurs, les échantillons et les contrôles. Puis distribuer 100 μl de chacun d'eux dans leurs tubes respectifs.
- Cette opération doit être terminée dans 15 minutes.**
- Distribuer 50 μl de C peptide marquée à ^{125}I dans chaque tube, y compris les tubes sans anticorps pour la détermination de l'activité totale.
- Agiter gentiment le portoir de tube pour libérer toute bulle d'air emprisonnée.
- Incuber pendant 3 heures à température ambiante.
- Aspirer le contenu de chaque tube (à l'exception des tubes utilisés pour la détermination de l'activité totale). Assurez-vous que la pointe utilisée pour aspirer le liquide des tubes atteint le fond de chacun d'eux pour éliminer toute trace de liquide.
- Laver les tubes avec 3 ml de Solution de Lavage (à l'exception des tubes utilisés pour la détermination de l'activité totale) et aspirer. Eviter la formation de mousse pendant l'addition de la Solution de Lavage.
- Laisser les tubes droits pendant 2 minutes et aspirer le reste de liquide.
- Placer les tubes dans un compteur gamma pendant 60 secondes pour quantifier la radioactivité.

XI. CALCUL DES RESULTATS

- Calculer la moyenne de chaque détermination réalisée en double.
- Calculer la capacité de liaison de l'essai comme un pourcentage de liaison déterminé au point de calibration (0) en suivant la formule ci-dessous :

$$\frac{\text{moyenne des cpm (CAL ou échantillon)}}{\text{moyenne des cpm (CAL 0)}} \times 100$$
- Utiliser un "3 cycle semi-logarithmic" ou un papier graphique "logit-log", porter en ordonnée les valeurs exprimées en pourcentage de liaison ($B/B_0(\%)$) de chaque point de calibration et en abscisse leur concentration respective en C peptide, écarter les valeurs aberrantes.
- Des méthodes informatiques peuvent aussi être utilisées pour construire la courbe de calibration. Si un système d'analyse de traitement informatique des données est utilisé, il est recommandé d'utiliser la fonction « 4 paramètres » du lissage de courbes.
- L'interpolation des valeurs de chaque échantillon ($B/B_0(\%)$) détermine les concentrations en C peptide à partir de la courbe de calibration.
- Pour chaque essai, le pourcentage total de traceur lié en absence de C peptide non marquée (B_0/T) doit être vérifié.

XII. DONNEES TYPES

Les données représentées ci-dessous sont données pour information et ne peuvent jamais être utilisées à la place d'une courbe de calibration.

C-Peptide	cpm	B/Bo (%)
Activité totale	75295	
Calibrateur		
0,0 pmol/ml	17690	100,0
0,09 pmol/ml	14319	80,9
0,29 pmol/ml	11618	65,7
0,95 pmol/ml	6534	36,9
2,98 pmol/ml	3361	19,0
9,94 pmol/ml	1379	7,8

XIII. PERFORMANCE ET LIMITES DU DOSAGE

A. Limite de détection

Vingt calibrateurs zéro ont été testés en parallèle avec un assortiment d'autres calibrateurs.

La limite de détection, définie comme la concentration apparente située 2 déviations standards en-dessous de la moyenne déterminée à la fixation zéro, était de 0,04 pmol/ml.

B. Spécificité

Le pourcentage de réaction croisée estimé par la comparaison de la concentration (indiquant une inhibition de 50 %) est respectivement :

Composé	Réactivité Croisée (%)
Proinsuline biosynthétique humaine	5,6
Glucagon humain	-
Insuline humaine	-

C. Précision

INTRA-ESSAI

INTER-ESSAI

Sérum	N	$\langle X \rangle \pm SD$ (pmol/ml)	CV (%)	Sérum	N	$\langle X \rangle \pm SD$ (pmol/ml)	CV (%)
A	24	0.28 ± 0.03	10.7	A	21	0.28 ± 0.03	10.7
B	26	1.21 ± 0.04	3.3	B	21	1.12 ± 0.11	9.8
C	24	0.18 ± 0.01	5.6	C	22	0.17 ± 0.02	11.8
D	24	0.68 ± 0.04	5.9	D	22	0.65 ± 0.05	7.7
E	24	1.60 ± 0.11	6.9	E	22	1.68 ± 0.12	7.1

SD : Déviation Standard; CV: Coéfficient de variation

D. Exactitude

TEST DE DILUTION

Echantillon	Dilution	Concent. Théorique (pmol/ml)	Concent. Mesurée (pmol/ml)
sérum	1/1	-	6,99
	1/2	3,50	3,04
	1/4	1,75	1,56
	1/8	0,87	0,80
	1/16	0,44	0,46
	1/32	0,22	0,28
	1/64	0,11	0,07

L'échantillon a été dilué avec le calibrateur zéro.

TEST DE RECUPERATION

Echantillon	C peptide ajouté (pmol/ml)	C peptide récupéré (pmol/ml)	Recupération (%)
sérum	0,14	0,14	100
	0,17	0,19	112
	0,22	0,22	100
	0,39	0,44	113
	1,14	1,12	98
	3,14	3,02	96

Facteur de conversion:

De ng/ml à pmol/ml : : 3

E. Délai entre la distribution du dernier calibrateur et celle de l'échantillon

Comme mentionné ci-après, la distribution des échantillons doit être effectuée dans un délai maximum de 15 minutes après la distribution du calibrateur.

DELAI

Sérum pmol/ml	0'	5'	10'	15'	20'	30'
C1	0,66	0,53	0,55	0,61	0,52	0,41
C2	2,27	2,14	2,58	1,90	1,79	2,07

XIV. CONTRÔLE QUALITÉ INTERNE

- Si les résultats obtenus pour le(s) contrôle(s) 1 et/ou 2 ne sont pas dans l'intervalle spécifié sur l'étiquette du flacon, les résultats ne peuvent pas être utilisés à moins que l'on ait donné une explication satisfaisante de la non-conformité.
- Chaque laboratoire est libre de faire ses propres stocks d'échantillons contrôles, lesquels doivent être congelés aliquotés.
- Les critères d'acceptation pour les écarts des valeurs en duplicate des échantillons doivent être basés sur les pratiques de laboratoire courantes.

XV. VALEURS ATTENDUES

Les valeurs sont données à titre d'information; chaque laboratoire doit établir ses propres écarts de valeurs.

Dans un groupe de 79 sujets normaux, la moyenne de concentration en C Peptide est de 1,02 pmol/ml (portée, basé sur les percentiles de 2,5% à 97,5% : 0,59 – 1,56 pmol/ml).

XVI. PRECAUTIONS ET AVERTISSEMENTS

Sécurité

Pour utilisation en diagnostic *in vitro* uniquement.

Cette trousse contient de ^{125}I (demi-vie: 60 jours), une matière radioactive émettant des rayonnements ionisants X (28 keV) et γ (35.5 keV).

Ce produit radioactif peut uniquement être reçu, acheté, possédé ou utilisé par des personnes autorisées; l'achat, le stockage, l'utilisation et l'échange de produits radioactifs sont soumis à la législation du pays de l'utilisateur final. Ce produit ne peut en aucun cas être administré à l'homme ou aux animaux.

Toutes les manipulations radioactives doivent être exécutées dans un secteur désigné, éloigné de tout passage. Un journal de réception et de stockage des matières radioactives doit être tenu à jour dans le laboratoire. L'équipement de laboratoire et la verrerie, qui pourrait être contaminée avec des substances radioactives, doivent être isolés afin d'éviter la contamination croisée de plusieurs isotopes.

Toute contamination ou perte de substance radioactive doit être réglée conformément aux procédures de radio sécurité. Les déchets radioactifs doivent être placés de manière à respecter les réglementations en vigueur. L'adhésion aux règles de base de sécurité concernant les radiations procure une protection adéquate.

Les composants de sang humain inclus dans ce kit ont été évalués par des méthodes approuvées par l'Europe et/ou la FDA et trouvés négatifs pour HBsAg, l'anti-HCV, l'anti-HIV-1 et 2. Aucune méthode connue ne peut offrir l'assurance complète que des dérivés de sang humain ne transmettront pas d'hépatite, le sida ou toute autre infection. Donc, le traitement des réactifs, du sérum ou des échantillons de plasma devront être conformes aux procédures locales de sécurité. Tous les produits animaux et leurs dérivés ont été collectés d'animaux sains. Les composants bovins proviennent de pays où l'ESB n'a pas été détectée. Néanmoins, les composants contenant des substances animales devront être traités comme potentiellement infectieux.

L'azide de sodium est nocif s'il est inhalé, avalé ou en contact avec la peau (l'azide de sodium est utilisé comme agent conservateur). L'azide dans cette trousse pouvant réagir avec le plomb et le cuivre dans les canalisations et donner des composés explosifs, il est nécessaire de nettoyer abondamment à l'eau le matériel utilisé.

Ne pas fumer, ni boire, ni manger ni appliquer de produits cosmétiques dans les laboratoires où des produits radioactifs sont utilisés. Ne pas pipeter avec la bouche. Utiliser des vêtements protecteurs et des gants à usage unique.

XVII. BIBLIOGRAPHIE

1. BEISCHER, W. et al. (1976).
Human C-Peptide. Part I Radioimmunoassay.
Klin. Wschr. 54, 709.
2. BEISCHER, W. et al. (1976).
Human C-Peptide. Part II: Clinical studies.
Klin. Wschr. 54, 717.
3. BLIX, P.M. et al. (1982).
Urinary C-Peptide: an indicator of β-cell secretion under different metabolic conditions.
J. Clin. Endocrinol. Metab., 54/3, 574.
4. BONSER, A et al. (1984).
C-Peptide measurement: method and clinical utility.
CRC Critical Reviewvs in Clinical Laboratory Sciences, 19 297.
5. HORWITZ, D.L. et al. (1975).
Proinsulin, insulin and C-Peptide concentrations in human portal and peripheral blood.
J. Clin. Invest., 55, 1278.
6. RENDELL, M. (1983).
C-Peptide levels as a criterion in treatment of maturity onset diabetes.
J. Clin. Endocrinol. Metab., 57/6, 1198.
7. RUBENSTEIN, A.H. et al. (1977).
Clinical significance of circulating proinsulin and C-Peptide.
Rec. Prog. Horm. Res., 33, 435.
8. TROPEANO, G. et al. (1994).
Insulin, C-Peptide, androgens, and beta endorphin response to oral glucose in patients with polycystic ovary syndrome.
J. Clin. Endocrinol. Metab., 78/2, 305-9.
9. CONGEL, I. et al. (1993).
Effect of hyperlipidemia on plasma C-Peptide concentration during euglycemic hyperinsulinemic clamp.
Diabetes Res., 22/1, 41-8.
10. KREW, M.A. et al. (1994).
Relation of amniotic fluid C-Peptide levels to neonatal body composition.
Obstet. Gynecol., 84/1, 96-100.

XVIII. RESUME DU PROTOCOLE

ACTIVITE TOTALE (μl)	CALIBRATRICE (μl)	ECHANTILLON(S) CONTROLES (μl)
Calibrateurs (0 à 5) Echantillons, contrôles Traceur	- - 50	100 - 50
Incubation		3 heures à température ambiante
Séparation Solution de Lavage Séparation	-	aspiration 3,0 ml aspiration
Comptage (radioactivité)		Temps de comptage des tubes : 60 secondes

Numéro de catalogue DIAsource : KIP0409 – KIP0408	Numéro de P.I.: 1700444/fr	Numéro de révision : 110218/1
--	-------------------------------	----------------------------------

Date de révision: 2011-02-18



de

Vor Gebrauch des Kits lesen Sie bitte diese Packungsbeilage.

C-PEP II-RIA-CT

I. VERWENDUNGSZWECK

Ein Radio-Immunoassay für die quantitative *in vitro* Bestimmung von humanem C-Peptid in Serum.

II. ALLGEMEINE INFORMATION

A. Handelsbezeichnung : DIAsource C-PEP II-RIA-CT Kit

B. Katalognummer : KIP0409 : 96 Tests
KIP0408: 4 X 96 Tests

C. Hergestellt von: DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgien.

Für technische Unterstützung oder Bestellungen wenden Sie sich bitte an:

Tel : +32 (0)10 84.99.11 Fax : +32 (0)10 84.99.90

Für Deutschland : Kostenfreie Rufnummer : 0800 1 00 85 74 - Kostenfreie Faxnummer : 0800 1 00 85 75

E-mail Ordering : ordering@diasource.be

III. KLINISCHER HINTERGRUND

A. Biologische Aktivität

Insulin wird in den Beta-Zellen der Langerhans-Inseln als ein Vorläufermolekül, Proinsulin, synthetisiert. In den Sekretgranula der Beta-Zellen wird Proinsulin in Insulin und in ein Peptid mit 31 Aminosäuren, das so genannte C-Peptid ('Connecting Peptide') gespalten. Insulin und C-Peptid werden in äquimolaren Mengen sezerniert. Wegen seiner längeren Halbwertszeit ist die Plasmakonzentration von C-Peptid jedoch höher als jene von Insulin.

Die Bestimmung von C-Peptid im Plasma ermöglicht eine Beurteilung der endogenen Insulinproduktion, auch bei Vorliegen exogener Insulinverabreichung oder in Anwesenheit zirkulierender Anti-Insulin-Antikörper.

Darüber hinaus bietet die Bestimmung von C-Peptid im Harn einen zuverlässigen Index der Insulinproduktion, wenn die Abnahme von Blutproben schwierig ist oder wenn eine integrierte Schätzung der Sekretion von C-Peptid über einen Zeitraum von mehreren Stunden erforderlich ist.

B. Klinische Anwendungen

- . Beurteilung der Restfunktion der Beta-Zellen bei Diabetes unter Insulintherapie.
- . Erkennung und Kontrolle der Remissionsphase von Typ-1-Diabetes.
- . Zusatz in der Differenzialdiagnose zwischen Typ-1- (insulinabhängig) und Typ-2- (nicht insulin-abhängig) Diabetes.
- . Diagnose insulininduzierter artifizieller Hypoglykämie.
- . Beitrag zur Diagnose von Insulinom (Insulin-Suppressionstest).
- . Prognostischer Index der Wirkung auf den Fötus bei schwangeren Diabetikerinnen.
- . Bewertung der Insulinsekretion bei Lebererkrankung.
- . Kontrolle von Pankreatektomie.

IV. GRUNDSÄTZLICHES ZUR DURCHFÜHRUNG

Eine festgesetzte Menge an ^{125}I -markiertem C-Peptid konkurriert mit dem zu messenden, in der Probe oder in dem Kalibrator vorhandenen C-Peptid um eine Menge an Antikörperbindungsstellen, die an der Wand des Polystyren Röhrchens fixiert sind. Weder Extraktions-, noch Vorbehandlungsschritt sind erforderlich, um C-Peptid in den Proben zu bestimmen. Nach einer dreistündigen Inkubation bei Raumtemperatur, beendet das Absaugen die Verdrängungsreaktion. Die Röhrchen werden anschliessend mit Waschlösung gewaschen, danach wird nochmals abgesaugt. Eine Kalibrationskurve wird gedruckt und die C-Peptid-Konzentrationen der Proben werden über Dosis Interpolation der Kalibrationskurve bestimmt.

V. MITGELIEFERTE REAGENZIEN

Reagenz	96 Test Kit	4 x 96 Test Kit	Barcode	Rekonstitution
Mit anti C peptide beschichtete Röhrchen	2 x 48	8 x 48	Orange	gebrauchsfertig
Ag ^{125}I Tracer : ^{125}I -markiertes C-Peptid (HPLC grade) in Phosphatpuffer mit Rinderserumgelatin und Azid (<0,1%)	1 Gefäß lyophilisiert 175 kBq	4 Gefäße lyophilisiert 4 x 175 kBq	Rot	6 ml dest. Wasser zugeben
CAL 0 Null-Kalibrator in Humanserum und Thymol	1 Gefäß lyophilisiert	2 Gefäß lyophilisiert	Gelb	3 ml dest. Wasser zugeben
CAL N Kalibratoren C-Peptid: N = 1 bis 5 (genaue Werte auf Gefäß-Etiketten) in Humanserum und Thymol	5 Gefäße lyophilisiert	10 Gefäße lyophilisiert	Gelb	1 ml dest. Wasser zugeben
WASH SOLN CONC Waschlösung (TRIS-HCl)	1 Gefäß 10 ml	4 Gefäße 10 ml	Braun	70x mit dest. Wasser (Magnetrührer verwenden) verdünnen.
CONTROL N Kontrollen : N = 1 oder 2 in Humanserum und Thymol	2 Gefäße lyophilisiert	4 Gefäße lyophilisiert	Silber	1 ml dest. Wasser zugeben

Bemerkung: 1. Benutzen Sie den Null-Kalibrator zur Probenverdünnung.
2. 1 ng der Standardzubereitung ist äquivalent zu 1 ng NIBSC IRR 84/510.

VI. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL

Folgendes Material wird benötigt, aber nicht mit dem Kit mitgeliefert:

- Dest. Wasser
- Pipetten: 50 µl, 100 µl und 1 ml (Verwendung von Präzisionspipetten mit Einwegpipettenspitzen wird empfohlen)
- Einwegpolystyrenröhren (12 x 75 mm)
- Vortexmixer
- Magnetrührer
- 5 ml automatische Spritze (Cornwall-Typ) zum Waschen
- Absaugsystem (optional)
- Jeder Gamma-Counter, der ^{125}I messen kann, kann verwendet werden. Maximale Messeffizienz sollte gewährleistet sein.

VII. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- Kalibratoren:** Rekonstituieren Sie den Nullstandard mit 3 ml dest. Wasser, die anderen Standards mit 1 ml dest. Wasser.
- Kontrollen:** Rekonstituieren Sie die Kontrollen mit 1 ml dest. Wasser.
- Tracer:** Rekonstituieren Sie den Tracer mit 6 ml dest. Wasser.
- Waschlösung:** Zur Vorbereitung eines angemessenen Volumens nutzbarer Waschlösung, mischen Sie zu einem Volumen Waschlösung (70x) 69 Volumen distilliertes Wasser. Benutzen Sie einen Magnetrührer. Entsorgen Sie nach jedem Arbeitstag die überflüssige Waschlösung.

VIII. AUFBEWAHRUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Vor dem Öffnen und Rekonstituieren sind alle Kitkomponenten bei 2 bis 8°C bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum haltbar.
- Nach der Rekonstituierung muss der Tracer sofort benutzt, oder bis zum Verfallsdatum bei -20°C aufbewahrt werden.
- Nach der Rekonstituierung sind die Kalibratoren und Kontrollen sehr instabil, benutzen Sie sie deshalb sofort nach der Rekonstituierung. Werden sie aliquotiert und eingefroren, sind sie bei -20°C 3 Monate haltbar. Vermeiden Sie wiederholtes Einfrieren und Auftauen.
- Die Waschlösung sollte frisch hergestellt und am selben Tag aufgebraucht werden.
- Veränderungen im Aussehen der Kitkomponenten können auf Instabilität bzw. Zerfall hindeuten.
-

IX. PROBENSAMMLUNG UND -VORBEREITUNG

- Serumproben müssen bei 2-8 °C aufbewahrt werden.
- Falls der Test nicht innerhalb von 8 Std. durchgeführt wird, müssen die Proben bei -20°C aufgehoben werden.
- Vermeiden Sie wiederholtes Einfrieren und Auftauen.

X. DURCHFÜHRUNG

A. BEMERKUNGEN ZUR DURCHFÜHRUNG

Verwenden Sie den Kit oder dessen Komponenten nicht nach dem Ablaufdatum. Vermischen Sie nie Materialien von unterschiedlichen Kit-Chargen. Bringen Sie alle Reagenzien vor der Verwendung auf Raumtemperatur.

Mischen Sie alle Reagenzien und Proben gründlich durch sanftes Schütteln oder Rühren. Verwenden Sie saubere Einwegpipettenspitzen, um Kreuzkontamination zu vermeiden.

Präzisionspipetten oder ein automatisches Pipettensystem erhöhen die Präzision. Achten Sie auf die Einhaltung der Inkubationszeiten. Erstellen Sie für jeden Durchlauf eine Kalibrationskurve, verwenden Sie nicht die Daten von früheren Durchläufen.

B. DURCHFÜHRUNG

- Beschriften Sie je 2 beschichtete Röhrchen für jeden Kalibrator, jede Probe und jede Kontrolle. Zur Bestimmung der Gesamtaktivität, beschriften Sie 2 normale Röhrchen.
- Vortexen Sie Kalibratoren, Proben und Kontrollen kurz und geben Sie 100 µl von jedem in ihre Röhrchen.

DIESER SCHRITT MUSS INNERHALB VON 15 MINUTEN ABGESCHLOSSEN SEIN.

- Geben Sie 50 µl des ^{125}I -markierten C-Peptid in jedes Röhrchen, einschließlich der unbeschichteten Röhrchen für die Gesamtaktivität.
- Shütteln Sie vorsichtig die Halterung mit den Röhrchen um Blasen zu entfernen.
- Inkubieren Sie 3 Stunden bei Raumtemperatur.
- Saugen Sie den Inhalt jedes Röhrchens ab (außer Gesamtaktivität). Vergewissern Sie sich, dass die Plastikspitze des Absaugers den Boden des beschichteten Röhrchens erreicht, um die gesamte Flüssigkeit zu entfernen.
- Waschen Sie die Röhrchen mit 3 ml Waschlösung (außer Gesamtaktivität) und saugen Sie ab. Vermeiden Sie Schaumbildung bei Zugabe der Waschlösung.
- Lassen Sie die Röhrchen 2 Minuten aufrecht stehen, und saugen Sie den verbleibenden Flüssigkeitstropfen ab.
- Werten Sie die Röhrchen in einem Gamma-Counter über 60 Sekunden aus.

XI. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

- Berechnen Sie den Durchschnitt aus den Doppelbestimmungen.
- Berechnen Sie die gebundene Radioaktivität als Prozentsatz des am Null-Kalibratorpunkt (0) bestimmten Wertes nach folgender Formel:
- Verwenden Sie semi-logarithmisches oder doppelt-logarithmisches Millimeterpapier (über 3 Größenordnungen), tragen Sie die $(\text{B}/\text{B}0(\%))$ -Werte

$$\text{B}/\text{B}0 (\%) = \frac{\text{Aktivität (Kalibrator oder Probe)}}{\text{Aktivität (Null-Kalibrator)}} \times 100$$

- für jeden Kalibratorpunkt ein als Funktion der C-Peptid-Konzentration für jeden Kalibratorpunkt, schließen Sie offensichtliche „Ausreißer“ aus.
- Computergestützte Methoden können ebenfalls zur Erstellung der Kalibrationskurve verwendet werden. Falls die Ergebnisberechnung mit dem Computer durchgeführt wird, empfehlen wir die Berechnung mit einer „Parameter“-Kurvenfunktion.

5. Bestimmen Sie die C-Peptid-Konzentrationen der Proben durch Interpolation der Probenwerte B/B₀(%) aus der Referenzkurve.
 6. Bei jedem Assay muss der Prozentsatz des gesamten gebundenen Tracers ohne unmarkiertes C-Peptid (B₀/T) geprüft werden.

XII. TYPISCHE WERTE

Die folgenden Daten dienen nur zu Demonstrationszwecken und können nicht als Ersatz für die Echtzeitkalibrationskurve verwendet werden.

C-Peptid	Cpm	B/Bo (%)
Gesamtaktivität	75295	
Kalibrator		
0,0 pmol/ml	17690	100,0
0,09 pmol/ml	14319	80,9
0,29 pmol/ml	11618	65,7
0,95 pmol/ml	6534	36,9
2,98 pmol/ml	3361	19,0
9,94 pmol/ml	1379	7,8

XIII. LEISTUNGSMERKMALE UND GRENZEN DER METHODIK

A. Nachweisgrenze

Zwanzig Null-Kalibratoren wurden zusammen mit einem Satz anderer Kalibratoren gemessen. Die Nachweisgrenze, definiert als die scheinbare Konzentration bei zwei Standardabweichungen unterhalb des gemessenen Durchschnittswerts bei Nullbindung, entsprach 0,04 pmol/ml.

B. Spezifität

Der Prozentsatz der Kreuzreaktion, der im Vergleich der Konzentration geschätzt wurde, welche eine 50%ige Inhibition ergibt, beträgt respektive:

Substanz	Kreuzreakтивität (%)
Biosynthetisches humanes Proinsulin	5,6
Humanes Glukagon	-
Humaninsulin	-

C. Präzision

INTRA-ASSAY PRÄZISION

INTER-ASSAY PRÄZISION

Serum	N	$\text{\langle X \rangle \pm SD (pmol/ml)}$	CV (%)	Serum	N	$\text{\langle X \rangle \pm SD (pmol/ml)}$	CV (%)
A	24	0.28 ± 0.03	10.7	A	21	0.28 ± 0.03	10.7
B	26	1.21 ± 0.04	3.3	B	21	1.12 ± 0.11	9.8
C	24	0.18 ± 0.01	5.6	C	22	0.17 ± 0.02	11.8
D	24	0.68 ± 0.04	5.9	D	22	0.65 ± 0.05	7.7
E	24	1.60 ± 0.11	6.9	E	22	1.68 ± 0.12	7.1

SD : Standardabweichung; CV: Variationskoeffizient

D. Genauigkeit

VERDÜNNUNGSTEST

Probe	Verdünnung	Theoretische Konzent. (pmol/ml)	Gemessene Konzent. (pmol/ml)
Serum	1/1	-	6,99
	1/2	3,50	3,04
	1/4	1,75	1,56
	1/8	0,87	0,80
	1/16	0,44	0,46
	1/32	0,22	0,28
	1/64	0,11	0,07

Die Proben wurden mit den Null-Kalibrator verdünnt.

WIEDERFINDUNGSTEST

Probe	Zugeg. C-Peptid (pmol/ml)	Wiedergef. C-Peptid (pmol/ml)	Wiedergefunden (%)
Serum	0.14	0.14	100
	0.17	0.19	112
	0.22	0.22	100
	0.39	0.44	113
	1.14	1.12	98
	3.14	3.02	96

Umrechnungsfaktor:

Von ng/ml in pmol/ml: : 3

E. Zeitverzögerung zwischen letzter Kalibrator- und Probenzugabe

Wie im Folgenden gezeigt, muss die Probenzugabe innerhalb von höchstens 15 Minuten nach der Kalibratorzugabe erfolgen.

ZEITABSTAND

Serum pmol/ml	0'	5'	10'	15'	20'	30'
C1	0,66	0,53	0,55	0,61	0,52	0,41
C2	2,27	2,14	2,58	1,90	1,79	2,07

XIV. INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE

- Entsprechen die Ist-Werte nicht den auf den Fläschchen angegebenen Soll-Werten, können diese Werte, ohne treffende Erklärung für die Abweichungen, nicht weiterverarbeitet werden.
- Falls zusätzliche Kontrollen erwünscht sind, kann jedes Labor seinen eigenen Pool herstellen, der in Aliquots eingefroren werden sollte.
- Akzeptanzkriterien für die Differenz zwischen den Resultaten der Wiederholungstests anhand der Proben müssen auf Guter Laborpraxis beruhen.

XV. ZU ERWARTENDER BEREICH

Diese Werte sind nur Richtwerte; jedes Labor muss seinen eigenen Normalwertbereich ermitteln.

In einer Gruppe von 79 gesunden Personen wurde eine mittlere Konzentration von humanem C-Peptid von 1,02 pmol/ml festgestellt (Bereich basiert auf 2,5% bis 97,5% Perzentilen: 0,59 - 1,56 pmol/ml).

XV. VORSICHTSMASSNAHMEN UND WARNUNGEN

Sicherheit

Nur für diagnostische Zwecke.

Dieser Kit enthält ^{125}I (Halbwertzeit: 60 Tagen), das ionisierende X (28 keV) und γ (35.5 keV) Strahlungen emittiert.

Dieses radioaktive Produkt kann nur an autorisierte Personen abgegeben und darf nur von diesen angewendet werden; Erwerb, Lagerung, Verwendung und Austausch radioaktiver Produkte sind Gegenstand der Gesetzgebung des Landes des jeweiligen Endverbrauchers. In keinem Fall darf das Produkt an Menschen oder Tieren angewendet werden.

Der Umgang mit radioaktiven Substanzen sollte fern von Durchgangsverkehr in einem speziell ausgewiesenen Bereich stattfinden. Ein Logbuch für Protokolle und Aufbewahrung muss im Labor sein. Die Laborausrüstung und die Glasbehälter, die mit radioaktiven Substanzen kontaminiert werden können, müssen ausgesondert werden, um Kreuzkontaminationen mit unterschiedlichen Radioisotopen zu verhindern.

Verschüttete radioaktive Substanzen müssen sofort den Sicherheitsbestimmungen entsprechend entfernt werden. Radioaktive Abfälle müssen entsprechend den lokalen Bestimmungen und Richtlinien der für das Labor zuständigen Behörden gelagert werden. Das Einhalten der Sicherheitsbestimmungen für den Umgang mit radioaktiven Substanzen gewährleistet ausreichenden Schutz.

Die menschlichen Blutkomponenten in diesem Kit wurden mit europäischen und in den USA erprobten FDA-Methoden getestet, sie waren negativ für HBsAg, anti-HCV und anti-HIV 1 und 2. Keine bekannte Methode kann jedoch vollkommen Sicherheit darüber liefern, dass menschliche Blutbestandteile nicht Hepatitis, AIDS oder andere Infektionen übertragen. Deshalb sollte der Umgang mit Reagenzien,

Serum oder Plasmaproben in Übereinstimmung mit den Sicherheitsbestimmungen erfolgen.

Alle tierischen Produkte und deren Derivate wurden von gesunden Tieren gesammelt. Komponenten von Kindern stammen aus Ländern in denen BSE nicht nachgewiesen wurde. Trotzdem sollten Komponenten, die tierische Substanzen enthalten, als potentiell ansteckend behandelt werden.

Vermeiden Sie Hautkontakt mit den Reagenzien (Natriumazid als Konservierungsmittel). Das Azid in diesem Kit kann mit Blei oder Kupfer in den Abflußröhren reagieren und so hochexplosive Metallazide bilden. Spülen Sie während der Waschschritte den Abfluß gründlich mit viel Wasser, um die Metallazidbildung zu verhindern.

Bitte rauchen, trinken, essen Sie nicht in Ihrem Arbeitsbereich, und verwenden Sie keine Kosmetika. Pipettieren Sie nicht mit dem Mund. Tragen Sie Schutzkleidung und Wegwerfhandschuhe.

XVII. LITERATUR

1. BEISCHER, W. et al. (1976).
Human C-Peptide. Part I Radioimmunoassay.
Klin. Wschr. 54, 709.
2. BEISCHER, W. et al. (1976).
Human C-Peptide. Part II: Clinical studies.
Klin. Wschr. 54, 717.
3. BLIX, P.M. et al. (1982).
Urinary C-Peptide: an indicator of β -cell secretion under different metabolic conditions.
J. Clin. Endocrinol. Metab., 54/3, 574.
4. BONSER, A et al. (1984).
C-Peptide measurement: method and clinical utility.
CRC Critical Review in Clinical Laboratory Sciences, 19 297.
5. HORWITZ, D.L. et al. (1975).
Proinsulin, insulin and C-Peptide concentrations in human portal and peripheral blood.
J. Clin. Invest., 55, 1278.
6. RENDELL, M. (1983).
C-Peptide levels as a criterion in treatment of maturity onset diabetes.
J. Clin. Endocrinol. Metab., 57/6, 1198.
7. RUBENSTEIN, A.H. et al. (1977).
Clinical significance of circulating proinsulin and C-Peptide.
Rec. Prog. Horm. Res., 33, 435.

8. TROPEANO, G. et al. (1994).
Insulin, C-Peptide, androgens, and beta endorphin response to oral glucose in patients with polycystic ovary syndrome.
J. Clin. Endocrinol. Metab., 78/2, 305-9.
9. CONGEL, I. et al. (1993).
Effect of hyperlipidemia on plasma C-Peptide concentration during euglycemic hyperinsulinemic clamp.
Diabetes Res., 22/1, 41-8.
10. KREW, M.A. et al. (1994).
Relation of amniotic fluid C-Peptide levels to neonatal body composition.
Obstet. Gynecol., 84/1, 96-100.

XVIII. ZUSAMMENFASSUNG DES PROTOKOLLS

	GESAMT-AKTIVITÄT (μ l)	KALIBRATOREN (μ l)	PROBE(N)-KONTROLLE N (μ l)
Kalibratoren (0 to 5)	-	100	-
Proben, Kontrollen	-	-	100
Tracer	50	50	50
Inkubation	3 Std. bei Raumtemperatur		
Separation	-	absaugen	
Waschlösung	-	3,0 ml	
Separation	-	absaugen	
Auswertung	Messen der Röhrchen 60 Sekunden		

DIAsource Katalognummer : KIP0409 – KIP0408	Beipackzettel- nummer : 1700444/de	Nummer der Originalausgabe : 110218/1
--	---------------------------------------	---

Revisionsdatum: 2011-02-18



nl

Lees het hele protocol vóór gebruik.

C-PEP II-RIA-CT

I. BEOOGD GEBRUIK

Radioimmunoassay voor de kwantitatieve bepaling *in vitro* van menselijk C-Peptide in serum.

II. ALGEMENE INFORMATIE

A. Gedeponeerd handelsmerk: DIAsource C-PEP II-RIA-CT kit

B. Catalogusnummer: KIP0409 : 96 testen
KIP0408: 4 x 96 testen

C. Geproduceerd door: DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, België.

Voor technische assistentie of voor bestelinformatie

kunt u contact opnemen met :

Tel : +32 (0)10 84.99.11 Fax: +32 (0)10 84.99.90

III. KLINISCHE ACHTERGROND

A. Biologische activiteiten

Insuline wordt gesynthetiseerd in de beta-cellen van de eilandjes van Langerhans als een precursor molecule, proinsuline. In de afscheidingsgranules van de beta-cellen, wordt proinsuline gesplitst in insuline en in een peptide met 31 aminozuren, Connecting Peptide genoemd of C-Peptide. Insuline en C-Peptide worden afgescheiden in equimolaire hoeveelheden. Nochtans is de plasmaconcentratie van C-peptide hoger dan die van insuline door zijn langere halfleven.

De bepaling van plasma C-peptide laat een schatting toe van de endogene insulineproductie, zelfs bij exogene insulinetoediening of bij circulerende anti-insuline antilichamen.

Meer nog, de bepaling van C-Peptide in urine voorziet een betrouwbare index van de insulineproductie als bloedstalen moeilijk te nemen zijn of als een geïntegreerde schatting van de afscheiding van C-peptide over een periode van verschillende uren nodig is.

B. Klinische toepassingen

- Schatting van de overgebleven beta-cel functie bij diabetici onder insulinetherapie
- Opsporing en opvolging van de remissiefase van type I diabetes
- Hulp bij de differentiële diagnose tussen type I (insuline-afhankelijk) en type II (niet-insuline-afhankelijk) diabetes
- Diagnose van insuline-geïnduceerde kunstmatige hypoglycemie
- Bijdrage tot de diagnose van insulinoom (insuline onderdrukkingstest)
- Prognose index van het foetale resultaat bij zwangere vrouwen die aan diabetes lijden
- Evaluatie van de insuline secratie bij leverziekten
- Opvolgen van pancreatectomie

IV. BESCHRIJVING VAN DE METHODE

Een vaste hoeveelheid ^{125}I gelabeld C-Peptide concurreert met C-Peptide dat bepaald moet worden en aanwezig is in het monster of in de kalibrator voor een vast aantal plaatsen met antilichamen die geïmmobiliseerd zijn aan de wand van een buisje van polystyreen. Er is geen extractie of chromatografie vereist. Na een incubatie van 3 uur bij kamertemperatuur, wordt de concurrentiereactie beëindigd door een aspiratiefase. Daarna worden de buisjes gewassen met 3 ml werk-wasoplossing en opnieuw afgezogen. Een kalibratiecurve wordt uitgezet en de concentraties van C-Peptide van de monsters worden bepaald door dosisinterpolatie van de kalibratiecurve.

V. GELEVERDE REAGENTIA

Reagens	Kit voor 96 testen	Kit voor 4 x 96 testen	Kleur-code	Reconstitutie
Buisjes gecoat met anti C peptide	2 x 48	8 x 48	Oranje	Klaar voor gebruik
Ag ^{125}I	1 flacon gevriesdroogd 175 kBq	4 flacons gevriesdroogd 4 x 175 kBq	Rood	6 ml gedestilleerd water toevoegen
Tracer : C peptide gelabeld met ^{125}I (HPLC-kwaliteit) in fosfaat buffer met boven gelatine en azide (< 0,1%)				
CAL 0	1 flacon, gevriesdroogd	2 flacons, gevriesdroogd	Geel	3 ml gedestilleerd water toevoegen
NulKalibrator in humaan serum en thymol				
CAL N	5 flacons, gevriesdroogd	10 flacons, gevriesdroogd	Geel	1 ml gedestilleerd water toevoegen
Kalibrators C peptide : N = 1 tot 5 (zie de exacte waarden op de flaconetiketten) in humaan serum en thymol				
WASH SOLN CONC	1 flacon 10 ml	4 flacons 10 ml	Bruin	70x met gedestilleerd water verdunnen (gebruik een magnetische roerder)
Wasoplossing 70x : TRIS-HCl				
CONTROL N	2 flacons, gevriesdroogd	4 flacons, gevriesdroogd	zilver	1 ml gedestilleerd water toevoegen
Controles : N = 1 of 2 in humaan serum met thymol				

Opmerking: 1. Gebruik de nulkalibrator voor monsterverdunningen.
2. 1 ng van de kalibratorbereiding is gelijk aan 1 ng NIBSC IRR 84/510

VI. NIET MEEGELEVERDE MATERIALEN

De volgende materialen zijn noodzakelijk maar worden niet meegeleverd met de kit:

1. Gedestilleerd water.
2. Pipetten voor een volume van 50 μl , 100 μl en 1 ml (het gebruik van nauwkeurige pipetten met plastic wegwerptips wordt aanbevolen).
3. Wegwerpbusjes van polystyreen (12 x 75 mm)
4. Vortexmenger.
5. Magnetische roerder.
6. Automatische spuit van 5 ml (type Cornwall) voor de wasfase.
7. Afzuigssysteem (facultatief).
8. Een gammateller die geschikt is voor de bepaling van ^{125}I . Een maximale telefficiëntie moet worden gegarandeerd.

VII. BEREIDING VAN HET REAGENS

- A. **Kalibrators:** Reconstituïeer de nulkalibrator met 3 ml gedestilleerd water en de andere kalibrators met 1 ml gedestilleerd water.
- B. **Controles:** Reconstituïeer de controles met 1 ml gedestilleerd water.
- C. **Tracer:** Reconstituïeer de tracer met 6 ml gedestilleerd water.
- D. **Werk-wasoplossing:** Bereid een voldoende hoeveelheid werk-wasoplossing door 69 eenheden gedestilleerd water toe te voegen aan 1 eenheid wasoplossing. Gebruik een magnetische roerder voor de homogenisering. Op het eind van de dag moet de ongebruikte werk-wasoplossing afgewoerd worden.

VIII. OPSLAG EN VERVALDATUM VAN REAGENTIA

- Vóór opening of reconstitutie zijn alle kitcomponenten houdbaar tot de vervaldatum, zoals vermeld op het etiket, indien zij bewaard werden bij 2 tot 8°C.
- Na reconstitutie moet de tracer onmiddellijk gebruikt worden of kan hij bewaard worden bij -20°C tot de vervaldatum.
- Na reconstitutie zijn de kalibratoren en controles erg onstabiel, gebruik hen onmiddellijk na reconstitutie. Beweeg onmiddellijk in aliquots en bewaar hen bij -20°C gedurende 3 maanden. Vermijd herhaalde invriezing en onttdooing.
- Een vers bereide werk-wasoplossing moet op dezelfde dag nog gebruikt worden.
- Wijzigingen in het fysieke aspect van kitreagentia kunnen wijzen op instabiliteit of op een kwaliteitsvermindering.

IX. MONSTERAFNAME EN MONSTERBEREIDING

- Serummonsters moeten bij 2-8°C bewaard worden.
- Indien de test niet binnen 8 uur uitgevoerd wordt, dan wordt aanbevolen om ze bij -20°C te bewaren.
- Vermijd herhaalde invriezing en onttdooing.

X. PROCEDURE

A. Opmerkingen bij de procedure

Gebruik de kit of de componenten niet langer dan de aangegeven vervaldatum. Materialen van kits van verschillende loten mogen niet gemengd worden. Laat alle reagentia op kamertemperatuur komen vóór gebruik. Meng alle reagentia en monsters goed door ze voorzichtig te bewegen of door er voorzichtig mee te draaien. Om kruisbesmetting te vermijden, moet een propere wegwerpbare pipettip gebruikt worden voor toevoeging van elk reagens en monster. Pipetten met een grote precisie of geautomatiseerde pipetteerapparatuur zullen de precisie verhogen. Respecteer de incubatietijden. Bereid een kalibratiecurve voor elke run; men mag geen gegevens gebruiken van voorafgaande runs.

B. Procedure

1. Etiketteer de gecoate buisjes in duplo voor elke kalibrator, voor elk monster, voor elke controle. Etiketteer 2 normale buisjes voor de bepaling van de totaaltellingen.
2. Vortex de kalibratoren, monsters en controles gedurende korte tijd en pipetteer 100 μl van elk in het desbetreffende buisje.
3. **D deze handeling moet binnen 15 minuten uitgevoerd zijn.** Pipetteer 50 μl C peptide dat met ^{125}I gelabeld werd in elk buisje, inclusief de niet gecoate buisjes voor de totaaltellingen.
4. Schud het rek met de buisjes voorzichtig zodat eventuele ingesloten luchtbellen vrijkomen.
5. Incubeer gedurende 3 uur bij kamertemperatuur.
6. Zuig de inhoud van elk buisje (met uitzondering van de totaaltellingen) op. Zorg ervoor dat de plastic tip van de aspirator tot aan de bodem van het gecoate buisje komt zodat alle vloeistof verwijderd wordt.
7. Was de buisjes met 3 ml werk-wasvloeistof (met uitzondering van de totaaltellingen) en zuig op. Vermijd schuimvorming tijdens toevoeging van de werk-wasvloeistof.
8. Na de wasfase moeten de buisjes gedurende twee minuten rechtop blijven staan en zuig daarna de overblijvende vloeistof op.
9. Tel de buisjes in een gammateller gedurende 60 seconden.

XI. BEREKENING VAN DE RESULTATEN

1. Bereken het gemiddelde voor de bepalingen in duplo.
2. Bereken het percentage binding van de gebonden radioactiviteit, bepaald op het punt van de nulkalibrator (0), aan de hand van de volgende formule:

$$B/B_0 (\%) = \frac{\text{cpm (Kalibrator of monster)}}{\text{cpm (Nulkalibrator)}} \times 100$$

3. Zet de (B/B₀(%)) waarden uit voor elk kalibratorpunt, als een functie van de C peptide concentratie van elk kalibratorpunt, op 3-cyclisch semi-logaritmisch of dubbellogaritmisch papier, verwerp hierbij de duidelijke uitschieters.
4. Ook computergestuurde methoden kunnen worden gebruikt om de kalibratiecurve te vormen. Indien de resultaten automatisch verwerkt worden, wordt de 4 parameter logistische functie aanbevolen voor de gepaste curve.
5. Bepaal de C peptide concentraties van de monsters uit de referentiecurve door de monsterwaarden (B/B₀(%)) te interpoleren.
6. Voor elke bepaling moet het totaalpercentage van de tracer, gebonden in afwezigheid van ongelabeld C peptide (B₀/T), gecontroleerd worden.

XII. KENMERKENDE GEGEVENS

De volgende gegevens dienen enkel ter illustratie en mogen in geen geval gebruikt worden ter vervanging van de real time kalibratiedata.

C-Peptide	cpm	B/Bo (%)
Totaal telling	75295	
Kalibrator		
0,0 pmol/ml	17690	100,0
0,09 pmol/ml	14319	80,9
0,29 pmol/ml	11618	65,7
0,95 pmol/ml	6534	36,9
2,98 pmol/ml	3361	19,0
9,94 pmol/ml	1379	7,8

XIII. EIGENSCHAPPEN EN GRENZEN

A. Detectielimiet

Twintig nukalibrators werden bepaald, samen met de serie andere kalibrators. De detectielimiet, omschreven als de schijnbare concentratie van twee standaarddeviaties onder de gemiddelde tellingen bij nulbinding, bedroeg 0,04 pmol/ml.

B. Specificiteit

De percentages van kruisreactiviteit geschat naar de vergelijking van de concentraties (een remming van 50% toegevend) zijn respectievelijk:

Bestanddeel	Kruisreactiviteit (%)
Biosynthetisch humaan Proinsuline	5,6
Humaan Glucagon	-
Humaan Insuline	-

C. Precisie

PRECISIE BINNEN EEN TEST

PRECISIE TUSSEN TESTEN

Serum	N	$\bar{X} \pm SD$ (pmol/ml)	VC (%)	Serum	N	$\bar{X} \pm SD$ (pmol/ml)	VC (%)
A	24	0.28 ± 0.03	10.7	A	21	0.28 ± 0.03	10.7
B	26	1.21 ± 0.04	3.3	B	21	1.12 ± 0.11	9.8
C	24	0.18 ± 0.01	5.6	C	22	0.17 ± 0.02	11.8
D	24	0.68 ± 0.04	5.9	D	22	0.65 ± 0.05	7.7
E	24	1.60 ± 0.11	6.9	E	22	1.68 ± 0.12	7.1

SD: standaarddeviatie; VC: variatiecoëfficiënt

D. Nauwkeurigheid

VERDUNNINGSTEST

Monster	Verdunning	Theoretische concentratie (pmol/ml)	Concentratie die bepaald werd (pmol/ml)
Serum	1/1	-	6,99
	1/2	3,50	3,04
	1/4	1,75	1,56
	1/8	0,87	0,80
	1/16	0,44	0,46
	1/32	0,22	0,28
	1/64	0,11	0,07

Monsters werden verduld met de nukalibrator.

RECOVERY-TEST

Monster	C PEPTIDE toegevoegd (pmol/ml)	Recovery van C PEPTIDE (pmol/ml)	Recovery (%)
Serum	0,14	0,14	100
	0,17	0,19	112
	0,22	0,22	100
	0,39	0,44	113
	1,14	1,12	98
	3,14	3,02	96

Conversiefactor:

Van ng/ml tot pmol/ml : : 3

E. Tijdspanne tussen de laatste kalibrator en distributie van het monster

Zoals hierna aangetoond moet het verdelen van de monsters gebeurd zijn binnen maximum 15 minuten na het verdelen van de kalibrator.

TIJDSPANNE

Serum pmol/ml	0'	5'	10'	15'	20'	30'
C1	0,66	0,53	0,55	0,61	0,52	0,41
C2	2,27	2,14	2,58	1,90	1,79	2,07

XIV. INTERNE KWALITEITSCONTROLE

- Indien de resultaten, die verkregen werden voor controle 1 en/of controle 2, niet binnen het bereik vallen zoals vermeld op het flaconetiket, dan mogen de resultaten niet gebruikt worden tenzij een bevredigende uitleg gegeven wordt voor de discrepantie.
- Indien gewenst, kan elk laboratorium zijn eigen pools voor controlemonsters maken, die dan in aliquots bewaard moeten worden in de diepvriezer.
- Anvaardingscriteria voor het verschil tussen de resultaten in duplo van monsters moeten steunen op gangbare laboratoriumpraktijken.

XV. REFERENTIE-INTERVALS

Deze waarden worden slechts als leidraad gegeven; elk laboratorium moet zijn eigen normaal bereik van waarden uitmaken.

In een groep van 79 normale individuen werd een gemiddelde C-peptide concentratie gemeten van 1,02 pmol/ml (de range, gebaseerd op 2.5% tot 97.5% percentielen, bedroeg : 0,59 – 1,56 pmol/ml).

XVI. VOORZORGSMATREGELEN EN WAARSCHUWINGEN

Veiligheid

Uitsluitend voor in vitro diagnostisch gebruik.

Deze kit bevat ^{125}I (halfwaardetijd: 60 dagen), dat ioniserende X- (28 keV) en γ -stralen (35.5 keV) uitzendt.

Dit radioactieve product mag enkel overhandigd worden aan en gebruikt worden door bevoegd personeel; ontvangst, opslag, gebruik en overdracht van radioactieve producten zijn onderworpen aan de wetgeving van het land van de eindgebruiker. In geen geval mag het product toegediend worden aan mensen of dieren.

Alle handelingen met radioactief materiaal moeten plaatsvinden in een daartoe bestemde ruimte, waar uitsluitend bevoegd personeel toegelaten wordt. Een logboek met ontvangst en opslag van radioactieve materialen moet worden bijgehouden in het laboratorium. Laboratoriumapparatuur en glaswerk, dat eventueel gecontamineerd werd met radioactieve bestanddelen, moeten worden gescregeerd om kruisbesmetting van verschillende radioisotopen te vermijden. Als radioactief materiaal gemorst werd, dan moet dat onmiddellijk gereinigd worden in overeenstemming met de procedure voor stralingsveiligheid. Het radioactieve afval moet worden weggegooid in overeenstemming met de plaatselijke voorschriften en richtlijnen van de autoriteiten waaronder het laboratorium valt. naleving van de basisregels van stralingsveiligheid zorgt voor een juiste bescherming.

De componenten, afkomstig van menselijk bloed, in deze kit werden getest door in Europa goedgekeurde en/of door de Amerikaanse FDA goedgekeurde methoden op aanwezigheid van HBsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 en 2 en gaven een negatief resultaat. Geen enkele bekende methode kan echter volledige garantie bieden dat derivaten van menselijk bloed geen hepatitis, aids of andere infecties overdragen. Daarom moet men reagentia, serum- of plasmamonsters behandelen in overeenstemming met de plaatselijke veiligheidsprocedures.

Alle producten en derivaten van dierlijke oorsprong zijn afkomstig van gezonde dieren. Boviene componenten komen uit landen waar BSE niet gerapporteerd werd. Toch moeten componenten die bestanddelen van dierlijke oorsprong bevatten, behandeld worden als potentieel besmettelijk.

Vermijd dat de reagentia (natriumazide als conservermiddel) in contact komen met de huid. Azide in deze kit kan reageren met lood en koper in de afvoerleidingen en op die manier zeer explosive metaalaziden vormen. Tijdens de wasfase moeten de afvoerleidingen ruimschoots met water nagespoeld worden om ophoping van azide te vermijden.

Niet roken, drinken, eten of cosmetica aanbrengen in de werkruimte. Niet met de mond pipetteren. Draag beschermende kleding en gebruik wegwerphandschoenen.

XVII. BIBLIOGRAFIE

1. BEISCHER, W. et al. (1976). **Human C-Peptide. Part I Radioimmunoassay.** Klin. Wschr. 54, 709.
2. BEISCHER, W. et al. (1976). **Human C-Peptide. Part II: Clinical studies.** Klin. Wschr. 54, 717.
3. BLIX, P.M. et al. (1982). **Urinary C-Peptide: an indicator of β-cell secretion under different metabolic conditions.** J. Clin. Endocrinol. Metab., 54/3, 574.
4. BONSER, A et al. (1984). **C-Peptide measurement: method and clinical utility.** CRC Critical Reviewvs in Clinical Laboratory Sciences, 19 297.
5. HORWITZ, D.L. et al. (1975). **Proinsulin, insulin and C-Peptide concentrations in human portal and peripheral blood.** J. Clin. Invest., 55, 1278.
6. RENDELL, M. (1983). **C-Peptide levels as a criterion in treatment of maturity onset diabetes.** J. Clin. Endocrinol. Metab., 57/6, 1198.

7. RUBENSTEIN, A.H. et al. (1977). **Clinical significance of circulating proinsulin and C-Peptide.** Rec. Prog. Horm. Res., 33, 435.
8. TROPEANO, G. et al. (1994). **Insulin, C-Peptide, androgens, and beta endorphin response to oral glucose in patients with polycystic ovary syndrome.** J. Clin. Endocrinol. Metab., 78/2, 305-9.
9. CONGEL, I. et al. (1993). **Effect of hyperlipidemia on plasma C-Ptpdie concentration during euglycemic hyperinsulinemic clamp.** Diabetes Res., 22/1, 41-8.
10. KREW, M.A. et al. (1994). **Relation of amniotic fluid C-Peptide levels to neonatal body composition.** Obstet. Gynecol., 84/1, 96-100.

XVIII. SAMENVATTING VAN HET PROTOCOL

	TOTAAL-TELLINGEN (µl)	KALIBRATORS (µl)	MONSTER(S) CONTROLES (µl)
Kalibrators (0 tot 5) Monsters, controles Tracer	- - 50	100 - 50	- 100 50
Incubatie	3 uur bij kamertemperatuur		
Scheiding Werk-wasoplossing Scheiding	-	opzuigen 3,0 ml opzuigen	
Telling	Tel buisjes gedurende 60 seconden		

DIAsource catalogusnummer: KIP0409 – KIP0408	Bijsluiternummer : 1700444/nl	Revisienummer : 110218/1
---	----------------------------------	-----------------------------

Revisedatum: 2011-02-18



es

Ler el protocolo completo antes de usar.

C-PEP II-RIA-CT

I. INSTRUCCIONES DE USO

Radioinmunoensayo para la determinación cuantitativa in vitro del Peptido-C humano en suero.

II. INFORMACIÓN GENERAL

A. Nombre: DIAsource C-PEP II-RIA-CT Kit

B. Número de Catálogo: KIP0409 : 96 tests
KIP0408: 4 x 96 tests

C. Fabricado por: DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

Para cuestiones técnicas y información sobre pedidos contactar :

Tel : +32 (0)10 84.99.11 Fax : +32 (0)10 84.99.90

III. INFORMACIÓN CLÍNICA

A. Actividades biológicas

La insulina es sintetizada en las células beta de las islas de Langerhans como una molécula precursora, la proinsulina. En los gránulos secretorios de las células beta la proinsulina es escindida en insulina y en un peptido con 31 aminoácidos, el Peptido de Conexión o el Peptido-C. La insulina y el Peptido-C son segregados en cantidades equimolares. Sin embargo, la concentración en plasma del Peptido-C es más elevada que la concentración de la insulina por su media-vida más larga.

La determinación del Peptido-C en plasma permite una evaluación de la producción de insulina endógena, incluso en caso de administración de insulina exógena o en caso de presencia de anticuerpos anti-insulina circulantes.

Además, la determinación del Peptido-C en orina presenta un índice seguro para la producción de insulina si muestras sanguíneas se obtienen difícilmente o si una evaluación integrada de la secreción del Peptido-C durante un período de unas horas es necesaria.

B. Aplicaciones clínicas

- Evaluación de la función de las células beta residual en diabéticos bajo tratamiento con insulina
- Detección y observación de la fase de remisión de las diabetes tipo I
- Medio auxiliar para el diagnóstico diferencial entre las diabetes tipo I (dependiente de la insulina) y tipo II (no dependiente de la insulina)
- Diagnóstico de la hipoglucemia facticia inducida por la insulina
- Contribución al diagnóstico de la insulinoma (test de supresión de la insulina)
- Índice de prognosis para el resultado fetal en mujeres diabéticas embarazadas
- Evaluación de la secreción de insulina en caso de enfermedad del hígado
- Observación de la pancreatectomía

IV. PRINCIPIOS DEL MÉTODO

Una cantidad fija de C peptide marcada con I^{125} compite con el C peptide a medir, presente en la muestra ó en el calibrador, por los puntos de unión del anticuerpo inmovilizado en las paredes de un tubo de poliestireno. No se requiere ni extracción ni cromatografía. Después de 3 horas de incubación a T.A., una aspiración termina con la reacción de competición. Los tubos se lavan con 3 ml de Solución de lavado y se aspiran otra vez. Se dibuja la curva de calibración y las concentraciones de C peptide de las muestras se determinan por interpolación de la dosis en la curva de calibración.

V. REACTIVOS SUMINISTRADOS

Reactivos	Kit 96 test	Kit 4 x 96 test	Código de Color	Reconstitución
Tubos recubiertos con anti C peptide	2 x 48	8 x 48	anaranjado	Listo para uso
Ag 125I	1 vial liofilizado 175 kBq	4 viales Liofilizados 4 x 175 kBq	rojo	Añadir 6 ml de agua destilada
TRAZADOR: C peptide marcado con I^{125} (grado HPLC) en tampón fosfático con gelatina bovina y azida (<0,1%)				
CAL 0	1 vial liofilizado	2 viales liofilizados	amarillo	Añadir 3 ml de agua destilada
Calibrador cero en suero humano y thymol				
CAL N	5 viales liofilizados	10 viales liofilizados	amarillo	Añadir 1 ml de agua destilada
Calibradores C peptide - N = 1 al 5 (mirar los valores exactos en las etiquetas) en suero humano y thymol				
WASH SOLN CONC	1 vial 10 ml	4 viales 10 ml	marrón	Diluir 70 x con agua destilada (utilizar agitador magnético)
Solución de lavado (TRIS-HCl)				
CONTROL N	2 viales liofilizados	4 viales liofilizados	plateado	Añadir 1 ml de agua destilada
Controles - N = 1 o 2 en suero humano y thymol				

Nota: 1. Para diluciones de muestras utilizar estandar cero.
2. 1 ng de la preparación del calibrador es equivalente a 1 ng NIBSC IRR 84/510.

VI. MATERIAL NO SUMINISTRADO

El material mencionado a continuación es necesario y no esta incluido en el kit

1. Agua destilada
2. Pipetas de 50 μ l, 100 μ l y 1 ml (Se recomienda el uso de pipetas precisas con puntas desechables de plástico)
3. Tubos de polistireno desechables (12 x 75 mm)
4. Vortex
5. Agitador magnético
6. Jeringa automática 5 ml (tipo Cornwall) para el lavado
7. Sistema de aspiración (opcional)
8. Contador de radiaciones gamma para medir I^{125} (mínima eficiencia 70%)

VII. PREPARACIÓN REACTIVOS

- A. **Calibradores:** Reconstituir el calibrador cero con 3 ml de agua destilada y otros calibradores con 1 ml de agua destilada.
- B. **Controles:** Reconstituir los controles con 1 ml de agua destilada.
- C. **Trazador:** Reconstituir el trazador con 6 ml de agua destilada.
- D. **Solución de lavado de trabajo:** Preparar el volumen necesario de Solución de lavado de trabajo mezclando 69 partes de agua destilada por 1 parte de Solución de lavado (70x). Utilizar un agitador magnético para homogeneizar. Desechar la solución de lavado de trabajo no utilizada al final del dia.

VIII. ALMACENAJE Y CADUCIDADES DE LOS REACTIVOS

- Antes de abrir ó reconstituir todos los componentes de los kits son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta, si se guardan a 2-8°C.
- Dopo ricostituzione, il tracciante deve essere usato immediatamente o conservato a -20 °C fino alla data di scadenza.
- Dopo ricostituzione, i calibratori e i controlli sono molto instabili, utilizzarli immediatamente dopo la ricostituzione. Congelar inmediatamente en alicuotas y guardar a -20°C durante 3 meses. Evitar congelar y descongelar sucesivamente.
- La solución de lavado de trabajo recién preparada solo debe utilizarse en el mismo día.
- Las alteraciones de los reactivos en el aspecto físico pueden indicar inestabilidad ó deterioro.

IX. RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

- Las muestras de suero deben ser guardadas a 2-8°C.
- Si el ensayo no se realiza en 8 hrs., almacenar las muestras a -20°.
- Evitar congelar y descongelar sucesivamente.

X. PROTOCOLO

A. Notas de manejo

No utilizar el kit ó componentes después de la fecha de caducidad. No mezclar reactivos de diferente numero de lote. Llevar todos los reactivos a temperatura ambiente antes de su uso.

Agitar municiosamente todos los reactivos y muestras, agitándolos o girándolos suavemente. Con el fin de evitar ninguna contaminación utilizar puntas de pipetas desechables y limpias para la adición de cada reactivo y muestra.

El uso de pipetas de precisión ó equipamiento de dispensación automática mejorara la precisión. Respetar los tiempos de incubación.

Preparar la curva de calibración en cada ensayo, no utilizar los datos de un ensayo previo.

B. Protocolo

1. Marcar los tubos recubiertos por duplicado para cada unos de los estándares, muestras y controles. Para la determinación de las Cuentas Totales, marcar 2 tubos normales.
2. Agitar brevemente los calibradores, muestras y controles y dispensar 100 μ l de cada uno en sus respectivos tubos.

Esta operación debe ser terminada en menos de 15 minutos.

3. Dispensar 50 μ l de C peptideE marcado con I^{125} en cada tubo, incluyendo los tubos descubiertos a las Cuentas Totales.
4. Agitar suavemente la gradilla de tubos para soltar cualquier barbuja cautiva de las paredes de los tubos.
5. Incubar durante 3 horas a T.A.
6. Aspirar el contenido de cada tubo (excepto los de Cuentas Totales). Asegurarse que la punta de la pipeta de aspiración toca el fondo del tubo con el fin de aspirar todo el líquido.
7. Lavar los tubos con 3 ml de Solución de lavado de trabajo (excepto los de Cuentas Totales) y aspirar. Evitar la formación de espuma durante la adición de la Solución de lavado
8. Dejar los tubos en posición inversa durante 2 minutos y aspirar el líquido restante.
9. Medir la actividad de cada tubo durante 60 segundos en un Contador Gamma.

XI. CALCULO DE RESULTADOS

1. Calcular la media de los duplicados.
2. Calcular la radiactividad enlazada como un porcentaje de la unión con respecto al calibrador cero (0) de acuerdo con la siguiente formula:

$$B/B_0(\%) = \frac{\text{Cuentas (Calibrador ó muestra)}}{\text{Cuentas (Calibrador Cero)}} \times 100$$

3. Utilizando papel 3 ciclo semilogarítmico ó logit-log, representar los valores de (B/B₀)% de cada calibrador frente a las contracciones del C peptide de cada calibrador, rechazando los extremos claros. Métodos computarizados de computación de resultados pueden ser utilizados para la construcción de la curva de calibración. Si se utiliza un sistema automático de calculo de resultados, se recomienda usar la representación gráfica " 4 parámetros".
4. Por interpolación de los valores (B/B₀)% de las muestras, se determinan los valores de las concentraciones de las mismas desde la curva de calibración.
5. El porcentaje total de enlace del trazador en ausencia de C peptide no marcado (B₀/T) debe ser calculado en cada ensayo.

XII. EJEMPLO DE RESULTADOS

Los datos mostrados a continuación sirven como ejemplo y nunca deberán ser usados como una calibración real.

C-Peptide	cpm	B/Bo (%)
Cuentas Totales	75295	
Calibrador		
0,0 pmol/ml	17690	100,0
0,09 pmol/ml	14319	80,9
0,29 pmol/ml	11618	65,7
0,95 pmol/ml	6534	36,9
2,98 pmol/ml	3361	19,0
9,94 pmol/ml	1379	7,8

XIII. REALIZACIÓN Y LIMITACIONES

A. Límite de detección

Veinte calibradores cero fueron medidos en una curva con otros calibradores.

El límite de detección, definido como la concentración aparente resultante de dos desviaciones estándares debajo de la media de enlace del calibrador cero, fue de 0,04 pmol/ml.

B. Especificidad

El porcentaje de reacción cruzada estimada por la comparación de la concentración (indicando una inhibición de 50 %) es respectivamente :

Componente	Reacción-cruzada (%)
Proinsulina Biosintética humana	5,6
Glucagón humano	-
Insulina humana	-

C. Precision

PRECISION INTRA-ENSAYO

Suero	N	$\text{\bar{X}} \pm \text{SD}$ (pmol/ml)	CV (%)	Suero	N	$\text{\bar{X}} \pm \text{SD}$ (pmol/ml)	CV (%)
A	24	0.28 ± 0.03	10.7	A	21	0.28 ± 0.03	10.7
B	26	1.21 ± 0.04	3.3	B	21	1.12 ± 0.11	9.8
C	24	0.18 ± 0.01	5.6	C	22	0.17 ± 0.02	11.8
D	24	0.68 ± 0.04	5.9	D	22	0.65 ± 0.05	7.7
E	24	1.60 ± 0.11	6.9	E	22	1.68 ± 0.12	7.1

SD : Desviación Estándar; CV: Coeficiente de Variación

D. Exactitud

TEST DILUCIÓN

Muestra	Dilución	Concent. Teórica (pmol/ml)	Concent. Medida (pmol/ml)
suero	1/1	-	6,99
	1/2	3,50	3,04
	1/4	1,75	1,56
	1/8	0,87	0,80
	1/16	0,44	0,46
	1/32	0,22	0,28
	1/64	0,11	0,07

Las muestras fueron diluidas con el calibrador cero.

TEST DE RECUPERACIÓN

Muestra	C peptide añadido (pmol/ml)	C peptide Recuperado (pmol/ml)	Recuperado (%)
suero	0.14	0.14	100
	0.17	0.19	112
	0.22	0.22	100
	0.39	0.44	113
	1.14	1.12	98
	3.14	3.02	96

Factor de conversión :

De ng/ml a pmol/ml : : 3

E. Tiempo de espera entre la dispensación del último calibrador y la de la muestra

Como indicado más abajo, la dispensación de las muestras debe ser terminada en menos de 15 minutos después de la dispensación del calibrador.

TIEMPO DE ESPERA						
Suero pmol/ml	0'	5'	10'	15'	20'	30'
C1	0,66	0,53	0,55	0,61	0,52	0,41
C2	2,27	2,14	2,58	1,90	1,79	2,07

XIV. CONTROL DE CALIDAD INTERNO

- Si los resultados obtenidos para el Control 1 y/o Control 2 no están dentro del rango especificado en la etiqueta del vial, los resultados obtenidos no podrán ser utilizados a no ser que se pueda dar una explicación convincente de dicha discrepancia
- Si es conveniente, - cada laboratorio puede utilizar sus propios pools de controles, lo cuales se guardan en alícuotas congeladas.
- Los criterios de aceptación de la diferencia entre los resultados in duplo de las muestras se apoyan en las prácticas de laboratorio corrientes.

XV. INTERVALOS DE REFERENCIA

Estos valores solamente sirven de pauta; cada laboratorio tiene que establecer sus propios valores normales.

En un grupo de 79 individuos normales, la concentración mediana del péptido C humano fue 1,02 pmol/ml (alcance basado en percentilos de 2,5% a 97,5%: 0,59 - 1,56 pmol/ml).

XVI. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

Seguridad

Para uso solo en diagnóstico in vitro.

Este kit contiene I^{125} (vida media : 60 días) emisor de rayos X (28 keV) y de rayos γ (35,5 keV) ionizantes.

Este producto radiactivo solo puede ser manejado y utilizado por personas autorizadas; la compra, almacenaje, uso y cambio de productos radiactivos están sujetos a la legislación del país del usuario. En ningún caso el producto deberá ser suministrado a humanos y animales.

Todo el manejo de producto radiactivo se hará en una área señalizada, diferente de la de paso regular. Deberá de utilizarse un libro de registros de productos radiactivos utilizados. El material de laboratorio, vidrio que podría estar contaminado radiactivamente deberá de descontaminarse para evitar la contaminación con otros isótopos.

Cualquier derramamiento radiactivo deberá ser limpiado de inmediato de acuerdo con los procedimientos de seguridad. Los desperdicios radiactivos deberán ser almacenados de acuerdo con las regulaciones y normativas vigentes de la legislación a la cual pertenezca el laboratorio. El ajustarse a las normas básicas de seguridad radiológica facilita una protección adecuada.

Los componentes de sangre humana utilizados en este kit han sido testados por métodos aprobados por la CEE y/o la FDA dando negativo a HBsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 y 2. No se conoce ningún método que asegure que los derivados de la sangre humana no transmitan hepatitis, SIDA ó otras infecciones. Por lo tanto el manejo de los reactivos y muestras se hará de acuerdo con los procedimientos de seguridad locales.

Todos los productos animales y derivados han sido obtenidos a partir de animales sanos. Componentes bovinos originales de países donde BSE no ha sido informado. Sin embargo, los componentes conteniendo substancias animales deberán ser consideradas como potencialmente infecciosas.

Evitar cualquier contacto de los reactivos con la piel (azida sódica como conservante). La azida en este kit puede reaccionar con el plomo y cobre de las cañerías y producir azidas metálicas altamente explosivas. Durante el proceso de lavado, hacer circular mucha cantidad de agua por el sumidero para evitar el almacenamiento de la azida.

No fumar, beber, comer ó utilizar cosméticos en el área de trabajo. No pipetear con la boca. Utilizar ropa de protección y guantes.

XVII. BIBLIOGRAFIA

1. BEISCHER, W. et al. (1976).
Human C-Peptide. Part I Radioimmunoassay.
Klin. Wschr. 54, 709.
2. BEISCHER, W. et al. (1976).
Human C-Peptide. Part II: Clinical studies.
Klin. Wschr. 54, 717.
3. BLIX, P.M. et al. (1982).
Urinary C-Peptide: an indicator of β-cell secretion under different metabolic conditions.
J. Clin. Endocrinol. Metab., 54/3, 574.
4. BONSER, A et al. (1984).
C-Peptide measurement: method and clinical utility.
CRC Critical Reviewvs in Clinial Laboratory Sciences, 19 297.
5. HORWITZ, D.L. et al. (1975).
Proinsulin, insulin and C-Peptide concentrations in human portal and peripheral blood.
J. Clin. Invest., 55, 1278.
6. RENDELL, M. (1983).
C-Peptide levels as a criterion in treatment of maturity onset diabetes.
J. Clin. Endocrinol. Metab., 57/6, 1198.

7. RUBENSTEIN, A.H. et al. (1977).
Clinical significance of circulating proinsulin and C-Peptide.
Rec. Prog. Horm. Res., 33, 435.
8. TROPEANO, G. et al. (1994).
Insulin, C-Peptide, androgens, and beta endorphin response to oral glucose in patients with polycystic ovary syndrome.
J. Clin. Endocrinol. Metab., 78/2, 305-9.
9. CONGEL, I. et al. (1993).
Effect of hyperlypocidemia on plasma C-Ptpdie concentration during euglycemic hyperinsulinemic clamp.
Diabetes Res., 22/1, 41-8.
10. KREW, M.A. et al. (1994).
Relation of amniotic fluid C-Peptide levels to neonatal body composition.
Obstet. Gynecol., 84/1, 96-100.

XVIII. RESUMEN DEL PROTOCOLO

	CUENTAS TOTALES (μl)	CALIBRADO RES (μl)	MUESTRA(S) CONTROL(S) (μl)
Calibradores (0 al 5)	-	100	-
Muestras, controles	-	-	100
Trazador	50	50	50
Incubación	3 horas a T.A.		
Separación	-	aspirar	
Solución de lavado de trabajo	-	3,0 ml	
Separación	-	aspirar	
Contaje	Contar los tubos durante 60 segundos		

DIAsource Catalogo Nr : KIP0409 – KIP0408	P.I. Numero : 1700444/es	Revisión nr : 110218/1
--	-----------------------------	---------------------------

Fecha de la revisión: 2011-02-18



it

Prima di utilizzare il kit leggere attentamente le istruzioni per l'uso

C-PEP II -RIA-CT

I. USO DEL KIT

Kit radioimmunologico per la determinazione quantitativa in vitro del Peptide-C umano nel siero.

II. INFORMAZIONI DI CARATTERE GENERALE

A. Nome commerciale: DIAsource C-PEP II-RIA-CT Kit

B. Numero di catalogo: KIP0409: 96 test
KIP0408: 4 x 96 test

C. Prodotto da: DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgio.

Per informazioni tecniche o su come ordinare il prodotto contattare:
Tel: +32 (0) 10 84.99.11 Fax: +32 (0) 10 84.99.90

III. INFORMAZIONI CLINICHE

A. Attività biologiche

L'insulina viene sintetizzata nelle cellule beta delle isole di Langerhans come una molecola precursore, la proinsulina. Nei granuli secretori delle cellule beta, la proinsulina viene scissa in insulina e in un peptide di 31 aminoacidi, denominato Peptide di Collegamento o Peptide C. L'insulina e il Peptide C vengono secreti in quantità equimolari. Tuttavia, per la sua emivita lunga, la concentrazione plasmatica di Peptide C è maggiore rispetto a quella dell'insulina.

La determinazione del Peptide C nel plasma consente una valutazione della produzione di insulina endogena, anche in presenza di somministrazione di insulina esogena o di anticorpi anti-insulina circolanti.

Inoltre, la determinazione del Peptide C nelle urine fornisce un indice affidabile della produzione di insulina quando il prelievo del sangue è difficile o quando viene richiesta una stima integrata della secrezione di Peptide C in un periodo di alcune ore.

B. Applicazioni cliniche

- . Valutazione della funzione residua delle cellule beta nei pazienti diabetici in terapia insulinica
- . Rilevamento e monitoraggio della fase di remissione del diabete tipo I
- . Aggiunta nella diagnosi differenziale tra diabete tipo I (insulino-dipendente) e tipo II (non insulino-dipendente)
- . Diagnosi di ipoglicemia fittizia insulino-indotta
- . Contributo alla diagnosi di insulinoma (test di soppressione dell'insulina)
- . Indice prognostico dello stato del feto nelle donne diabetiche gravide
- . Valutazione della secrezione di insulina nelle epatopatie
- . Monitoraggio della pancreatectomia

IV. PRINCIPIO DEL METODO

Una quantità definita di C-Peptide marcata con ^{125}I compete con il C-Peptide presente in calibratore e campioni per un numero definito di siti di un anticorpo adsorbito sulla superficie interna di provette di polistirene. Non è richiesta estrazione né cromatografia. Dopo 3 ore di incubazione a temperatura ambiente, la reazione di competizione viene interrotta per aspirazione della miscela di reazione. Le provette vengono quindi lavate con tampone di lavaggio diluito e aspirate. La concentrazione di C-Peptide nei campioni viene calcolata per interpolazione sulla curva calibratore.

V. REATTIVI FORNITI

Reattivi	Kit da 96 test	Kit da 4 x 96 test	Codice colore	Volume di ricostituzione
Provette sensibilizzate con anticorpo anti C-Peptide	2 x 48	8 x 48	arancione	Pronte per l'uso
	1 flacone liofilizzati 175 kBq	4 flaconi liofilizzati 4 x 175 kBq	rosso	Aggiungere 6 ml di acqua distillata
Marcato: C-PEPTIDE marcato con ^{125}I (grado HPLC), in tampone fosfato con gelatina bovina e sodio azide (<0,1%)				
	1 flacone liofilizzati	2 flaconi liofilizzati	giallo	Aggiungere 3 ml di acqua distillata
Calibratore zero in siero umano e timolo				
	5 flaconi liofilizzati	10 flaconi liofilizzati	giallo	Aggiungere 1 ml di acqua distillata
Calibratore 1-5 di C-PEPTIDE, (le concentrazioni esatte degli calibratore sono riportate sulle etichette dei flaconi), in siero umano e timolo				
	1 flacone 10 ml	4 flaconi 10 ml	bruno	Diluire 70 x con acqua distillata usando un agitatore magnetico
Tampone di lavaggio (TRIS-HCl)				
	2 flaconi liofilizzati	4 flaconi liofilizzati	argento	Aggiungere 1 ml di acqua distillata
Controlli: N = 1 o 2, in siero umano e timolo				

Note : Usare lo calibratore zero per diluire i campioni

1 ng della preparazione standard è equivalente a 1 ng di NIBSC IRR 84/510.

VI. REATTIVI NON FORNITI

Il seguente materiale è richiesto per il dosaggio ma non è fornito nel kit.

- Acqua distillata.
- Pipette per dispensare 50 μl , 100 μl e 1 ml (Si raccomanda di utilizzare pipette accurate con puntale in plastica monouso).
- Provette monouso in polistirene (12 x 75 mm)
- Agitatore tipo vortex.
- Agitatore magnetico.
- Pipetta a ripetizione automatica 5 ml per i lavaggi.
- Sistema di aspirazione dei campioni (facoltativo).
- Contatore gamma con finestra per ^{125}I (efficienza minima 70%)

VII. PREPARAZIONE DEI REATTIVI

- Calibratore:** Ricostituire lo calibratore zero con 3,0 mL di acqua distillata e gli altri calibratore con 1,0 mL di acqua distillata..
- Controlli:** Ricostituire i controlli con 1,0 ml di acqua distillata.
- Marcato:** Ricostituire il marcato con 6,0 ml di acqua distillata.
- Soluzione di lavoro del tampone di lavaggio:** Preparare la quantità necessaria di soluzione di lavoro del tampone di lavaggio aggiungendo 69 parti di acqua distillata ad una parte di tampone di lavaggio concentrato (70x). Usare un agitatore magnetico per rendere la soluzione omogenea. La soluzione di lavoro va scartata al termine della giornata.

VIII. CONSERVAZIONE E SCADENZA DEI REATTIVI

- I reattivi non utilizzati sono stabili a 2-8°C fino alla data riportata su ciascuna etichetta.
- Dopo ricostituzione, il tracciante deve essere usato immediatamente o conservato a -20 °C fino alla data di scadenza.
- Dopo ricostituzione, i calibratori e i controlli sono molto instabili, utilizzarli immediatamente dopo la ricostituzione. Congelarli subito in aliquote e conservarli a -20°C per 3 mesi. Evitare ripetuti cicli di congelamento-scongelamento dei campioni.
- La soluzione di lavoro del tampone di lavaggio deve essere preparata fresca ogni volta e usata nello stesso giorno della preparazione.
- Alterazioni dell'aspetto fisico dei reattivi possono indicare una loro instabilità o deterioramento.

IX. RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

- Conservare i campioni di siero a 2-8°C.
- Se non si desidera eseguire il dosaggio entro 8 ore dal prelievo, si raccomanda di conservare i campioni a -20°C.
- Evitare ripetuti cicli di congelamento-scongelamento dei campioni.

X. METODO DEL DOSAGGIO

A. Avvertenze generali

Non usare il kit o suoi componenti oltre la data di scadenza. Non mescolare reattivi di lotti diversi. Prima dell'uso portare tutti i reattivi a temperatura ambiente.

Mescolare delicatamente i campioni per inversione o rotazione. Per evitare cross-contaminazioni, cambiare il puntale della pipetta ogni volta che si usa un nuovo reattivo o campione.

L'uso di pipette ben tarate e ripetibili o di sistemi di pipettamento automatici migliora la precisione del dosaggio. Rispettare i tempi di incubazione.

Allestire una curva di taratura per ogni seduta analitica, in quanto non è possibile utilizzare per un dosaggio curve di taratura di sedute analitiche precedenti.

B. Metodo del dosaggio

- Numerare le provette sensibilizzate necessarie per dosare in duplice ogni calibratore, campione o controllo. Numerare 2 provette non sensibilizzate per la determinazione dell'attività totale.
- Agitare brevemente su vortex calibratore, campioni e controlli. Dispensare 100 μl di calibratore, campioni e controlli nelle rispettive provette. **Effettuare questa operazione entro 15 minuti.**
- Dispensare 50 μl di C-PEPTIDE marcato con ^{125}I in tutte le provette, comprese quelle per l'attività totale.
- Scuotere gentilmente il portaprovette per liberare eventuali bolle d'aria intrappolate nel liquido contenuto nelle provette.
- Incubare 3 ore a temperatura ambiente.
- Aspirare il liquido contenuto in tutte le provette, tranne in quelle per l'attività totale, facendo attenzione che il puntale dell'aspiratore raggiunga il fondo delle provette e che aspiri tutto il liquido.
- Lavare tutte le provette, tranne quelle per l'attività totale, con 3 ml di soluzione di lavoro di tampone di lavaggio, evitando di provocare la formazione di schiuma.
- Lasciare decantare le provette in posizione verticale per due minuti circa e aspirare eventuali gocce di liquido residue.
- Contare tutte le provette per 1 minuto con il contatore gamma.

XI. CALCOLO DEI RISULTATI

- Calcolare la media delle determinazioni in duplice.
- Calcolare il rapporto (rapporto di competizione) tra radioattività legata alle provette di calibratore 1-5, campioni e controlli (B) e la radioattività legata alle provette dello calibratore zero (B0).

$$B/B0(\%) = \frac{\text{cpm (Calibratore, campioni o controlli)}}{\text{cpm (Zero Calibratore)}} \times 100$$

- Usando carta semilogaritmica a 3 cicli o logit-log e ponendo in ordinata i rapporti di competizione. B/B0 (%) per ogni calibratore e in ascissa le rispettive concentrazioni di C-PEPTIDE, tracciare la curva di taratura, scartare i valori palesemente discordanti.

4. È possibile utilizzare un sistema di interpolazione dati automatizzato. Con un sistema automatico di interpolazione dati, utilizzare la curva a 4 parametri.
5. Per interpolazione sulla curva di taratura dei rapporti di competizione di campioni e controlli, determinare le rispettive concentrazioni di C-PEPTIDE.
6. Per ogni dosaggio determinare la capacità legante B0/T.

XII. CARATTERISTICHE TIPICHE

I sotto riportati sono forniti a titolo di esempio e non devono essere utilizzati per calcolare le concentrazioni di C-PEPTIDE in campioni e controlli al posto della curva calibratore eseguita contemporaneamente.

C-PEPTIDE	cpm	B/Bo (%)
Attività totale	75295	
Calibratore		
0,0 pmol/ml	17690	100,0
0,09 pmol/ml	14319	80,9
0,29 pmol/ml	11618	65,7
0,95 pmol/ml	6534	36,9
2,98 pmol/ml	3361	19,0
9,94 pmol/ml	1379	7,8

XIII. CARATTERISTICHE E LIMITI DEL METODO

A. Sensibilità

La sensibilità, calcolata come concentrazione apparente di un campione con cpm pari alla media meno 2 deviazioni calibratore di 20 replicati dello calibratore zero, è risultata essere 0,04 pmol/ml.

B. Specificità

Le percentuali di cross-reattività stimata rispetto alla concentrazione in grado di produrre un'inibizione al 50% sono rispettivamente:

Composto	Cross-Reattività (%)
Proinsulina umana di biosintesi	5,6%
Glucagone umano	-
Insulina umana	-

C. Precisione

INTRA SAGGIO INTER SAGGIO

Siero	N	$\text{} \pm \text{SD}$ (pmol/ml)	CV (%)	Siero	N	$\text{} \pm \text{SD}$ (pmol/ml)	CV (%)
A	24	0.28 ± 0.03	10.7	A	21	0.28 ± 0.03	10.7
B	26	1.21 ± 0.04	3.3	B	21	1.12 ± 0.11	9.8
C	24	0.18 ± 0.01	5.6	C	22	0.17 ± 0.02	11.8
D	24	0.68 ± 0.04	5.9	D	22	0.65 ± 0.05	7.7
E	24	1.60 ± 0.11	6.9	E	22	1.68 ± 0.12	7.1

SD : Deviazione Standard; CV: Coefficiente di Variazione

D. Accuratezza

TEST DI DILUIZIONE

Campione	Diluizione	Concentrazione teorica (pmol/ml)	Concentrazione misurata (pmol/ml)
Siero	1/1	-	6,99
	1/2	3,50	3,04
	1/4	1,75	1,56
	1/8	0,87	0,80
	1/16	0,44	0,46
	1/32	0,22	0,28
	1/64	0,11	0,07

I campioni sono stati diluiti con calibratore zero.

TEST DI RECUPERO

Campione	C-PEPTIDE aggiunto (pmol/ml)	C-PEPTIDE recuperato (pmol/ml)	Recupero (%)
Siero	0.14	0.14	100
	0.17	0.19	112
	0.22	0.22	100
	0.39	0.44	113
	1.14	1.12	98
	3.14	3.02	96

Fattore di conversione:

da ng/ml a pmol/ml: : 3

E. Tempo trascorso tra l'aggiunta dell'ultimo calibratore e il campione

Come mostrato nella seguente tabella, il dosaggio si mantiene accurato anche quando un campione viene aggiunto nelle provette sensibilizzate 15 minuti dopo l'aggiunta del calibratore.

TEMPO TRASCORSO

Siero pmol/ml	0'	5'	10'	15'	20'	30'
C1	0,66	0,53	0,55	0,61	0,52	0,41
C2	2,27	2,14	2,58	1,90	1,79	2,07

XIV. CONTROLLO DI QUALITÀ INTERNO

- Se i risultati ottenuti dosando il Controllo 1 e il Controllo 2 non sono all'interno dei limiti riportati sull'etichetta dei flaconi, non è opportuno utilizzare i risultati ottenuti per i campioni, a meno che non si trovi una giustificazione soddisfacente.
- Ogni laboratorio può preparare un proprio pool di sieri da utilizzare come controllo, da conservare congelato in aliquote.
- I criteri di accettazione delle differenze tra i risultati in duplice dei campioni devono basarsi sulla buona prassi di laboratorio.

XV. INTERVALLI DI RIFERIMENTO

Questi valori sono puramente indicativi, ciascun laboratorio potrà stabilire i propri intervalli normali.

In un gruppo di 79 soggetti normali, la concentrazione media di Peptide-C umano riscontrata è stata di 1,02 pmol/ml (range, basato su percentili da 2,5% a 97,5%: 0,59 - 1,56 pmol/ml).

XVI. PRECAUZIONI PER L'USO

Sicurezza

Il kit è solo per uso diagnostico in vitro.

Il kit contiene ^{125}I (emivita: 60 giorni) emettente raggi X (28 keV) e γ (35.5 keV) ionizzanti.

L'acquisto, la detenzione, l'utilizzo e il trasporto di materiale radioattivo sono soggetti a regolamentazione locale. In nessun caso il prodotto può essere somministrato ad esseri umani o animali.

Usare sempre guanti e camici da laboratorio quando si manipola materiale radioattivo. Le sostanze radioattive devono essere conservate in propri contenitori in appositi locali che devono essere interdetti alle persone non autorizzate. Deve essere tenuto un registro di carico e scarico del materiale radioattivo. Il materiale di laboratorio e la vetreria deve essere dedicato all'uso di isotopi specifici per evitare cross-contaminazioni.

In caso di contaminazione o dispersione di materiale radioattivo, fare riferimento alle norme locali di radioprotezione. I rifiuti radioattivi devono essere smaltiti secondo le norme locali di radioprotezione. Lo scrupoloso rispetto delle norme per l'uso di sostanze radioattive fornisce una protezione adeguata agli utilizzatori. I reattivi di origine umana presenti nel kit sono stati dosati con metodi approvati da organismi di controllo europei o da FDA e si sono rivelati negativi per HBs Ag, anti HCV, anti HIV1 e anti HIV2. Non sono disponibili metodi in grado di offrire la certezza assoluta che derivati da sangue umano non possano provocare epatiti, AIDS o trasmettere altre infezioni. Manipolare questi reattivi o i campioni di siero o plasma secondo le procedure di sicurezza vigenti.

Tutti i prodotti di origine animale o loro derivati provengono da animali sani. I componenti di origine bovina provengono da paesi dove non sono stati segnalati casi di BSE. È comunque necessario considerare i prodotti di origine animale come potenziali fonti di infezioni.

Evitare ogni contatto dell'epidermide con i reattivi contenenti sodio azide come conservante. La sodio azide può reagire con piombo rame o ottone presenti nelle tubature di scarico per formare metallo-azidi esplosive. Smaltire questi reattivi facendo scorrere abbondante acqua negli scarichi.

Nei luoghi dove si usano sostanze radioattive non è consentito consumare cibi o bevande, fumare o usare cosmetici. Non pipettare i reattivi con pipette a bocca.

XVII. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

1. BEISCHER, W. et al. (1976). **Human C-Peptide. Part I Radioimmunoassay.** Klin. Wschr. 54, 709.
2. BEISCHER, W. et al. (1976). **Human C-Peptide. Part II: Clinical studies.** Klin. Wschr. 54, 717.
3. BLIX, P.M. et al. (1982). **Urinary C-Peptide: an indicator of β-cell secretion under different metabolic conditions.** J. Clin. Endocrinol. Metab., 54/3, 574.
4. BONSER, A et al. (1984). **C-Peptide measurement: method and clinical utility.** CRC Critical Reviewvs in Clinical Laboratory Sciences, 19 297.
5. HORWITZ, D.L. et al. (1975). **Proinsulin, insulin and C-Peptide concentrations in human portal and peripheral blood.** J. Clin. Invest., 55, 1278.
6. RENDELL, M. (1983). **C-Peptide levels as a criterion in treatment of maturity onset diabetes.** J. Clin. Endocrinol. Metab., 57/6, 1198.
7. RUBENSTEIN, A.H. et al. (1977). **Clinical significance of circulating proinsulin and C-Peptide.** Rec. Prog. Horm. Res., 33, 435.
8. TROPEANO, G. et al. (1994). **Insulin, C-Peptide, androgens, and beta endorphin response to oral glucose in patients with polycystic ovary syndrome.** J. Clin. Endocrinol. Metab., 78/2, 305-9.

9. CONGEL, I. et al. (1993). **Effect of hyperlypocidemia on plasma C-Ptpdie concentration during euglycemic hyperinsulinemic clamp.** Diabetes Res., 22/1, 41-8.
10. KREW, M.A. et al. (1994). **Relation of amniotic fluid C-Peptide levels to neonatal body composition.** Obstet. Gynecol., 84/1, 96-100.

XVIII. SCHEMA DEL DOSAGGIO

	Attività totale ml	Calibratore ml	Campioni Controlli μl
Calibratore (0 - 5)	-	100	-
Campioni, controlli	-	-	100
Marcato	50	50	50
Incubazione	3 ore a temperatura ambiente		
Separazione Soluzione di lavoro del tampone di lavaggio Separazione		Aspirare 3 ml	Aspirare
Conteggio	Contare le provette per 1 minuto		

Numero di catalogo di DIAsource : KIP0409 – KIP0408	P.I. numero : 1700444/it	Revisione numero : 110218/1
--	-----------------------------	--------------------------------

Data di revisione: 2011-02-18

CE

el

Διαβάστε ολόκληρο το πρωτόκολλο πριν από τη χρήση.

C-PEP II-RIA-CT

I. ΧΡΗΣΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΟΠΟΙΑ ΠΡΟΟΡΙΖΕΤΑΙ

Ραδιοανοσοπροσδιορισμός για την *in vitro* ποσοτική μέτρηση του ανθρώπινου C-πεπτίδιου σε ορό.

II. ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

A. Εμπορική ονομασία: Kit C PEP II-RIA-CT της DIAsource

B. Αριθμός καταλόγου: KIP0409: 96 προσδιορισμοί
KIP0408: 4 x 96 προσδιορισμοί

C. Κατασκευάζεται από την: DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

Για τεχνική βοήθεια ή πληροφορίες σχετικά με παραγγελίες επικοινωνήστε στα:

Τηλ.: +32 (0)10 84.99.11

Φαξ: +32 (0)10 88.99.90

III. ΚΛΙΝΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ

A. Βιολογική δράση

Η σύνθεση της ινσουλίνης λαμβάνει χώρα στα β-κύτταρα των νησίδων του Langerhans ως πρόδρομο μόριο, την προϊνσουλίνη. Στα εικριτικά κοκκία των β-κυττάρων, η προϊνσουλίνη διασπάται σε ινσουλίνη και σε ένα πεπτίδιο 31 αμινοξέων, το οποίο ονομάζεται συνδετικό πεπτίδιο ή C-πεπτίδιο. Η ινσουλίνη και το C-πεπτίδιο εκκρίνονται σε ισομοριακές ποσότητες. Ωστόσο, λόγω της μεγαλύτερης ημιζωής του, η συγκέντρωση του C-πεπτίδιου στο πλάσμα είναι υψηλότερη από εκείνη της ινσουλίνης. Ο προσδιορισμός του C-πεπτίδιου στο πλάσμα επιτρέπει έναν υπολογισμό της παραγωγής ενδογενούς ινσουλίνης, ακόμη και εν τη παρουσία εξωγενούς χορήγησης ινσουλίνης ή εν τη παρουσία κυκλοφορούντων αντισωμάτων αντι-ινσουλίνης.

Επιπλέον, ο προσδιορισμός του C-πεπτίδιου στα ούρα παρέχει έναν αξιόπιστο δείκτη της παραγωγής ινσουλίνης, όταν είναι δύσκολη η λήψη δείγματος αίματος ή όταν ο απαιτείται ολοκληρωμένος υπολογισμός της έκκρισης του C-πεπτίδιου για μια περίοδο αρκετών ωρών.

B. Κλινικές εφαρμογές

- Αξιολόγηση της λειτουργίας των υπολειμματικών β-κυττάρων σε διαβητικούς που λαμβάνουν θεραπεία με ινσουλίνη
- Ανίχνευση και παρακολούθηση της φάσης ύφεσης διαβήτη τύπου I
- Βοήθημα στη διαφορική διάγνωση μεταξύ διαβήτη τύπου I (ινσουλινοεξαρτώμενου) και διαβήτη τύπου II (μη ινσουλινοεξαρτώμενου)
- Διάγνωση τεχνητής υπογλυκαιμίας επαγόμενης από ινσουλίνη
- Συμβολή στη διάγνωση ινσουλινώματος (εξέταση καταστολής ινσουλίνης)
- Δείκτης πρόγνωσης της πορείας του εμβρύου σε διαβητικές έγκυες γυναίκες
- Αξιολόγηση της έκκρισης ινσουλίνης σε περίπτωση ηπατικής νόσου
- Παρακολούθηση παγκρεατεκτομής

IV. ΒΑΣΙΚ ΕΣ ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Μια σταθερή ποσότητα Τυγ-C-πεπτιδίου σημασμένου με ²⁵I ανταγωνίζεται με το C-πεπτίδιο που θα μετρηθεί, το οποίο υπάρχει στο δείγμα ή στο βαθμονομητή, για σταθερή ποσότητα θέσεων αντισωμάτων που είναι ακινητοποιημένα στο τοίχυμα ενός σωληναρίου πολυστυρενίου. Δεν απαιτείται ούτε εκγύλιση ούτε χρωματογραφία. Μετά από επώση 3 ωρών σε θερμοκρασία δωματίου, η αντίδραση ανταγωνισμού τερματίζεται με ένα βήμα αναρρόφησης. Τα σωληνάρια κατόπιν πλένονται με 3 ml διαλύματος πλύσης και αναρροφούνται. Παριστάνεται γραφικά μια καμπύλη βαθμονόμησης και προσδιορίζονται οι συγκεντρώσεις του C-πεπτιδίου των δειγμάτων με αναγωγή συγκεντρώσεων από την καμπύλη βαθμονόμησης.

V. ΠΑΡΕΧΟΜΕΝΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Αντιδραστήρια	Κιτ 96 εξετάσεων	Κιτ 4 x 96 εξετάσεων	Χρωματικός κωδικός	Ανασύσταση
Σωληνάρια επιστρωμένα με αντι-C πεπτίδιο	2 x 48	8 x 48	πορτοκαλί	Έτοιμο για χρήση
Ag 125I	1 φιαλίδιο λυοφιλο-ποιημένο 175 kBq	4 φιαλίδια λυοφιλο-ποιημένο 4 x 175 kBq	κόκκινο	Προσθέστε 6 ml απεσταγμένου νερού
CAL 0	1 φιαλίδιο λυοφιλο-ποιημένο	2 φιαλίδια λυοφιλο-ποιημένο	κίτρινο	Προσθέστε 3 ml απεσταγμένου νερού
Μηδενικός βαθμονομητής σε ανθρώπινο ορό με θυμόλη	5 φιαλίδια λυοφιλο-ποιημένο	10 φιαλίδια λυοφιλο-ποιημένο	κίτρινο	Προσθέστε 1 ml απεσταγμένου νερού
WASH SOLN CONC	1 φιαλίδιο 10 ml	4 φιαλίδια 10 ml	καφέ	Αραιώστε 70 x με απεσταγμένο νερό (χρησιμοποιήστε μαγνητικό αναδευτήρα).
CONTROL N	2 φιαλίδια λυοφιλο-ποιημένο	4 φιαλίδια λυοφιλο-ποιημένο	ασημί	Προσθέστε 1 ml απεσταγμένου νερού
Οροί ελέγχου - N = 1 ή 2 σε ανθρώπινο ορό με θυμόλη				

Σημείωση: 1. Χρησιμοποιείτε το μηδενικό βαθμονομητή για αραιώσεις ορών.
2. 1 ng του παρασκευάσματος βαθμονομητή είναι ισοδύναμο με 1 ng του NIBSC IRR 84/510.

VI. ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ ΠΟΥ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ

Τα ακόλουθα υλικά απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται στο κιτ:

- Απεσταγμένο νερό
- Πιπέτες για διανομή: 50 μl, 100 μl και 1 ml (συνιστάται η χρήση πιπετών ακριβείας με αναλώσιμα πλαστικά ρύγχη)
- Αναλώσιμα σωληνάρια από πολυστυρένιο (12 x 75 mm)
- Αναμείκτης στροβιλισμού (τύπου vortex)
- Μαγνητικός αναδευτήρας
- Αντόματη σύργιγα των 5 ml (τύπου Cornwall) για πλύση
- Σύστημα αναρρόφησης (προαιρετικό)
- Μπορεί να χρησιμοποιηθεί οποιοδήποτε μετρητής γ ακτινοβολίας με δυνατότητα μέτρησης του ¹²⁵I (ελάχιστη απόδοση 70%).

VII. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟΥ

A. Βαθμονομητές: Ανασυστήστε το μηδενικό βαθμονομητή με 3,0 ml απεσταγμένου νερού και τους άλλους βαθμονομητές με 1,0 ml απεσταγμένου νερού.

B. Οροί ελέγχου: Ανασυστήστε τους ορούς ελέγχου με 1 ml απεσταγμένου νερού.

G. Ιχνηθέτης: Ανασυστήστε τον ιχνηθέτη με 6 ml απεσταγμένου νερού.

Δ. Διάλυμα πλύσης εργασίας: Προετοιμάστε επαρκή όγκο διαλύματος πλύσης εργασίας με προσθήκη 69 όγκων απεσταγμένου νερού σε 1 όγκο διαλύματος πλύσης (70x). Χρησιμοποιήστε μαγνητικό αναδευτήρα για την ομογενοποίηση. Απορρίψτε το μη χρησιμοποιημένο διάλυμα πλύσης εργασίας στο τέλος της ημέρας.

VIII. ΦΥΛΑΞΗ ΚΑΙ ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΛΗΞΗΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

- Πριν από το άνοιγμα ή την ανασύσταση, όλα τα συστατικά του κιτ παραμένουν σταθερά έως την ημερομηνία λήξης, η οποία αναγράφεται στην ετικέτα, εφόσον διατηρούνται σε θερμοκρασία 2 έως 8°C.
- Μετά την ανασύσταση, ο ιχνηθέτης πρέπει να χρησιμοποιηθεί αμέσως ή να φυλαχθεί στους -20°C, έως την ημερομηνία λήξης.
- Μετά την ανασύσταση, οι βαθμονομητές και οι οροί ελέγχου είναι πολύ ασταθείς. Χρησιμοποιήστε τους αμέσως μετά την ανασύσταση. Για μεγαλύτερες περιόδους φύλαξης, πρέπει να σηματίζονται κλάσματα/δόσεις μιας χρήσης και να διατηρούνται στους -20°C για 3 μήνες το ανώτερο.
- Αποφεύγετε τους επακόλουθους κύκλους κατάψυξης-απόψυξης.
- Φρέσκο, παρασκευασμένο διάλυμα πλύσης εργασίας θα πρέπει να χρησιμοποιείται την ίδια ημέρα.
- Τυχόν μεταβολές της φυσικής εμφάνισης των αντιδραστηρίων του κιτ ενδέχεται να υποδηλώνουν αστάθεια ή αλλοίωση.

IX. ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

- Τα δείγματα ορού πρέπει να φυλάσσονται σε θερμοκρασία 2-8°C.
- Εάν η εξέταση δεν πραγματοποιείται εντός 8 ωρών, συνιστάται η φύλαξη στους -20°C.
- Αποφεύγετε τους επακόλουθους κύκλους κατάψυξης-απόψυξης.

X. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

A. Σημειώσεις σχετικά με το χειρισμό

Μη χρησιμοποιείτε το κιτ ή τα συστατικά μετά την ημερομηνία λήξης. Μην αναμειγνύετε υλικά από διαφορετικές παρτίδες κιτ. Φέρετε όλα τα αντιδραστήρια σε θερμοκρασία δωματίου πριν από τη χρήση. Αναμείξτε καλά όλα τα αντιδραστήρια και τα δείγματα με απαλή ανακίνηση ή αναδέυση. Χρησιμοποιείτε ένα καθαρό αναλώσιμο ρύγχος πιπέτας για την προσθήκη κάθε διαφορετικού αντιδραστηρίου και δείγματος προκειμένου να αποφύγετε την επιμόλυνση. Η ακρίβεια βελτιώνεται με χρήση πιπετών υψηλής ακρίβειας ή αυτοματοποιημένου εξοπλισμού διανομής με πιπέτες. Τηρείτε τους χρόνους επώσης. Προετοιμάστε μια καμπύλη βαθμονόμησης για κάθε ανάλυση και μη χρησιμοποιείτε δεδομένα από προηγούμενες αναλύσεις.

B. Διαδικασία

- Σημάνετε επιστρωμένα σωληνάρια εις διπλούν για κάθε βαθμονομητή, δείγμα και ορό ελέγχου. Για τον προσδιορισμό των μετρήσεων του ιχνηθέτη ¹²⁵I ("total"), σημάνετε 2 κοινά (μη επιστρωμένα) σωληνάρια.
- Αναμείξτε για λέιο (με αναμείκτη στροβιλισμού τύπου vortex) βαθμονομητές, προαραιωμένα δείγματα και ορούς ελέγχου και διανείμετε 100 μl από έκαστο σε αντίστοιχα σωληνάρια.
- Αυτή η διαδικασία θα πρέπει να ολοκληρώνεται εντός 15 λεπτών.**
- Διανείμετε 50 μl C-peptide σημασμένου με ¹²⁵I σε κάθε σωληνάριο, συμπεριλαμβάνοντας τα μη επιστρωμένα σωληνάρια που αφορούν τις μετρήσεις του ιχνηθέτη ¹²⁵I ("total").
- Ανακινήστε απαλά με το χέρι τη βάση στρήματος των σωληναρίων για να απελευθερώσετε τυχόν παγιδευμένες φυσαλίδες αέρα.
- Επωάστε επτά 3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.
- Αναρροφήστε (ή μεταγγίστε) το περιεχόμενο κάθε σωληναρίου (με εξαίρεση εκείνα που αφορούν τις μετρήσεις του ιχνηθέτη ¹²⁵I ["total"]). Βεβαιωθείτε ότι το πλαστικό ρύγχος του αναρροφητή φθάνει στον πυθμένα του επιστρωμένου σωληναρίου προκειμένου να αφαιρεθεί όλη η ποσότητα του υγρού.
- Πλύνετε τα σωληνάρια με 3 ml διαλύματος πλύσης εργασίας (με εξαίρεση εκείνα που αφορούν τις μετρήσεις του ιχνηθέτη ¹²⁵I ["total"] και αναρροφήστε (ή μεταγγίστε). Αποφύγετε το σχηματισμό αφρού κατά τη διάρκεια της προσθήκης του διαλύματος πλύσης εργασίας.
- Αφήστε τα σωληνάρια να σταθούν σε όρθια θέση για δύο λεπτά και αναρροφήστε τη σταγόνα υγρού που απομένει.
- Μετρήστε τα σωληνάρια σε μετρητή γ ακτινοβολίας για 60 δευτερόλεπτα.

XI. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

- Υπολογίστε τη μέση τιμή των διπλών προσδιορισμών.
- Υπολογίστε τη δεσμευμένη ραδιενέργεια ως ποσοστό της δέσμευσης που προσδιορίζεται στο σημείο μηδενικού βαθμονομητή (0) σύμφωνα με τον ακόλουθο τύπο:

$$B/B0(%) = \frac{\text{Μετρήσεις (Βαθμονομητής ή δείγμα)}}{\text{Μετρήσεις (Μηδενικός βαθμονομητής)}} \times 100$$

- Με χρήση ημιλογαριθμικού χαρτιού γραφήματος ή χαρτιού γραφήματος logit-log 3 κύκλων, παραστήστε γραφικά τις τιμές (B/B0(%)) για κάθε σημείο βαθμονομητή ως συνάρτηση της συγκέντρωσης του C peptide για κάθε σημείο βαθμονομητή. Απορρίψτε τις εμφανείς μη αποδεκτές τιμές.
- Για την κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν επίσης μέθοδοι με τη βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή. Εάν χρησιμοποιείται αυτόματη επεξεργασία αποτελεσμάτων, συνιστάται προσαρμογή καμπύλης λογιστικής συνάρτησης 4 παραμέτρων.
- Με αναγωγή των τιμών των δειγμάτων (B/B0 (%)), προσδιορίστε τις συγκεντρώσεις C peptide των δειγμάτων από την καμπύλη βαθμονόμησης.
- Για κάθε προσδιορισμό, πρέπει να ελέγχεται το ποσοστό του συνολικού ιχνηθέτη που δεσμεύεται απουσία του μη σημασμένου C peptide (B0/T).

XII. ΤΥΠΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Τα ακόλουθα δεδομένα προορίζονται μόνο ως παράδειγμα και δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται ποτέ αντί της καμπύλης βαθμονόμησης πραγματικού χρόνου.

C-peptide	cpm	B/B0 (%)
Κρούσεις του ιχνηθέτη ^{125}I ("total")	75295	
Βαθμονομητής		
0,0 pmol/ml	17690	100,0
0,09 pmol/ml	14319	80,9
0,29 pmol/ml	11618	65,7
0,95 pmol/ml	6534	36,9
2,98 pmol/ml	3361	19,0
9,94 pmol/ml	1379	7,8

XIII. ΑΠΟΔΟΣΗ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

A. Όριο ανίχνευσης

Υποβλήθηκαν σε προσδιορισμό είκοσι μηδενικοί βαθμονομητές μαζί με ένα σύνολο άλλων βαθμονομητών.

Το όριο ανίχνευσης, ορίζομενο ως η φαινομενική συγκέντρωση δύο τυπικών αποκλίσεων κάτω από τις μέσες καταμετρήσεις σε μηδενική δέσμευση, ήταν 0,04 pmol/ml.

B. Ειδικότητα

Το ποσοστό διασταυρούμενης αντίδρασης, που υπολογίζεται με σύγκριση της συγκέντρωσης που αποδίδει αναστολή 50%, είναι αντίστοιχα:

Ένωση	Διασταυρούμενη αντίδραση (%)
Βιοσυνθετική ανθρώπινη προϊνσουλίνη	5,6
Ανθρώπινο γλυκαγόνο	-
Ανθρώπινη ινσουλίνη	-

G. Ακρίβεια

ΑΚΡΙΒΕΙΑ ΓΙΑ ΤΟΝ ΙΔΙΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ

ΑΚΡΙΒΕΙΑ ΜΕΤΑΞΥ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΩΝ

Ορός	N	$\langle X \rangle \pm T.A.$ (pmol/ml)	Σ.Δ. (%)	Ορός	N	$\langle X \rangle \pm T.A.$ (pmol/ml)	Σ.Δ. (%)
A	24	0.28 ± 0.03	10.7	A	21	0.28 ± 0.03	10.7
B	26	1.21 ± 0.04	3.3	B	21	1.12 ± 0.11	9.8
C	24	0.18 ± 0.01	5.6	C	22	0.17 ± 0.02	11.8
D	24	0.68 ± 0.04	5.9	D	22	0.65 ± 0.05	7.7
E	24	1.60 ± 0.11	6.9	E	22	1.68 ± 0.12	7.1

T.A.: Τυπική απόκλιση, Σ.Δ.: Συντελεστής διακύμανσης

Δ. Ορθότητα

ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΡΑΙΩΣΗΣ

Δείγμα	Αραίωση	Θεωρητική συγκέντρωση (pmol/ml)	Μετρηθείσα συγκέντρωση (pmol/ml)
ορός	1/1	-	6,99
	1/2	3,50	3,04
	1/4	1,75	1,56
	1/8	0,87	0,80
	1/16	0,44	0,46
	1/32	0,22	0,28
	1/64	0,11	0,07

Τα δείγματα αραιώθηκαν με μηδενικό βαθμονομητή.

ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΝΑΚΤΗΣΗΣ

Δείγμα	Προστεθείς C peptide (pmol/ml)	Ανακτηθείς C peptide (pmol/ml)	Ανακτηθείς (%)
ορός	0,14	0,14	100
	0,17	0,19	112
	0,22	0,22	100
	0,39	0,44	113
	1,14	1,12	98
	3,14	3,02	96

Συντελεστής μετατροπής:

Από ng/ml σε pmol/ml : 3

E. Μεσοδιάστημα μεταξύ της διανομής τελευταίου βαθμονομητή και δείγματος

Όπως φαίνεται πιο κάτω, η διανομή των δειγμάτων πρέπει να γίνεται εντός διαστήματος 15 λεπτών το μέγιστο μετά τη διανομή του βαθμονομητή.

ΜΕΣΟΔΙΑΣΤΗΜΑ

Ορός pmol/ml	0'	5'	10'	15'	20'	30'
C1	0,66	0,53	0,55	0,61	0,52	0,41
C2	2,27	2,14	2,58	1,90	1,79	2,07

XIV. ΕΣΩΤΕΡΙΚΟΣ ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

- Εάν τα αποτελέσματα που λαμβάνονται για τον ορό ελέγχου 1 ή/και τον ορό ελέγχου 2 δε βρίσκονται εντός του πεδίου τιμών που καθορίζεται στην ετικέτα του φιαλίδιου, τα αποτελέσματα δεν είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν, εκτός εάν έχει δοθεί ικανοποιητική εξήγηση για τη ασυμφωνία.
- Εάν είναι επιθυμητό, κάθε εργαστήριο μπορεί να δημιουργήσει τα δικά του μείγματα δειγμάτων ελέγχου (pools), τα οποία πρέπει να διατηρούνται κατεψυγμένα σε κλάσματα/δόσεις μιας χρήσης.
- Τα κριτήρια αποδοχής για τη διαφορά μεταξύ των διπλών αποτελεσμάτων των δειγμάτων θα πρέπει να βασίζονται σε ορθές εργαστηριακές πρακτικές.

XV. ΤΙΜΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Οι τιμές αυτές παρέχονται μόνον ως οδηγός. Κάθε εργαστήριο θα πρέπει να καθιερώσει το δικό του πεδίο φυσιολογικών τιμών.

Σε μια ομάδα 79 φυσιολογικών ατόμων, η μέση συγκέντρωση του ανθρώπινου C-peptidίου βρέθηκε ότι ήταν 1,02 pmol/ml (πεδίο τιμών με βάση τα εκατοστημόρια από 2,5% έως 97,5%: 0,59 - 1,56 pmol/ml).

XVI. ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ

Ασφάλεια

Μόνο για διαγνωστική χρήση *in vitro*.

Το κιτ αντό περιέχει το ^{125}I (Χρόνος ημιζωής: 60 ημέρες), μια ραδιενεργή ουσία η οποία εκπέμπει ιονίζουσα ακτινοβολία X (28 keV) και γ (35.5 keV). Αντό το ραδιενεργό προϊόν είναι δυνατό να μεταφερθεί και να χρησιμοποιηθεί μόνο από εξουσιοδοτημένα άτομα. Η αγορά, φύλαξη, χρήση και ανταλλαγή ραδιενεργών προϊόντων υπόκεινται στη νομοθεσία της χώρας του τελικού χρήστη. Σε καμία περίπτωση δεν πρέπει να χορηγείται το προϊόν σε ανθρώπους ή ζώα.

Ολος ο χειρισμός του ραδιενεργού υλικού θα πρέπει να εκτελείται σε καθορισμένο χώρο, μακριά από χώρους τακτικής διέλευσης. Στο εργαστήριο πρέπει να διατηρείται ημερολόγιο για την παραλαβή και τη φύλαξη ραδιενεργών υλικών. Εξοπλισμός και γυάλινα σκεύη του εργαστηρίου, τα οποία θα μπορούσαν να μολυνθούν με ραδιενεργές ουσίες, θα πρέπει να φυλάσσονται σε ξεχωριστό χώρο για την πρόληψη επιμόλυνσης των διαφόρων ραδιοισότοπων.

Τυχόν διαφροές ραδιενεργών υγρών πρέπει να καθαρίζονται αμέσως σύμφωνα με τις διαδικασίες ασφάλειας από ραδιενέργεια. Τα ραδιενεργά απόβλητα πρέπει να απορρίπτονται σύμφωνα με τους τοπικούς κανονισμούς και τις κατευθυντήριες οδηγίες των αρχών που έχουν δικαιοδοσία στο εργαστήριο. Η τήρηση των βασικών κανόνων ασφάλειας από ραδιενέργεια παρέχει επαρκή προστασία.

Τα συστατικά ανθρώπινου αίματος που περιλαμβάνονται στο κιτ αυτό έχουν ελεγχθεί με μεθόδους εγκεκριμένες στην Ευρώπη ή/και από τον FDA και έχει διαπιστωθεί ότι είναι αρνητικά ως προς την παρουσία HbsAg, αντι-HCV, αντι-HIV-1 και 2. Καμία γνωστή μέθοδος δεν είναι δυνατό να παρέχει πλήρη διασφάλιση ότι παράγωγα του ανθρώπινου αίματος δε θα μεταδώσουν ηπατίτιδα, AIDS ή άλλες λοιμώξεις. Επομένως, ο χειρισμός αντιδραστηρίων, δειγμάτων ορού ή πλάσματος θα πρέπει να γίνεται σύμφωνα με τις τοπικές διαδικασίες περί ασφάλειας.

Όλα τα ζωικά προϊόντα και παράγωγα έχουν συλλεχθεί από υγιή ζώα. Τα βόεια συστατικά προέρχονται από χώρες όπου δεν έχει αναφερθεί BSE. Παρ' όλ' αυτά, συστατικά που περιέχουν ζωικές ουσίες θα πρέπει να αντιμετωπίζονται ως δυνητικώς μολυσματικά.

Αποφέυγετε οποιαδήποτε επαφή του δέρματος με αντιδραστήρια (χρησιμοποιείται αξιό του νατρίου ως συντηρητικό). Το αξιό το στο κιτ αυτό ενδέχεται να αντιδράσει με μόλυβδο και χαλκό των υδραυλικών σωληνώσεων και να σχηματίσει με τον τρόπο αυτό ιδιαίτερα εκρηκτικά αξιότιτα μετάλλων. Κατά τη διάρκεια του βήματος πλύσης, εκπλύνετε την αποχέτευση με μεγάλη ποσότητα νερού, για την πρόληψη τυχόν συστώρευσης αξιότιτων.

Μην καπνίζετε, μην πίνετε, μην τρώτε και μη χρησιμοποιείτε καλλυντικά στο χώρο εργασίας. Μην διανέμετε με πιπέτα χρησιμοποιώντας το στόμα σας. Χρησιμοποιείτε προστατευτικό ρουχισμό και γάντια μιας χρήσης.

XVII. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. BEISCHER, W. et al. (1976). **Human C-Peptide. Part I Radioimmunoassay.** Klin. Wschr. 54, 709.
2. BEISCHER, W. et al. (1976). **Human C-Peptide. Part II: Clinical studies.** Klin. Wschr. 54, 717.
3. BLIX, P.M. et al. (1982). **Urinary C-Peptide: an indicator of β-cell secretion under different metabolic conditions.** J. Clin. Endocrinol. Metab., 54/3, 574.
4. BONSER, A et al. (1984). **C-Peptide measurement: method and clinical utility.** CRC Critical Reviewvs in Clinical Laboratory Sciences, 19 297.
5. HORWITZ, D.L. et al. (1975). **Proinsulin, insulin and C-Peptide concentrations in human portal and peripheral blood.** J. Clin. Invest., 55, 1278.

6. RENDELL, M. (1983). **C-Peptide levels as a criterion in treatment of maturity onset diabetes.** J. Clin. Endocrinol. Metab., 57/6, 1198.
7. RUBENSTEIN, A.H. et al. (1977). **Clinical significance of circulating proinsulin and C-Peptide.** Rec. Prog. Horm. Res., 33, 435.
8. TROPEANO, G. et al. (1994). **Insulin, C-Peptide, androgens, and beta endorphin response to oral glucose in patients with polycystic ovary syndrome.** J. Clin. Endocrinol. Metab., 78/2, 305-9.
9. CONGEL, I. et al. (1993). **Effect of hyperglycemia on plasma C-Ptpdie concentration during euglycemic hyperinsulinemic clamp.** Diabetes Res., 22/1, 41-8.
10. KREW, M.A. et al. (1994). **Relation of amniotic fluid C-Peptide levels to neonatal body composition.** Obstet. Gynecol., 84/1, 96-100.

XVIII. ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΤΟΥ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟΥ

	ΚΡΟΥΣΕΙΣ "TOTAL" μl	ΒΑΘΜΟΝΟ ΜΗΤΕΣ μl	ΔΕΙΓΜΑ (ΤΑ) ΟΡΟΙ ΕΛΕΞΧΟΥ μl
Βαθμονομητές (0 έως 5)	-	100	-
Δείγματα, οροί ελέγχου Ιχνηθέτης	50	50	50
Επώαση	3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου		
Διαχωρισμός Διάλυμα πλύσης εργασίας Διαχωρισμός	-	Αναρρόφηση (ή μετάγγιση) 3,0 ml Αναρρόφηση (ή μετάγγιση)	
Μέτρηση	Μέτρηση σωληναρίων επί 60 δευτερόλεπτα		

Αρ. καταλόγου DIAsource: KIP0409 – KIP0408	Αριθμός P.I.: 1700444/el	Αρ. αναθεώρησης: 110218/1
---	-----------------------------	------------------------------



bu

Прочетете целия протокол преди употреба

C-PEP II-RIA-CT

I. УПОТРЕБА

Радиоимунно изследване за количествено измерване *in vitro* на съдържанието на човешки С-пептид в серум.

II. ОБЩА ИНФОРМАЦИЯ

A. Патентовано име: DIAsource C-PEP II-RIA-CT Kit

B. Каталожен номер: KIP0409: 96 теста
KIP0408: 4 x 96 теста

C. Произведено от: DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

За техническа помощ или поръчка:

Тел.: +32 (0)10 84.99.11 Факс: +32 (0)10 84.99.90

III. КЛИНИЧЕН ПРЕГЛЕД

A. Биологична активност

Инсулинът се синтезира в бета-клетките на Лангерхансовите острови като молекула-прекурсор, проинсулин. В секреторните гранули на бета-клетките проинсулинът се разделя на инсулин и 31-аминокиселинен пептид, наречен свързващ пептид или С-пептид. Инсулинът и С-пептидът се секрециират в еквимоларни количества. Поради по-големият полуживот на С-пептида, обаче, неговата плазмена концентрация е по-висока от тази на инсулина.

Определянето на съдържащия се в плазмата С-пептид позволява извършването на количествена оценка на произвеждания ендогенен инсулин, дори и при администриране на екзогенен инсулин или при наличие на циркулиращи анти-инсулинови антитела.

Нещо повече, съдържанието на С-пептид в урината е надежден индекс за произвеждания инсулин, когато взимането на кръвна проба е трудно или когато трябва да се направи интегрирана оценка на секрецията на С-пептид за период от няколко часа.

B. Клинични приложения

- Анализ на функцията на остатъчните бета-клетки при диабет с инсулинова терапия
- Детекция и наблюдаване на ремисионната фаза при диабет тип I
- Помощен анализ на диференциалната диагностика на диабет тип I (инсулиновозависим) и тип II (нейинсулиновозависим)
- Диагностика на инсулин-индукционата фалшива хипогликемия
- Подпомагане на диагностиката на инсулином (изследване на инсулиновата супресия)
- Критерий за прогнозиране на изхода от бременността при жени, страдащи от диабет
- Определяне на секрецията на инсулин при заболяване на черния дроб
- Следене на панкреатомии

IV. ПРИНЦИПИ НА МЕТОДА

Определено количество натоварен с ^{125}I тирозин С-пептид се конкурира с подлежащия на измерване С-пептид от пробите, контролите или калибраторите за определено количество центрове на специфични антитела, имобилизирани на стените на полистиролови епруветки. Не е необходима нито екстракция, нито хроматография. След тричасова инкубация при стайна температура конкурентната реакция приключва с аспирация. След това епруветките се измиват с 3 ml измиващ разтвор и отново се аспирират. Начертава се калибрационна крива и се определят концентрациите на С-пептид в пробите на базата на интерполяция на дозите от калибрационната крива.

V. ИЗПОЛЗВАНИ РЕАГЕНТИ

Реагенти	Количество 96 теста	Количество 4 x 96 теста	Цветен код	Приготвяне
Епруветки, покрити с анти-С- пептид	2 x 48	8 x 48	оранжев	Готов за употреба
Ab 125I ПРОСЛЕДЯВАЩО ВЕЩЕСТВО: тирозин С- пептид, натоварен с ^{125}I од (HPLC скала) във фосфатен буфер с волски желатин и азид (<0.1%)	1 флакон лиофилизиран 175 kBq	4 флакона лиофилизиран 4 x 175 kBq	червен	Добавете 6 ml дестилирана вода
CAL 0 Нулев Калибратор в човешки serum с тимол	1 флакон лиофилизиран	2 флакона лиофилизиран	жълт	Добавете 3 ml дестилирана вода
CAL N Калибратор - N = 1 до 5 (виж точните стойности на етикета на флаконите) в човешки serum с тимол	5 флакона лиофилизиран	10 флакона лиофилизиран	жълт	Добавете 1 ml дестилирана вода
WASH SOLN CONC Измиващ разтвор (TRIS- HCl)	1 флакон 10 ml	4 флакона 10 ml	кафяв	Разредете 70x с дестилирана вода (използвайте магнитен сепаратор)
CONTROL N Контроли 1 и 2 в човешки serum с тимол	2 флакона лиофилизиран	4 флакона лиофилизиран	сребърен	Добавете 1 ml дестилирана вода

Забележка : 1. Използвайте нулевия калибратор за серумните разреждания.
2. 1 ng от калибрационния препарат е равен на 1 ng NIBSC IRR 84/510

VI. СРЕДСТВА, КОИТО НЕ СЕ ОСИГУРЯВАТ

Следните материали са необходими, но не се осигуряват в набора:

- Дестилирана вода
- Пипети от: 50 μl , 100 μl и 1 ml (препоръчва се използването на прецизни пипети с накрайници за еднократна употреба).
- Полистиролови епруветки за еднократна употреба (12 x 75 mm)
- Завихрящ смесител
- Магнитен сепаратор
- 5 ml автоматична спринцовка (тип Cornwall) за измиване
- Аспирационна система (по избор).
- Всякакъв гама брояч, който може да измери употребеното количество ^{125}I (минимален капацитет от 70%).

VII. ПРИГОТВЯНЕ НА РЕАГЕНТА

- Калибратори:** Реконституирайте нулевия калибратор с 3,0 ml дестилирана вода, а останалите калибратори с 1,0 ml дестилирана вода.
- Контроли:** Реконституирайте контролите с 1,0 ml дестилирана вода
- Проследяващо вещество:** Реконституирайте трейсър с 6,0 ml дестилирана вода.
- Работен измиващ разтвор:** Подгответе адекватен обем от работния измиващ разтвор чрез добавянето на 69 обема дестилирана вода към 1 обем от измивания разтвор (70x). Използвайте магнитен сепаратор, за да хомогенизирате. Изхвърлете неупотребеното количество от работния измиващ разтвор в края на деня.

VIII. СЪХРАНЕНИЕ И СРОК НА ГОДНОСТ НА РЕАГЕНТИТЕ

- Всички компоненти на кита са стабилни до датата на срока на годност, посочен на опаковката, при температура на съхранение от 2 °C до 8°C преди отваряне или реконституиране.
- След разтваряне, трейсър / проследяващо вещество/ трябва да се използва незабавно или да се съхранява при температура - 20°C до датата на срока на годност.
- След разтваряне калибраторите и контролите са много нестабилни, използвайте ги незабавно след разтваряне. При по-продължителни периоди на съхранение трябва да се приготвят аликвоти и да се съхраняват при -20°C за не повече от 3 месеца. Избягвайте последващи цикли на замразяване - размразяване.
- Прясно приготвения Работен измиващ разтвор трябва да бъде използван същия ден.
- Промени във физическия вид на реагентите на кита индицират нестабилност или негодност.

IX. СЪБИРАНЕ НА ПРОБИТЕ И ОБРАБОТКА

- Серумът трябва да се съхранява при температури 2-8°C.
- Ако тестът не се направи в рамките на 8 часа, се препоръчва съхранение при температура -20°C.
- Избягвайте последващи цикли на замразяване-размразяване.

X. ПРОЦЕДУРА

A. Общи бележки

Не използвайте кита или компонентите му след датата на изтичане срока на годност. Не смесвайте материали от различни партиди китове. Преди употреба оставете всички реагенти на стайна температура.

Внимателно смесвайте всички реагенти с пробите чрез нежно раклащане или въртеливо размесване. За да избегнете кръстосана контаминация, използвайте чист пипетен накрайник за еднократна употреба за добавянето на всеки реагент към съответната прoba.

Високо прецизираните пипети или автоматичните пипети биха подобрili точността. Съобразявайте се с времето за инкубация.

Подгответе калибрационна крива за всяко измерване и не използвайте данни от предишни измервания.

B. Процедура

- Означете две по две покритите епруветки за всеки калибратор, контрола и прoba. За определяне на общия брой импулси, обозначете 2 нормални епруветки.
- Разклатете за кратко време калибраторите, контролите и пробите и разпределете по 100 μl от всяко в съответните епруветки.
- Тази операция трябва да се извърши в рамките на 15 минути.**
- Разпределете 50 μl тирозин С-пептид, натоварен с ^{125}I од във всяка епруветка, включително в непокритите епруветки за общото преброяване.
- Разклатете нежно с ръка контейнера с епруветките, за да освободите всяко останало въздушно меухрче.
- Инкубирайте за 3 часа при стайна температура.
- Аспирирайте (или прелейте) съдържанието на всяка епруветка (освен епруветките за определяне на общия брой импулси). Уверете се, че пластмасовият край на аспиратора достига дългото на покритата епруветка, за да може да отстрани цялата течност.
- Измийте епруветките с 3 ml Работен Разтвор за измиване (с изключение на общия брой) и аспирирайте (или прелейте). Избягвайте разпенване по време на добавянето на Работния Разтвор за измиване.
- Оставете епруветките в изправено положение за две минути и аспирирайте останалите капки течност.
- Отчетете епруветките в гама брояч за 60 секунди.

XI. ИЗЧИСЛЯВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

- Изчислете средното аритметично на резултатите, получени от две по две епруветки.
- Изчислете свързващата радиоактивност като процент от свързането, определен при нулевата калибрационна точка (0) според следната формула :
- Използвайки 3 циклична семи-логаритмична или logit-log графична хартия, нанесете $(B/B_0(\%))$ стойностите за всяка калибрационна точка като функция на С-пептид концентрацията на всяка калибрационна точка. Отхвърлете очевидните отклонения..

$$B/B_0 (\%) = \frac{\text{брой (Калибратор и проба)}}{\text{брой (Нулев Калибратор)}} \times 100$$

4. Компютърно асистирани методи също могат да бъдат използвани, за да се построи калибрационната крива. Ако се използва автоматичен метод на обработка на резултатите, се препоръчва подходяща 4-параметрова логистична крива.
5. Чрез интерполяция на $(B/B_0 (\%))$ стойностите от пробата се определят С-пептид концентрациите на пробите от калибрационната крива.
6. Процентът на общото проследяващо вещество, свързано при липса на ненатоварен С-пептид (B_0/T), трябва да се провери за всяко изследване.

D. Точност

ТЕСТ С РАЗРЕЖДАНЕ

Проба	Разреждане	Теоретична концентрация (pmol/ml)	Измерена концентрация (pmol/ml)
Серум	1/1	-	6,99
	1/2	3,50	3,04
	1/4	1,75	1,56
	1/8	0,87	0,80
	1/16	0,44	0,46
	1/32	0,22	0,28
	1/64	0,11	0,07

Пробите бяха разредени с нулев калибратор

ВЪЗСТАНОВИТЕЛЕН ТЕСТ

Проба	Добавен С-пептид (pmol/ml)	Възстановен С-пептид (pmol/ml)	Възстановен (%)
Серум	0,14	0,14	100
	0,17	0,19	112
	0,22	0,22	100
	0,39	0,44	113
	1,14	1,12	98
	3,14	3,02	96

Конверсионен фактор:

От ng/ml до pmol/ml : : 3

D. Закъснение

Както е показано по-долу, резултатите от изпитването остават точни дори когато пробата е разпределена 15 минути след като калибраторът е бил добавен към покритата епруветка.

Закъснение

Серум pmol/ml	0'	5'	10'	15'	20'	30'
C1	0,66	0,53	0,55	0,61	0,52	0,41
C2	2,27	2,14	2,58	1,90	1,79	2,07

XIV. ВЪТРЕШЕН КАЧЕСТВЕН КОНТРОЛ

- Ако резултатите, получени за Контрола 1 и/или Контрола 2 не са в рамките на нивото, указано на етикета на флакона, то резултатите не могат да бъдат използвани, освен ако не се предостави задоволително обяснение на това несъответствие.
- По желание, всяка лаборатория може да си направи собствен комплект от контролни преби, които трябва да се съхраняват замразени в кратни съотношения.
- Критериите за приемане на разликата от двойните резултати на пробите трябва да се опират на Добрата Лабораторна Практика.

XV. РЕФЕРЕНТНИ ИНТЕРВАЛИ

Стойностите, показани по-долу, са предоставени само за напътствие; всяка лаборатория трябва да установи свои собствен нормален обхват на стойности.

В група от 79 нормални субекта изчислената средна стойност на концентрацията на човешки С-пептид бе 1.02 pmol/ml (а диапазонът - от 2.5% до 97.5%: 0.59 - 1.56 pmol/ml).

XII. ХАРАКТЕРНИ ДАННИ

Данните, изложени по-долу са само за илюстрация и никога не бива да се използват вместо истинската калибрационна крива.

С-пептид	сrm	B/B ₀ (%)
Общ брой	75295	
Калибратор	0,0 pmol/ml	100,0
	0,09 pmol/ml	80,9
	0,29 pmol/ml	65,7
	0,95 pmol/ml	36,9
	2,98 pmol/ml	19,0
	9,94 pmol/ml	7,8

XIII. ИЗПЪЛНЕНИЕ И ОГРАНИЧЕНИЯ

A. Определен лимит

Двадесет нулеви калибратора са били изпитани заедно с комплект от други калибратори. Определения лимит, дефиниран като явната концентрация на две стандартни отклонения над средния брой при нулево свързване, е бил 0,04 pmol/ml.

B. Специфичност

Процентът на кръстосана реакция, преценен чрез сравняване с концентрацията при 50% потискане, е съответно:

Съединение	Кръстосана реактивност (%)
Биосинтетичен човешки проинсулин	5,6%
Човешки глюкагон	-
Човешки инсулин	-

G. Прецизност

ПО ВРЕМЕ НА ИЗПИТВАНЕТО			МЕЖДУ ИЗПИТВАНЕТО					
Серум	N	$\bar{x} \pm SD$ (pmol/ml)	CV (%)	Серум	N	$\bar{x} \pm SD$ (pmol/ml)	CV (%)	
A	24	0.28 ± 0.03	10.7	A	21	0.28 ± 0.03	10.7	
B	26	1.21 ± 0.04	3.3	B	21	1.12 ± 0.11	9.8	
C	24	0.18 ± 0.01	5.6	C	22	0.17 ± 0.02	11.8	
D	24	0.68 ± 0.04	5.9	D	22	0.65 ± 0.05	7.7	
E	24	1.60 ± 0.11	6.9	E	22	1.68 ± 0.12	7.1	

SD : Стандартно отклонение; CV: Коефициент на вариация

XVI. ПРЕДПАЗНИ МЕРКИ И ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ

Безопасност

Само за *in vitro* диагностика.

Този набор съдържа ^{125}I (полуживот: 60 дни), еmitиращ йонизиращи X (28 keV) и γ (35.5 keV) лъчения.

Този радиоактивен продукт може да се пренася и да се използва само от оторизирани лица; покупката, съхранението, употребата и размяната на радиоактивни продукти са предмет на законодателството на държавата, на крайния потребител. Този продукт не бива в никакъв случай да се прилага на хора или животни.

Боравенето с радиоактивния продукт трябва да се извършва в определена за целта територия, далеч от регуляри зони на преминаване. В лабораторията

трябва да се поддържа дневник за получаването и съхранението на радиоактивни материали. Лабораторната екипировка и стъклария, които могат да бъдат контаминирани с радиоактивни субстанции, трябва да бъдат отделени с цел да се избегне кръстосана контаминация с различни радиоизотопи.

Всякакви радиоактивни пръски трябва да се почистват незабавно в съответствие с процедурите за радиационна безопасност. Радиоактивните отпадъци трябва да се изхвърлят, следвайки местните наредби и ръководства на властите, упражняващи юрисдикцията, над лабораториите. Придържането към основните правила за радиационна безопасност осигуряват адекватна защита.

Човешките кръвни компоненти, включени в кита, са били тествани чрез одобрени от Европейски и/или FDA (Американска агенция по храните и лекарствата) методи и са дали отрицателен резултат за HbsAg, анти-HCV, анти-HIV-1 и 2. Няма известен метод, който да дава пълна гаранция за това, че човешките кръвни деривати не пренасят хепатит, СПИН или други инфекции. Ето защо, боравенето със реагентите, серумните или плазмените преби трябва да бъде в съответствие с местните процедури по безопасност.

Всички животински продукти и деривати са били събиращи от здрави животни. Волските компоненти са с произход от страни, където BSE (волска серумна енцефалопатия) не е била установявана. Независимо от това, компонентите, съдържащи животински субстанции трябва да се третират като потенциално инфекционни.

Избягайте какъвто и да било кожен контакт с реагентите (съдържат натриев азид като консервант). Азидът в този кит може да реагира с оловото и медта във водопроводните инсталации като по този начин се получават силно експлозивни метални азиди. По време на измивния етап, промийте със силна и обилна струя вода канализацията, за да избегнете формирането на азиди.

Не пушете, не пийте, не яжте и не си слагайте козметика в работната територия. Не пипетирайте с уста. Използвайте защитно облекло и ръкавици за еднократна употреба.

XVII. ОБОБЩЕНИЕ НА ПРОТОКОЛА

ОБЩА АКТИВНОСТ μl	КАЛИБРАТОРИ μl	ПРОБА(И) КОНТРОЛИ μl
Калибратори (0-5)	-	100
Проби, контроли	-	100
Трейсър	50	50
Инкубация	3 часа при стайна температура	
Сепарация	-	аспирirайте (или прелейте)
Измиващ разтвор	-	3.0 ml
Сепарация	-	аспирirайте (или прелейте)
Броене	Отчетете епруветките за 60 секунди	

DIAsource каталог номер: KIP0409 - KIP0408	P.I. номер: 1700444/bu	Номер на ревизия: 110218/1
---	---------------------------	-------------------------------

Дата на ревизия: 2011-02-18

1. BEISCHER, W. et al. (1976). **Human C-Peptide. Part I Radioimmunoassay.** Klin. Wschr. 54, 709.
2. BEISCHER, W. et al. (1976). **Human C-Peptide. Part II: Clinical studies.** Klin. Wschr. 54, 717.
3. BLIX, P.M. et al. (1982). **Urinary C-Peptide: an indicator of β-cell secretion under different metabolic conditions.** J. Clin. Endocrinol. Metab., 54/3, 574.
4. BONSER, A et al. (1984). **C-Peptide measurement: method and clinical utility.** CRC Critical Review in Clinical Laboratory Sciences, 19 297.
5. HORWITZ, D.L. et al. (1975). **Proinsulin, insulin and C-Peptide concentrations in human portal and peripheral blood.** J. Clin. Invest., 55, 1278.
6. RENDELL, M. (1983). **C-Peptide levels as a criterion in treatment of maturity onset diabetes.** J. Clin. Endocrinol. Metab., 57/6, 1198.
7. RUBENSTEIN, A.H. et al. (1977). **Clinical significance of circulating proinsulin and C-Peptide.** Rec. Prog. Horm. Res., 33, 435.
8. TROPEANO, G. et al. (1994). **Insulin, C-Peptide, androgens, and beta endorphin response to oral glucose in patients with polycystic ovary syndrome.** J. Clin. Endocrinol. Metab., 78/2, 305-9.
9. CONGEL, I. et al. (1993). **Effect of hyperlipidemia on plasma C-Peptide concentration during euglycemic hyperinsulinemic clamp.** Diabetes Res., 22/1, 41-8.
10. KREW, M.A. et al. (1994). **Relation of amniotic fluid C-Peptide levels to neonatal body composition.** Obstet. Gynecol., 84/1, 96-100.



da

Læs hele protokollen før brug

C-PEP II-RIA-CT

I. ANVENDELSESFORMÅL

Radioimmunoanalyse til *in vitro* kvantitativ måling af human C-peptid i serum.

II. GENERELLE INFORMATIONER

- A. **Indregistreret navn:** DIAsource C-PEP II-RIA-CT kit
- B. **Katalog nr.:** KIP0409 : 96 test
KIP0408: 4 x 96 test
- C. **Fremstillet af:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgien.

For at få teknisk assistance eller bestillingsoplysninger, kontakt:
Tlf.: +32 (0)10 84.99.11 Fax: +32 (0)10 84.99.90

III. KLINISK BAGGRUND

A. Biologisk aktivitet

Insulin syntetiseres i beta-cellerne i Langerhans-øerne som et præcursorsmolekyle, proinsulin. I beta-cellernes sekretgranula klæber proinsulin til insulin og til en 31-aminosyrepeptid, der kaldes "Connecting Peptide" eller C-Peptid. Insulin og C-peptid afsondres i økvinde mængder. Da halveringstiden er længere, er C-peptids plasmakoncentration imidlertid højere end insulins. Bestemmelse af plasma i C-peptid gør det muligt at vurdere den endogene insulinproduktion, selv hvor der er samtidig eksogen insulinadministration, eller hvor der cirkulerer anti-insulin antistoffer. Desuden giver bestemmelsen af C-peptid i urin et pålideligt indeks for insulinproduktionen, når det er vanskeligt at tage blodprøver, eller når der anmodes om en integreret vurdering af udskillelsen af C-peptid for en periode på flere timer.

B. Kliniske anvendelsesformål

- . Vurdering af resterende beta-cellers funktion i diabetes, mens der behandles med insulin.
- . Registrering og overvågning af bedringsfasen ved diabetes af type I
- . Hjælpemiddel til differentialdiagnose mellem diabetes af type I (insulinafhængig) og type II (ikke insulinafhængig)
- . Diagnosticering af insulinfremkaldt falsk hypoglykæmi
- . Bidrag til diagnosen af insulinoma (test af insulin suppression)
- . Prognoseindeks af fosterresultat hos gravide kvinder med diabetes
- . Evaluering af insulinsekretion i forbindelse med leversygdom
- . Overvågning af pancreatektomi

IV. METODENS PRINCIPPER

En bunden mængde ^{125}I mærket Tyr-C-peptid konkurrerer med C-peptid om at blive målt som tilstedevarende i prøven eller i kalibratoren til et bundet antal antistofpunkter, der immobiliseres mod væggen i en polystyrentube. Der er hverken brug for ekstraktion eller kromatografi. Efter 3 timers inkubation ved stuetemperatur afslutter et aspirationstrin konkurrencereaktionen. Dernæst vaskes tuberne med 3 ml vaskeoplösning og aspireres igen. En kalibreringskurve indtages, og prøvernes koncentrationer af C-peptid bestemmes ved at interpolere dosis fra kalibreringskurven.

V. MEDFØLGENDE REAGENSER

Reagenser	96 testkit	4 x 96 testkit	Farve-kode	Rekonstituering
Tuber coated med anti C-peptid	2 x 48	8 x 48	appelsin	Klar til brug
Ag ^{125}I	1 hætteglas lyofiliseret 175 kBq	4 hætteglas lyofiliseret 4 x 175 kBq	rød	Tilsæt 6 ml destilleret vand
MARKØR: ^{125}I mærket Tyr-C-peptid (HPLC grad) i fosfatbuffer med bovin gelatine og azid (<0,1%)				
CAL 0	1 hætteglas lyofiliseret	2 hætteglas lyofiliseret	gul	Tilsæt 3 ml destilleret vand
Nukalibrator i human serum og thymol				
CAL N	5 hætteglas lyofiliseret	10 hætteglas lyofiliseret	gul	Tilsæt 1 ml destilleret vand
Kalibratorer - N = 1 til 5 (se de præcise værdier på hætteglassenes etiketter) i human serum og thymol				
WASH SOLN CONC	1 hætteglas 10 ml	4 hætteglas 10 ml	brun	Fortynd 70 x med destilleret vand (anvend magnetomrører).
Vaskeoplösning (TRIS-HCl)				
CONTROL N	2 hætteglas lyofiliseret	4 hætteglas lyofiliseret	sølv	Tilsæt 1 ml destilleret vand
Kontroller - N = 1 eller 2 i human serum med thymol				

Bemærk: 1. Benyt nukalibratoren til serumfortyndinger.
2. 1 ng klargjort kalibrator er lig med 1 ng NIBSC IRR
84/510

VI. FORSYNINGER DER IKKE LEVERES

Der er brug for nedenstående materialer, som ikke medfølger i kittet:

- Destilleret vand
- Pipetter til levering af: 50 μl , 100 μl og 1 ml (det anbefales at benytte nøjagtige pipetter med plasticspidser til engangsbrug)
- Tuber af polystyrene til engangsbrug (12 x 75 mm)
- Hvirvelmikser
- Magnetomrører
- 5 ml automatisk kanyle (af typen Cornwall) til vask
- Aspirationssystem (ekstra)
- Der kan anvendes enhver gammatæller, der kan måle ^{125}I (minimumsresultat 70%).

VII. KLARGØRING AF REAGENS

- A. Kalibratorer:** Gendan nukalibratoren med 3,0 ml destilleret vand og de andre kalibratorer med 1,0 ml destilleret vand.
- B. Kontroller:** Gendan kontrollerne med 1,0 ml destilleret vand.
- C. Markør:** Gendan markøren med 6,0 ml destilleret vand.
- D. Arbejdsvaskeoplösning:** Klargør en passende mængde arbejdsvaskeoplösning ved at tilsætte 69 x destilleret vandmængde til 1 mængde vaskeoplösning (70 x). Benyt en magnetomrører til at homogenisere. Kassér ubrugt vaskeoplösning, når dagen er omme.

VIII. REAGENSERS OPBEVARING OG UDLØBSDATO

- Før de åbnes eller gendannes er komponenterne i alle kit stabile indtil udløbsdatoen, som ses på etiketten, forudsat de opbevares ved 2 til 8°C.
- Efter rekonstituering skal markøren straks bruges eller opbevares ved -20°C indtil udløbsdatoen.
- Efter rekonstituering er kalibratorer og kontroller meget ustabile, og skal derfor bruges straks efter rekonstituering. Til længere opbevaringsperioder skal der laves aliquoter, som opbevares ved -20°C i højst 3 måneder. Undgå senere cyklusser med frysning og optøning.
- Nytilderedt arbejdsvaskeoplösning skal anvendes samme dag.
- Forandringer af reagensernes fysiske udseende kan være et tegn på manglende stabilitet eller nedbrydning.

IX. INDSAMLING OG KLARGØRING AF PRØVER

- Serumprøver skal opbevares ved 2-8°C.
- Hvis testen ikke køres inden for 8 timer, anbefales opbevaring i aliquoter ved -20°C.
- Undgå senere cyklusser med frysning og optøning.

X. PROCEDURE

A. Bemærkninger vedrørende håndtering

Kittet eller komponenterne må ikke anvendes efter udløbsdatoen. Bland aldrig materialer fra forskellige kitpartier. Sørg for at alle reagenser har fået stuetemperatur, før de tages i brug. Alle reagenser og prøver blandes grundigt ved hjælp af forsiktig omrøring eller hvirvel rundt. Benyt en ren pipettespids til engangsbrug til at tilsætte hver eneste forskellig reagens og prøve, så krydskontaminering undgås. Nøjagtigheden forbedres med meget præcise pipetter eller automatisk pipetteudstyr. Sørg for at overholde inkubationstiderne. Udarbejd en kalibreringskurve for hver kørsel. Data fra tidligere kørsler må ikke anvendes.

B. Procedure

- Sæt etikette på coatede duplikattuber til hver kalibrator, kontrol og prøve. Til bestemmelse at de totale tællinger sættes der etikette på 2 normale tuber.
- Kalibratorer, kontroller og prøver hvirvels rundt et kort øjeblik, og der dispenseres 100 μl af hver i de respektive tuber.
- Denne opgave skal gennemføres på mindre end 15 minutter.**
- Dispensér 50 μl ^{125}I mærket Tyr-C-peptid i hver tube, inklusive i de ikke-coatede tuber til totaltællinger.
- Ryst forsigtigt tuberækken manuelt, så eventuelle indfangede luftbobler frigøres.
- Inkuberes i 3 timer ved stuetemperatur.
- Aspirér (eller dekantér) hver tubes indhold (undtagen totaltællingerne). Se efter at aspiratorenets plasticspids når ned til bunden af den coatede tube, så al væske fjernes.
- Vask tuberne med 3 ml arbejdsvaskeoplösning (undtagen totaltællinger) og aspirér (eller dekantér). Undgå skumdannelse, mens der tilsættes arbejdsvaskeoplösning.
- Lad tuberne stå i opret stilling i 2 minutter, hvorefter de sidste dræber væske aspireres.
- Tæl tuberne i en gammatæller i 60 sekunder.

XI. BEREGNING AF RESULTATER

- Beregn duplikaternes gennemsnitlige bestemmelser.
- Beregn den bundne radioaktivitet som en procentdel af den binding, der fastsættes ved nukalibratorpunktet (0) ifølge nedenstående formel:
- Indtagn på et 3-cyklos halvlogaritmiske- eller "logit-log"-millimeterpapir værdierne (B/B0(%)) for hvert kalibratorpunkt som en funktion af hvert kalibratorpunktets koncentration af C-peptid. Afvis værdier, der ligger klart uden for det tilladte.
- Der kan også benyttes computerstøttede metoder til at konstruere kalibreringskurven. Hvis der benyttes automatisk resultatbearbejdning, anbefales en logistisk funktionskurvetilpasning med 4 parametre.
- Ved at interpolere prøvens (B/B0 (%)) værdier bestemmes prøvernes koncentration af C-peptid ud fra kalibreringskurven.
- Til hver analyse skal den procentdel af markør kontrolleres, der er bundet, hvor der ikke forefindes umarkeret C-peptid (B0/T).

$$B/B0 (\%) = \frac{\text{Tællinger (kalibrator el. prøve)}}{\text{Tællinger (nukalibrator)}} \times 100$$

XII. TYPISKE DATA

Nedenstående data er kun et eksempel og må aldrig benyttes i stedet for kalibreringskurven i realtid.

C-peptid	cpm	B/Bo (%)
Total tælling	75295	
Kalibrator		
0,0 pmol/ml	17690	100,0
0,09 pmol/ml	14319	80,9
0,29 pmol/ml	11618	65,7
0,95 pmol/ml	6534	36,9
2,98 pmol/ml	3361	19,0
9,94 pmol/ml	1379	7,8

XIII. PRÆSTATIONER OG BEGRÆNSNINGER

A. Registreringsgrænse

Der blev analyseret 20 nukalibratorer samtidig med et sæt andre kalibratorer. Registreringsgrænsen, der er defineret som den tydelige koncentration af 2 standardafvigelse under de gennemsnitlige tællinger ved nulbinding, var 0,04 pmol/ml.

B. Specificitet

Procentdelen af krydsreaktion, anslæt ved at sammenligne den koncentration, der gav et resultat på 50% inhibering, er henholdsvis:

Forbindelse	Krydsreakтивит (%)
Biosyntetisk human proinsulin	5,6
Human glukagon	-
Human insulin	-

C. Præcision

INTRAANALYSES PRÆCISION

INTERANALYSES PRÆCISION

Serum	N	$\bar{X} \pm SD$ (pmol/ml)	CV (%)	Serum	N	$\bar{X} \pm SD$ (pmol/ml)	CV (%)
A	24	0.28 ± 0.03	10.7	A	21	0.28 ± 0.03	10.7
B	26	1.21 ± 0.04	3.3	B	21	1.12 ± 0.11	9.8
C	24	0.18 ± 0.01	5.6	C	22	0.17 ± 0.02	11.8
D	24	0.68 ± 0.04	5.9	D	22	0.65 ± 0.05	7.7
E	24	1.60 ± 0.11	6.9	E	22	1.68 ± 0.12	7.1

SD: Standardafvigelse, CV: Variations koeficient

D. Nøjagtighed

FORTYNDINGSTEST

Prøve	Fortyndning	Teoretisk koncent. (pmol/ml)	Målt koncent. (pmol/ml)
Serum	1/1	-	6,99
	1/2	3,50	3,04
	1/4	1,75	1,56
	1/8	0,87	0,80
	1/16	0,44	0,46
	1/32	0,22	0,28
	1/64	0,11	0,07

Prøverne blev fortyndet med nukalibrator.

GENINDVINDINGSTEST

Prøve	Tilsat C-peptid (pmol/ml)	Genindvundet C-peptid (pmol/ml)	Genindvundet (%)
Serum	0.14	0.14	100
	0.17	0.19	112
	0.22	0.22	100
	0.39	0.44	113
	1.14	1.12	98
	3.14	3.02	96

Konverteringsfaktor:

Fra ng/ml til pmol/ml: : 3

- E. Tidsforsinkelsen mellem sidste kalibrator og prøvens dispensering.**
Som det ses herunder, skal prøvernes dispenseses inden for en forsinkelse på højst 15 minutter, efter kalibratoren er dispensedet.

TIDSFORSINKELSE

Serum pmol/ml	0'	5'	10'	15'	20'	30'
C1	0,66	0,53	0,55	0,61	0,52	0,41
C2	2,27	2,14	2,58	1,90	1,79	2,07

XIV. INTERN KVALITETSKONTROL

- Hvis de resultater, der fås for Kontrol 1 og/eller Kontrol 2 ikke ligger inden for det område, der er specificeret på hætteglassets etikette, så kan resultaterne ikke bruges, medmindre der er givet en tilfredsstillende forklaring på uoverensstemmelsen.
- Hvis det er bedst, kan hvert laboratorium lave sine egne puljer med kontrolprøver, som skal opbevares frosne i aliquoter.
- Kriterierne for accept af forskellen mellem prøvernes duplikatresultater skal hvile på god laboratoriepraksis.

XV. REFERENCEINTERVALLER

Disse værdier er kun anført som vejledende, og hvert laboratorium skal fastsætte sit eget normale værdiområde.

I en gruppe med 79 normale forsøgspersoner fandt man, at den gennemsnitlige humane koncentration af C-peptid var 1,02 pmol/ml (interval, baseret på 2,5% til 97,5% centiler: 0,59 - 1,56 pmol/ml).

XVI. FORHOLDSREGLER OG ADVARSLER

Sikkerhed

Kun til in vitro diagnosticering.

Dette kit indeholder ^{125}I (halveringstid: 60 dage), som udsender ioniserende røntgen – (28 keV) og gammastråler (35.5 keV).

Dette radioaktive produkt må kun overlades til og anvendes af autoriserede personer. Indkøb, opbevaring, brug og udveksling af radioaktive produkter henhører under lovgivningen i slutbrugerens land. Produktet må under ingen omstændigheder gives til mennesker eller dyr.

Al håndtering af radioaktive materialer skal udføres på et område, der er specielt afsat til det formål, væk fra regelmæssig gennemgang. Laboratoriet skal opbevare en logbog til modtagelseskritter og opbevaring af radioaktive materialer. Laboratorieudstyr og -glasartikler, som muligvis kontaminerer med radioaktive stoffer, skal holdes stortrækt adskilte, så krydkontaminering af forskellige radioisotoper forhindres.

Ethvert radioaktivt udslip skal straks renses op i henhold til procedurerne for strålingssikkerhed. Det radioaktive affald skal bortskaffes i henhold til de stedlige love og retningslinjer fra myndigheder med jurisdiktion over laboratoriet. Overholdelse af de grundlæggende regler for strålingssikkerhed yder tilstrækkelig beskyttelse.

De humane blodkomponenter, der findes i dette kit, er blevet testede ved hjælp af europæisk godkendte og/eller FDA-godkendte metoder og fundet negative over for HbsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 og 2. Der findes ingen kendte metoder, der kan give fuldstændig sikkerhed for at humane blodderivater ikke spredt hepatitis, AIDS eller andre infektioner. Derfor skal håndtering af reagenser, serum- eller plasmaprøver udføres i overensstemmelse med de stedlige sikkerhedsprocedurer.

Alle dyriske produkter og derivater er hentet fra sunde dyr. Bovine komponenter stammer fra lande, hvor BSE (kogalskab) ikke er blevet rapporteret. Ikke desto mindre skal komponenter, der indeholder dyriske stoffer, behandles som potentielt smittefarlige.

Reagenser må aldrig komme i kontakt med huden (de indeholder natriumazid som konserveringsmiddel). Azid i dette kit kan reagere sammen med bly og kobber i afløbsrør, hvorfed der dannes højeksplosive metalazider. I forbindelse med vaskestadiet skal afløbet skyldes med rigelige vandmængder, så opbygning af azider forhindres.

Man må ikke ryge, drikke, spise eller anvende kosmetik på arbejdsområdet. Der må ikke pipetteres med munden. Vær iført beskyttelsesdragt og -handsker til engangsbrug.

XVII. BIBLIOGRAFI

1. BEISCHER, W. et al. (1976). **Human C-Peptide. Part I Radioimmunoassay.** Klin. Wschr. 54, 709.
2. BEISCHER, W. et al. (1976). **Human C-Peptide. Part II: Clinical studies.** Klin. Wschr. 54, 717.
3. BLIX, P.M. et al. (1982). **Urinary C-Peptide: an indicator of β-cell secretion under different metabolic conditions.** J. Clin. Endocrinol. Metab., 54/3, 574.
4. BONSER, A et al. (1984). **C-Peptide measurement: method and clinical utility.** CRC Critical Reviewvs in Clinical Laboratory Sciences, 19 297.
5. HORWITZ, D.L. et al. (1975). **Proinsulin, insulin and C-Peptide concentrations in human portal and peripheral blood.** J. Clin. Invest., 55, 1278.
6. RENDELL, M. (1983). **C-Peptide levels as a criterion in treatment of maturity onset diabetes.** J. Clin. Endocrinol. Metab., 57/6, 1198.

7. RUBENSTEIN, A.H. et al. (1977). **Clinical significance of circulating proinsulin and C-Peptide.** Rec. Prog. Horm. Res., 33, 435.
8. TROPEANO, G. et al. (1994). **Insulin, C-Peptide, androgens, and beta endorphin response to oral glucose in patients with polycystic ovary syndrome.** J. Clin. Endocrinol. Metab., 78/2, 305-9.
9. CONGEL, I. et al. (1993). **Effect of hyperlipidemia on plasma C-Peptide concentration during euglycemic hyperinsulinemic clamp.** Diabetes Res., 22/1, 41-8.
10. KREW, M.A. et al. (1994). **Relation of amniotic fluid C-Peptide levels to neonatal body composition.** Obstet. Gynecol., 84/1, 96-100.

XVIII. OPSUMMERING AF PROTOKOLLEN

	TOTAL-TÆLLINGER µl	KALIBRATORER µl	PRØVE-KONTROL µl
Kalibratorer (0 til 5) Prøver, kontroller markør	- - 50	100 - 50	- 100 50
Inkubation	3 timer ved stuetemperatur		
Separation Arbejdsvaskopløsning Separation	-	Aspirér (eller dekanter) 3,0 ml Aspirér (eller dekanter)	
Tælling	Tællingstuber til 60 sekunder		

DIAsource katalog nr: KIP0409 – KIP0408	P.I. nummer: 1700444/da	Revision nr: 110218/1
--	----------------------------	--------------------------

Udstedelsesdato: 2011-02-18



pt

Leia todo o protocolo antes de utilizar.

C-PEP II-RIA-CT

I. UTILIZAÇÃO PREVISTA

Radioimunoensaio para a determinação quantitativa *in vitro* da proteína C no soro humano.

II. INFORMAÇÕES GERAIS

A. Nome do proprietário: DIAsource C-PEP II-RIA-CT Kit

B. Número do catálogo: KIP0409 : 96 testes
KIP0408: 4 x 96 testes

C. Produzido por: DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Bélgica.

Para obter informações sobre aquisição ou assistência técnica, contacte:

Tel : +32 (0)10 84.99.11 Fax : +32 (0)10 84.99.90

III. SIGNIFICADO CLÍNICO

A. Actividade Biológica

A insulina é sintetizada nas células beta das ilhotas de Langerhans como uma molécula precursora, a proinsulina. Nos grânulos secretórios das células beta, a proinsulina é clivada em insulina e no peptídeo aminoácido 31, também designado como Proteína Conectora ou Proteína C. A Insulina e a Proteína C são segregadas em quantidades equimolares. Contudo, devido a sua maior semi-vida, a concentração plasmática de proteína C é superior à da insulina.

A determinação da Proteína C plasmática permite uma avaliação da produção de insulina endógena, mesmo na presença de administração de insulina exógena ou na presença de anticorpos circulantes.

Além disso, a determinação da Proteína C na urina fornece um índice fiável de produção de insulina sempre que a análise sanguínea seja dificultada ou quando é solicitada uma estimativa integrada da secreção de Proteína C durante um período de várias horas.

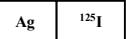
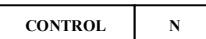
B. Aplicações clínicas

- Avaliação da função residual das células beta em diabéticos sujeitos a insulinoterapia
- Detecção e monitorização da fase de remissão da diabetes de tipo I
- Adjuvante no diagnóstico diferencial entre diabetes do tipo I (insulinodependente) e do tipo II (não insulinodependente)
- Diagnóstico de hipoglicémia factícia induzida por insulina.
- Contribuição para o diagnóstico do insulinoma (teste de supressão de insulina)
- Prognóstico do índice de outcome fetal em mulheres diabéticas grávidas
- Avaliação da secreção de insulina na doença hepática
- Monitorização da pancreatectomia

IV. PRINCÍPIO DO MÉTODO

Uma quantidade fixa de peptídeo C marcado com ^{125}I compete com o peptídeo C a ser medido, presente na amostra ou no calibrador, para uma quantidade fixa de locais de anticorpo, que é imobilizado nas paredes dos tubos de poliestireno. Nem a extração nem a cromatografia são necessárias. Após uma incubação de 3 horas à temperatura ambiente, a reacção de competição termina com a operação de aspiração. A seguir os tubos são lavados com 3ml de solução de lavagem de trabalho e novamente aspirados. Traça-se uma curva de calibração e as concentrações de peptídeo C nas amostras são determinadas por interpolação da dose a partir da curva de calibração.

V. REAGENTES FORNECIDOS

Reagentes	96 Testes Kit	4 x 96 Testes Kit	Código de cor	Reconstituição
Tubos revestidos com anti C peptide	2 x 48	8 x 48	cor-de-laranja	Pronto para utilizar
 Marcador: Peptídeo C marcado com ^{125}I (grau HPLC) em tampão fosfato com gelatina bovina e azida (<0,1%)	1 recipiente liofilizado 175 kBq	4 recipientes liofilizados 4 x 175 kBq	vermelho	Adicione 6 ml de água destilada
 Calibrador Zero em soro humano e timol	1 recipiente liofilizado	2 recipientes liofilizados	amarelo	Adicione 3 ml de água destilada
 Calibradores 1-5 em soro humano e timol (ver valores exactos nos rótulos dos recipiente)	5 recipientes liofilizados	10 recipientes liofilizados	amarelo	Adicione 1 ml de água destilada
 Solução de lavagem	1 recipiente 10 ml	4 recipientes 10 ml	castanho	Dilua 70 x com água destilada (use um agitador magnético).
 Controlos 1 e 2 em soro humano com timol	2 recipientes liofilizados	4 recipientes liofilizados	prateado	Adicione 1 ml de água destilada

Nota: 1. Utilize o Calibrador zero para diluições de amostras
2. 1 ng da preparação do calibrador equivale a 1 ng NIBSC IRR 84/510

VI. MATERIAL NÃO FORNECIDO

O seguinte material é necessário, mas não é fornecido com o kit:

- Água destilada
- Pipetas automáticas: 50 μl , 100 μl e 1 ml (recomenda-se a utilização de pipetas precisas, com pontas descartáveis)
- Misturador vortex
- Agitador magnético
- Tubos de poliestireno de utilização única (12 x 75 mm)
- Seringa automática de 5 ml (tipo Cornwall) para lavagem
- Dispositivo de aspiração e lavagem.
- Qualquer contador gama com capacidade para medir ^{125}I pode ser utilizado (alcance mínimo 70%)

VII. PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

- Calibradores:** Reconstitua o calibrador zero com 3 ml de água destilada e os outros calibradores com 1 ml de água destilada.
- Controlos:** Reconstitua os controlos com 1 ml de água destilada.
- Marcador:** Reconstitua com 6 ml de água destilada.
- Solução de Lavagem de Trabalho:** Prepare um volume adequado de Solução de Lavagem de Trabalho, adicionando 69 volumes de água destilada para 1 volume de solução de lavagem (70x). Use um agitador magnético para homogeneizar. Elimine a solução de lavagem não utilizada no final do dia.

VIII. ARMAZENAMENTO E PRAZO DE VALIDADE DOS REAGENTES

- Antes de serem abertos ou reconstituídos, todos os componentes dos kits são estáveis até ao final do prazo de validade, indicado no rótulo, desde que mantidos entre 2 a 8°C.
- Após a reconstituição, o marcador deve ser usado imediatamente ou armazenado a -20 °C, até a data de validade.
- Após a reconstituição, os calibradores e controlos são muito instáveis, usá-los imediatamente após a reconstituição. Para períodos de armazenamento mais prolongados, as alíquotas deverão ser preparadas e mantidas a temperaturas de -20°C por um período de tempo máximo de 3 meses. Evite ciclos de congelamento e descongelamento sucessivos
- A solução de lavagem de trabalho deve ser feita e utilizada no mesmo dia.
- As alterações na aparência física dos reagentes do kit podem indicar instabilidade ou degradação.

IX. RECOLHA E PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS

- Amostras de soro devem ser mantidas entre 2-8°C.
- Se a análise não for realizada em 8 h, é recomendado o seu armazenamento em alíquotas a uma temperatura de -20°C.
- Evite ciclos de congelamento e descongelamento sucessivos

X. PROCEDIMENTO

A. Notas de manipulação

Não utilize o kit ou qualquer componente depois da expiração do prazo de validade. Não misture componentes de diferentes lotes. Antes de utilizar todos os componentes devem estar à temperatura ambiente (TA). Misture bem os reagentes e as amostras, por agitação ou rotação suaves. Para evitar contaminações cruzadas, utilize uma ponta de pipeta limpa e descartável, para adição de cada componente. Pipetas de alta precisão ou equipamento automático de pipetagem melhoram a precisão. Respeite os períodos de incubação. Prepare uma curva de calibração para cada análise, não utilize dados de análises previas.

B. Procedimento

- Rotele os tubos revestidos em duplicado, para cada calibrador, amostra, controlo. Para a determinação das contagens totais, rotele 2 tubos normais.
- Agite ligeiramente no vortex calibradores, amostras e controlos e dispense 100 μl de cada, para os tubos respectivos.

Esta operação deverá ser concluída num prazo de 15 minutos.

- Dispense 50 μl de peptídeo C marcado com ^{125}I para cada tubo, incluindo os tubos normais para as contagens totais.
- Agite suavemente o suporte dos tubos, para libertar possíveis bolhas de ar.
- Incube durante 3 horas à temperatura ambiente.
- Aspire o conteúdo de cada tubo (excepto os das contagens totais). Assegure-se que a ponta plástica do aspirador atinge o fundo do tubo revestido, para remover todo o líquido.
- Lave os tubos com 3 ml de solução de lavagem de trabalho (excepto os das contagens totais) e aspire. Evite a formação de espuma quando adiciona a solução de lavagem.
- Depois da lavagem, deixe os tubos direitos durante 2 minutos e seguidamente aspire a última porção de líquido.
- Conte os tubos num contador gamma durante 60 segundos.

XI. CÁLCULO DOS RESULTADOS

- Calcule a média das determinações em duplicado.
- Calcule a radioactividade de ligação como uma percentagem da ligação determinada no ponto do calibrador zero (0), de acordo com a fórmula seguinte:

$$B/B_0(\%) = \frac{\text{Contagens (Calibrador ou amostra)}}{\text{Contagens (calibrador Zero)}} \times 100$$

- Utilizando um papel de gráfico semi-logarítmico de 3 ciclos ou logit-log, trace os valores ($B/B_0(\%)$) para cada ponto de calibragem como uma função da concentração peptídeo C em cada ponto, rejeitando os resultados aberrantes óbvios.
- Os métodos informáticos também podem ser utilizados para construir a curva de calibragem. Se o processamento dos resultados for automático, é recomendável um ajustamento de curvas de função logística de 4 parâmetros.
- Por interpolação dos valores das amostras ($B/B_0(\%)$), determine as concentrações de peptídeo C das amostras da curva de referência.
- Para cada análise, a percentagem de marcador total ligado na ausência de Peptídeo C(B_0/T) sem rótulo deve ser verificada.

2. BEISCHER, W. et al. (1976).
Human C-Peptide. Part II: Clinical studies.
Klin. Wschr. 54, 717.
3. BLIX, P.M. et al. (1982).
Urinary C-Peptide: an indicator of β-cell secretion under different metabolic conditions.
J. Clin. Endocrinol. Metab., 54/3, 574.
4. BONSER, A et al. (1984).
C-Peptide measurement: method and clinical utility.
CRC Critical Reviewvs in Clinical Laboratory Sciences, 19 297.
5. HORWITZ, D.L. et al. (1975).
Proinsulin, insulin and C-Peptide concentrations in human portal and peripheral blood.
J. Clin. Invest., 55, 1278.
6. RENDELL, M. (1983).
C-Peptide levels as a criterion in treatment of maturity onset diabetes.
J. Clin. Endocrinol. Metab., 57/6, 1198.
7. RUBENSTEIN, A.H. et al. (1977).
Clinical significance of circulating proinsulin and C-Peptide.
Rec. Prog. Horm. Res., 33, 435.
8. TROPEANO, G. et al. (1994).
Insulin, C-Peptide, androgens, and beta endorphin response to oral glucose in patients with polycystic ovary syndrome.
J. Clin. Endocrinol. Metab., 78/2, 305-9.
9. CONGEL, I. et al. (1993).
Effect of hyperlipidemia on plasma C-Peptide concentration during euglycemic hyperinsulinemic clamp.
Diabetes Res., 22/1, 41-8.
10. KREW, M.A. et al. (1994).
Relation of amniotic fluid C-Peptide levels to neonatal body composition.
Obstet. Gynecol., 84/1, 96-100.

XVIII. RESUMO DO PROTOCOLO

	CONTAGENS TOTAIS (μl)	CALIBRA- DORES (μl)	CONTROLO S DAS AMOSTRAS (μl)
Calibradores (0 to 5) Amostras, controlos Marcadores	- - 50	100 - 50	- 100 50
Incubação	3 horas a temperatura ambiente		
Separação Solução de lavagem de trabalho Separação	-	aspirar 3,0 ml aspirar	
Contagem	Contar os tubos durante 60 segundos		

Nº do catálogo DIAsource: KIP0409 – KIP0408	Nº de P.I: 1700444/pt	Nº de revisão: 110218/1
--	--------------------------	----------------------------

Data da revisão: 2011-02-18

CE

pl

Przed zastosowaniem należy przeczytać cały protokół.

C-PEP II-RIA-CT

I. PRZEZNACZENIE

Oznaczenie radioimmunoenzymatyczne do ilościowego pomiaru peptydu C, w surowicy ludzkiej metodą *in vitro*.

II. INFORMACJE OGÓLNE

A. Nazwa firmowa: DIAsource C-PEP II-RIA-CT

B. Numer katalogowy: KIP0409 : 96 oznaczeń
KIP0408: 4 x 96 oznaczeń

C. Wyprodukowano przez: DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgia.

Dział pomocy technicznej oraz informacje dotyczące zamówień:
Tel.: +32 (0)10 84.99.11 Fax: +32 (0)10 84.99.90

III. INFORMACJE KLINICZNE

A. Aktywność biologiczna

Insulina jest syntetyzowana w komórkach beta w wysepkach Langerhansa trzustki, w postaci cząsteczki prekursorowej, proinsuliny. W ziarnistościach wydzielniczych komórek beta, proinsulina jest przekształcana do insuliny i peptydu składającego się z 31 aminokwasów, zwanego peptydem C (ang. Connecting Peptide). Insulina i peptyd C są wydzielane w ilościach równomolarnych. Jednak, ze względu na dłuższy okres półtrwania, stężenie peptydu C w osoczu jest wyższe, niż insuliny.

Oznaczenie poziomu peptydu C w osoczu, umożliwia ocenę endogennej produkcji insuliny, nawet w obecności podawanej insuliny egzogennej lub przeciwciał antyinsulinowych we krwi krażącej.

Ponadto, oznaczenie peptydu C w moczu, pozwala na właściwą ocenę wytwarzania insuliny, gdy pobranie krwi obwodowej jest utrudnione lub wymagana jest całkowita ocena wydzielania peptydu C w okresie kilku godzin.

B. Zastosowania kliniczne

- . Ocena resztkowej czynności komórek beta trzustki u chorych na cukrzycę, leczonych insuliną
- . Wykrywanie i monitorowanie fazy remisji w cukrzycy typu 1
- . Wspomaganie diagnostyki różnicowej pomiędzy cukrzycą typu 1 (zależną od insuliny) a cukrzycą typu 2 (niezależną od insuliny)
- . Diagnostyka hipoglikemii poinsulinowej
- . Element diagnostyki wyspiaka (test hamowania insuliny)
- . Wskaźnik prognostyczny płodu u ciężarnych kobiet z cukrzycą
- . Ocena wydzielania insuliny w chorobach wątroby
- . Monitorowanie pankreatektomii

IV. ZAGADNIENIA DOTYCZĄCE METODY

Stała ilość peptydu Tyr-C znakowanego ^{125}I współzawodniczy z peptydem C, obecnym w badanej próbce lub w kalibratorze, o stałą ilość miejsc na przeciwiąłach, unieruchomionych na ściankach próbówki polistyrenowej. Nie jest wymagana ani ekstrakcja, ani chromatografia. Po trzygodzinnej inkubacji w temperaturze pokojowej, wykonanie aspiracji przerywa reakcję kompetencyjną. Następnie próbki są płukane przy pomocy 3 ml roztworu płuczącego i aspirowane. Wykreślana jest krzywa kalibracyjna a stężenia peptydu C w próbках są określone na podstawie nałożenia dawki na krzywą kalibracyjną.

V. ODCZYNNIKI DOSTARCZONE

Odczynniki	Zestaw 96 oznaczeń	Zestaw 4 x 96 oznaczeń	Kolor	Rekonstytucja
Probówki opłaszczone anty-C-Peptide	2 x 48	8 x 48	pomarańczowy	Gotowe do zastosowania.
ZNACZNIK IZOTOPOWY: Peptyd Tyr-C oznakowany jodem 125 (poziom HPLC) w buforze fosforanowym, zawierającym zelatynę bydlęcą i azydek (<0,1%).	Ag ^{125}I	1 fiolka materiał liofilizowany y 175 kBq	4 fiolek materiał liofilizowany y 4 x 175 kBq	czerwony Dodać 6 ml wody destylowanej
Kalibrator zerowy na bazie surowicy ludzkiej z tymolem.	CAL 0	1 fiolka materiał liofilizowany	2 fiolek materiał liofilizowany	żółty Dodać 3 ml wody destylowanej
Kalibrator - N = od 1 do 5 (dokładne wartości na etykietach fiolek) na bazie surowicy ludzkiej z tymolem.	CAL N	5 fiolek materiał liofilizowany	10 fiolek materiał liofilizowany	żółty Dodać 1 ml wody destylowanej
WASH SOLN CONC	1 fiolka 10 ml	4 fiolek 10 ml	brązowy	Rozcieńczyć 70x wodą destylowaną (wykorzystać mieszadło magnetyczne).
Roztwór płuczący (TRIS HCl)				
CONTROL N	2 fiolki materiał liofilizowany	4 fiolki materiał liofilizowany	srebrny	Dodać 1 ml wody destylowanej
Kontrole - N = od 1 do 2 w surowicy ludzkiej z tymolem				

Uwaga: 1. Do rozcieńczania próbek należy używać kalibratora zerowego.
2. 1 ng przygotowanego kalibratora jest równoważny 1 ng pierwszego IRR 84/510 - NIBSC.

VI. MATERIAŁY WYMAGANE, ALE NIEDOSTARCZONE

Poniższe materiały są wymagane, ale nie są dostarczone w zestawie:

- Woda destylowana
- Pipety do dozowania: 50 μl , 100 μl i 1 ml (zaleca się korzystanie z dokładnych pipet z jednorazowymi końcówkami plastikowymi)
- Jednorazowe próbówki polistyrenowe (12 x 75 mm)
- Miesiądz wirowe
- Miesiądz magnetyczne
- Strzykawka automatyczna o objętości 5 ml (rodzaj Cornwall) do płukania
- Układ do aspiracji (opcjonalnie)
- Może być wykorzystywany jakikolwiek licznik gamma, odpowiedni do pomiaru ^{125}I (minimalny uzysk 70%)

VII. PRZYGOTOWANIE ODCZYNNIKÓW

- Kalibrator:** Rekonstytuować kalibrator zerowy przy pomocy 3 ml wody destylowanej a inne kalibratorzy przy pomocy 1 ml wody destylowanej.
- Kontrole:** Kontrole należy rekonstytuować przy pomocy 1 ml wody destylowanej.
- Znacznik izotopowy:** Rekonstytuować znacznik przy pomocy 6 ml wody destylowanej.

Roboczy roztwór płuczący: Właściwą objętość roboczego roztworu płuczącego należy przygotować dodając 69 objętości wody destylowanej do 1 objętości roztworu płuczącego (70x). Do homogenizacji należy wykorzystać mieszadło magnetyczne. Niewykorzystany roboczy roztwór płuczący należy wylać pod koniec dnia.

VIII. PRZECHOWYWANIE I DATA WAŻNOŚCI ODCZYNNIKÓW

- Przed otwarciem lub rekonstytucją wszystkie składniki zestawu zachowują trwałość do daty ważności przedstawionej na etykiecie, jeżeli są przechowywane w temperaturze od 2 do 8°C.
- Po rekonstytucji, znacznik musi być natychmiast wykorzystany lub może być przechowywany w temperaturze -20°C do upływu daty ważności.
- Po rekonstytucji, kalibratorzy i kontrole są bardzo niestabilne i należy je natychmiast wykorzystać. W razie konieczności przechowywania przez dłuższy okres czasu, należy przygotować niewielkie objętości kontroli, co pozwala przechowywać je w temperaturze -20 °C przez 3 miesiące. Unikać powtarzanych cykli zamrażania-odmrażania.
- Świeżo przygotowany roboczy roztwór płuczący powinien być wykorzystany w tym samym dniu.
- Zmiany w wyglądzie fizycznym odczynników w zestawie mogą wskazywać na ich niestabilność lub zużycie.

IX. POBIERANIE I PRZYGOTOWANIE MATERIAŁU DO BADANIA

- Próbki surowicy muszą być przechowywane w temperaturze 2-8°C.
- Jeżeli oznaczenie nie jest wykonywane w ciągu 8 godzin, zaleca się przechowywanie w małych objętościach w temperaturze -20°C.
- Należy unikać powtarzanych cykli zamrażania-odmrażania.

X. PROCEDURA

A. Uwagi dotyczące obsługi

Nie wolno wykorzystywać składników zestawu po upływie podanej daty ważności.
Nie wolno mieszać materiałów pochodzących z różnych serii zestawów. Przed wykorzystaniem wszystkie odczynniki powinny osiągnąć temperaturę pokojową.
Wszystkie odczynniki i próbki należy dokładnie wymieszać przez delikatne potrząsanie lub obracanie.
Aby uniknąć zanieczyszczenia krzyżowego, do dodawania poszczególnych odczynników i próbek należy wykorzystywać czyste końcówki jednorazowe pipet. Pipety wysokiej precyzji lub pipety automatyczne poprawią precyzję wykonania oznaczenia.
Należy przestrzegać czasów inkubacji.
Przygotować krzywą kalibracyjną dla każdego cyklu pomiarowego; nie wolno wykorzystywać danych z poprzednich oznaczeń.

B. Procedura

- Dla każdego kalibratora, próbki i kontroli, należy oznaczyć opłaszczone próbówki w badaniach podwójnych. W celu określenia całkowitych zliczeń, należy oznaczyć 2 standardowe próbówki.
- Należy szybko wymieszać, wirując: kalibratorzy, próbki i kontrole, i dozować po 100 μl każdej substancji do odpowiednich próbówek.
- To działanie musi być wykonane w ciągu 15 minut.**
- Do każdej próbówki, w tym do próbówek nieopłaszczonych do całkowitego zliczania, należy dodać po 50 μl peptydu Tyr-C, oznakowanego jodem125.
- Należy delikatnie potrząsnąć statywem, w celu uwolnienia uwięzionych pęcherzyków powietrza.
- Należy inkubować przez 3 godziny w temperaturze pokojowej.
- Należy aspirować (lub odcalać) zawartość każdej próbówki (z wyjątkiem próbówek do całkowitego zliczania). Aby usunąć cały płyn, należy upewnić się, że plastikowa końcówka aspiratora osiągnęła dno opłaszczonej próbówki.
- Przy pomocy 3 ml roboczego roztworu płuczącego (z wyjątkiem próbówek do całkowitego zliczania), należy przepłukać próbówki i aspirować zawartość (lub odcalać ją). W trakcie dodawania roboczego roztworu płuczącego, należy unikać wytwarzania piany.
- Probówki należy pozostawić na dwie minuty w pozycji stojącej do góry i aspirować pozostałe krople płynu.
- Probówki należy zliczać w liczniku gamma przez 60 sekund.

XI. OBLICZANIE WYNIKÓW

- Należy obliczyć średnią oznaczeń podwójnych.
- Należy bliczyć związaną radioaktywność jako odsetek wiążania określonego w zerowym punkcie kalibracji (0), zgodnie z poniższym wzorem:

$$B/B_0(\%) = \frac{\text{Liczba zliczeń (dla kalibratora lub próbki)}}{\text{Liczba zliczeń (dla kalibratora zerowego)}} \times 100$$

- Na 3 arkuszach półlogarytmicznych lub papierze milimetrowym, należy wykreślić wartości (B/B₀(%)) dla każdego punktu kalibratora, jako funkcję stężenia peptydu C każdego punktu kalibratora. Należy odrzucić oczywiste wartości graniczne.
- Do opracowania krzywej kalibracyjnej mogą być wykorzystane również metody wspomagania komputerowego. Jeżeli ma być zastosowane automatyczne przetwarzanie wyników, zaleca się dopasowanie krzywej logistycznej 4 parametrowej.
- Nakładając wartości (B/B₀(%)) próbki, należy określić stężenia peptydu C w próbках z krzywej kalibracyjnej.
- Dla każdego oznaczenia należy sprawdzić odsetek całkowitego związanego znacznika izotopowego, przy braku nieoznakanego peptydu C (B₀/T).

XII. PRZYKŁAD DANYCH TYPOWYCH

Poniższe dane są przedstawione wyłącznie w celach przykładowych i nie powinny być nigdy stosowane zamiast rzeczywistych krzywych kalibracyjnych.

Peptyd C	cpm	B/Bo (%)
Zliczanie całkowite	75295	
Kalibrator		
0,0 pmol/ml	17690	100,0
0,09 pmol/ml	14319	80,9
0,29 pmol/ml	11618	65,7
0,95 pmol/ml	6534	36,9
2,98 pmol/ml	3361	19,0
9,94 pmol/ml	1379	7,8

XIII. DZIAŁANIE I OGRANICZENIA

A. Granica wykrywania

Dwadzieścia kalibratorów zerowych oznaczano wraz z zestawem innych kalibratorów.

Granica wykrywania, zdefiniowana jako odmienne stężenie dwóch odchyleń standardowych poniżej przeciętnej wartości zliczania, przy wiążaniu zerowym, kształtała się na poziomie 0,04 pmol/ml.

B. Swoistość

Odsetek reaktywności krzyżowej, oceniany przez porównanie stężenia prowadzącego do 50% zahamowania, przedstawia się następująco:

Związek	Reaktywność krzyżowa (%)
Syntetyzowana proinsulina ludzka	5,6%
Glukagon ludzki	-
Insulina ludzka	-

C. Precyza

PRECYZJA W SERII

PRECYZJA MIĘDZY SERIAMI

Surowica	N	$\langle X \rangle \pm SD$ (pmol/ml)	CV (%)	Surowica	N	$\langle X \rangle \pm SD$ (pmol/ml)	CV (%)
A	24	0.28 ± 0.03	10.7	A	21	0.28 ± 0.03	10.7
B	26	1.21 ± 0.04	3.3	B	21	1.12 ± 0.11	9.8
C	24	0.18 ± 0.01	5.6	C	22	0.17 ± 0.02	11.8
D	24	0.68 ± 0.04	5.9	D	22	0.65 ± 0.05	7.7
E	24	1.60 ± 0.11	6.9	E	22	1.68 ± 0.12	7.1

SD: Odchylenie standardowe; CV: Współczynnik zmienności

D. Dokładność

BADANIE ROZCIEŃCZENIA

Próbka	Rozcieńczenie	Stęž. teoretyczne (pmol/ml)	Stęž. zmierzona (pmol/ml)
Surowica	1/1	-	6,99
	1/2	3,50	3,04
	1/4	1,75	1,56
	1/8	0,87	0,80
	1/16	0,44	0,46
	1/32	0,22	0,28
	1/64	0,11	0,07

Próbki zostały rozcieńczone przy pomocy kalibratora zerowego.

BADANIE ODZYSKU

Próbka	dodano peptyd C (pmol/ml)	Odzyskany peptyd C (pmol/ml)	Odzysk (%)
Surowica	0,14	0,14	100
	0,17	0,19	112
	0,22	0,22	100
	0,39	0,44	113
	1,14	1,12	98
	3,14	3,02	96

Współczynnik konwersji:

Z ng/ml na pmol/ml : : 3

E. Opóźnienie pomiędzy oznaczeniem ostatniego kalibratora i dozowaniem próbki

Jak dalej przedstawiono, dozowanie próbek musi być wykonane w ciągu maksymalnie 15 minut po dozowaniu kalibratora.

OPÓŹNIENIE CZASOWE

Surowica pmol/ml	0'	5'	10'	15'	20'	30'
C1	0,66	0,53	0,55	0,61	0,52	0,41
C2	2,27	2,14	2,58	1,90	1,79	2,07

XIV. WEWNĘTRZNA KONTROLA JAKOŚCI

- Jeżeli wyniki uzyskane dla kontroli 1 i 2 nie znajdują się w zakresie określonym na etykiecie fiolki, wyniki nie mogą zostać wykorzystane, dopóki nie uda się znaleźć właściwego wyjaśnienia tego odchylenia.
- Jeżeli to konieczne, każde laboratorium może wykonać własne próbki zbiorcze w celach kontrolnych, które powinny być zamrożone w małych objętościach.
- Dopuszczalne kryteria, dotyczące różnicy pomiędzy wynikami oznaczeń podwójnych próbek, powinny być zgodne z zasadami prawidłowej pracy w laboratorium.

XV. ZAKRESY REFERENCYJNE

Wartości są przedstawione wyłącznie w celach orientacyjnych, każde laboratorium powinno opracować własne wartości referencyjne.

W grupie 79 zdrowych osób, średnie stężenie ludzkiego peptydu C wynosiło 1,02 pmol/ml (zakres od 2,5% do 97,2% percentyla: 0,59 – 1,56 pmol/ml).

XVI. ŚRODKI OSTROŻNOŚCI I OSTRZEŻENIA

Bezppieczeństwo

Tylko do diagnostyki *in vitro*.

Zestaw zawiera ¹²⁵I (Okres połowicznego rozpadu: 60 dni), emitujący promieniowanie jonizujące X (28 keV) i γ (35.5 keV).

Ten produkt radioaktywny może być transportowany i wykorzystany wyłącznie przez osoby autoryzowane; zakup, przechowywanie, stosowanie i wymiana produktów radioaktywnych podlega regulacjom prawnym kraju użytkownika końcowego. W żadnym wypadku produkt nie może być podawany ludziom lub zwierzętom.

Obsługa materiałów radioaktywnych powinna być przeprowadzana w miejscach do tego przeznaczonych, z dala od miejsc ogólnej użyteczności. W laboratorium musi być przechowywany rejestr przyjęć i przechowywania materiałów radioaktywnych. Wyposażenie laboratorium oraz szkło, które może być skażone

substancjami radioaktywnymi, powinno być oddzielone, w celu uniknięcia krzyżowego zanieczyszczenia różnych radioizotopów. Wszelkie plamy z substancji radioaktywnych muszą być natychmiast oczyszczane, zgodnie z procedurami dotyczącymi bezpieczeństwa radiologicznego. Odpady radioaktywne muszą być usuwane zgodnie z miejscowymi przepisami i ogólnie przyjętymi wytycznymi obowiązującymi w laboratorium. Przestrzeganie podstawowych zasad bezpieczeństwa radiologicznego zapewnia wystarczające zabezpieczenie.

Składniki zawierające ludzką krew, dostarczone w zestawie, zostały przebadane metodami zaaprobowanymi przez instytucje europejskie i/lub FDA. Stwierdzono, że nie zawierają one HbsAg, przeciwiał anty-HCV, anty-HIV-1 i 2. Żadna ze znanych metod nie może dać całkowitej pewności, że materiały pochodzenia ludzkiego nie przeniosą czynników zakaźnych wirusowego zapalenia wątroby, AIDS i innych. Dlatego, postępowanie z odczynnikami i próbками surowicy lub osocza, powinno być zgodne z miejscowymi procedurami dotyczącymi bezpieczeństwa.

Produkty pochodzenia zwierzęcego były pobierane od zdrowych zwierząt. Składniki bydlęce pochodzą z krajów, w których nie odnotowano występowania BSE. Pomimo to, składniki zawierające substancje pochodzenia zwierzęcego powinny być traktowane jako potencjalnie zakaźne.

Należy unikać kontaktu skóry z odczynnikami (zawierającymi azydek sodowy jako środek konserwujący). Azydek znajdujący się w zestawie, może reagować z międżą i ołowiem w układzie kanalizacyjnym, tworząc związki o właściwościach wybuchowych. W czasie płukania odprowadzany płyn należy płukać dużymi objętościami wody, aby zapobiec kumulacji azydków.

Nie wolno palić, spożywać napojów ani pokarmów bądź używać kosmetyków w miejscu pracy. Nie pipetować ustami. Zakładać ubranie ochronne i rękawiczki jednorazowe.

XVII. BIBLIOGRAFIA

1. BEISCHER, W. et al. (1976). **Human C-Peptide. Part I Radioimmunoassay.** Klin. Wschr. 54, 709.
2. BEISCHER, W. et al. (1976). **Human C-Peptide. Part II: Clinical studies.** Klin. Wschr. 54, 717.
3. BLIX, P.M. et al. (1982). **Urinary C-Peptide: an indicator of β-cell secretion under different metabolic conditions.** J. Clin. Endocrinol. Metab., 54/3, 574.
4. BONSER, A et al. (1984). **C-Peptide measurement: method and clinical utility.** CRC Critical Review in Clinical Laboratory Sciences, 19 297.
5. HORWITZ, D.L. et al. (1975). **Proinsulin, insulin and C-Peptide concentrations in human portal and peripheral blood.** J. Clin. Invest., 55, 1278.
6. RENDELL, M. (1983). **C-Peptide levels as a criterion in treatment of maturity onset diabetes.** J. Clin. Endocrinol. Metab., 57/6, 1198.
7. RUBENSTEIN, A.H. et al. (1977). **Clinical significance of circulating proinsulin and C-Peptide.** Rec. Prog. Horm. Res., 33, 435.
8. TROPEANO, G. et al. (1994). **Insulin, C-Peptide, androgens, and beta endorphin response to oral glucose in patients with polycystic ovary syndrome.** J. Clin. Endocrinol. Metab., 78/2, 305-9.
9. CONGEL, I. et al. (1993). **Effect of hyperlipidemia on plasma C-Peptide concentration during euglycemic hyperinsulinemic clamp.** Diabetes Res., 22/1, 41-8.

10. KREW, M.A. et al. (1994). **Relation of amniotic fluid C-Peptide levels to neonatal body composition.** Obstet. Gynecol., 84/1, 96-100.

XVIII. PODSUMOWANIE PROTOKOLU

	CALKOWITA LICZBA ZLICZEŃ µl	KALIBRATORY µl	PRÓBKИ KONTROLE µl
Kalibratory (0 - 5) Próbki, kontrole Znacznik izotopowy	- - 50	100 - 50	- 100 50
Inkubacja	3 godziny w temperaturze pokojowej		
Rozdzielenie Roboczy roztwór pluczący Rozdzielenie	- - -	Aspiracja (lub odlewanie) 3,0 ml Aspiracja (lub odlewanie)	
Zliczanie	Zliczanie próbówek przez 60 sekund		

Nr katalogowy DIAsource KIP0409-KIP0408	Numer P.I. 1700444/pl	Nr aktualizacji : 110218/1
--	--------------------------	-------------------------------

Data wydania : 2011-02-18

		<u>Used symbols</u>
		Consult instructions for use
		Storage temperature
		Use by
LOT		Batch code
REF		Catalogue number
CONTROL		Control
IVD		In vitro diagnostic medical device
		Manufacturer
		Contains sufficient for <n> tests
		Wash solution concentrated
		Zero calibrator
		Calibrator #
		Control #
		Tracer
		Tracer
		Tracer concentrated
		Tracer concentrated
		Tubes
		Incubation buffer
		Acetonitrile
		Serum
		Specimen diluent
		Dilution buffer
		Antiserum
		Immunoabsorbent
		Calibrator diluent
		Reconstitution solution
		Polyethylene glycol
		Extraction solution
		Elution solution
		Bond Elut Silica cartridges
		Pre-treatment solution
		Neutralization solution
		Tracer buffer
		Microtiterplate
		HRP Conjugate
		HRP Conjugate
		HRP Conjugate concentrate
		HRP Conjugate concentrate
		Conjugate buffer
		Chromogenic TMB concentrate
		Chromogenic TMB solution
		Substrate buffer
		Stop solution
		Incubation serum
		Buffer
		AP Conjugate
		Substrate PNPP
		Biotin conjugate concentrate
		Avidine HRP concentrate
		Assay buffer
		Biotin conjugate
		Specific Antibody
		Streptavidin HRP concentrate
		Non-specific binding
		2nd Antibody
		Acidification Buffer
		Distributor

		<u>Symboles utilisés</u>
		Consulter les instructions d'utilisation
		Température de conservation
		Utiliser jusque
LOT		Numéro de lot
REF		Référence de catalogue
CONTROL		Contrôle
IVD		Dispositif médical de diagnostic in vitro
		Fabricant
		Contenu suffisant pour <n> tests
		Solution de lavage concentrée
		Calibrateur zéro
		Calibrateur #
		Contrôle #
		Traceur
		Traceur
		Traceur concentré
		Traceur concentré
		Tubes
		Tampon d'incubation
		Acétonitrile
		Sérum
		Diluant du spécimen
		Tampon de dilution
		Antisérum
		Immunoadsorbant
		Diluant de calibrateur
		Solution de reconstitution
		Glycol Polyéthylène
		Solution d'extraction
		Solution d'elution
		Cartouches Bond Elut Silica
		Solution de pré-traitement
		Solution de neutralisation
		Tampon traceur
		Microplaquette de titration
		HRP Conjugué
		HRP Conjugué
		HRP Conjugué concentré
		HRP Conjugué concentré
		Tampon conjugué
		Chromogène TMB concentré
		Solution chromogène TMB
		Tampon substrat
		Solution d'arrêt
		Sérum d'incubation
		Tampon
		AP Conjugué
		Tampon PNPP
		Biotine conjugué concentré
		Avidine HRP concentré
		Tampon de test
		Biotine conjugué
		Anticorps spécifique
		Concentré streptavidine HRP
		Liant non spécifique
		Second anticorps
		Tampon d'acidification

		<u>Gebrauchte Symbolen</u>
		Gebrauchsanweisung beachten
		Lagern bei
		Verwendbar bis
LOT		Chargenbezeichnung
REF		Bestellnummer
CONTROL		Kontrolle
IVD		In Vitro Diagnostikum
		Hersteller
		Ausreichend für <n> Ansätze
	WASH	Waschlösung-Konzentrat
	CAL	Null kalibrator
	CAL	Kalibrator #
	CONTROL	Kontrolle #
	Ag	Tracer
	Ab	Tracer
	Ag	Tracer Konzentrat
	Ab	Tracer Konzentrat
		Röhrchen
	INC	Inkubationspuffer
		Azetonitril
		Humanserum
	DIL	Probenverdünner
	DIL	Verdünnungspuffer
		Antiserum
		Immunadsorbens
	DIL	Kalibratorverdünnung
	REC	Rekonstitutionslösung
		Polyethyenglykol
	EXTR	Extraktionslösung
	ELU	Eluierungslösung
		Bond Elut Silikakartuschen
	PRE	Vorbehandlungslösung
	NEUTR	Neutralisierungslösung
	TRACEUR	Tracer-Puffer
		Mikrotiterplatte
	Ab	HRP Konjugat
	Ag	HRP Konjugat
	Ab	HRP Konjugat Konzentrat
	Ag	HRP Konjugat Konzentrat
	CONJ	Konjugatpuffer
	CHROM	Chromogenes TMB Konzentrat
	TMB	Farblösung TMB
	SUB	Substratpuffer
	STOP	Stopplösung
	INC	Inkubationsserum
		Puffer
	Ab	AP Konjugat
	SUB	Substrat PNPP
	BIOT	Biotin-Konjugat-Konzentrat
	AVID	Avidin-HRP-Konzentrat
	ASS	Assaypuffer
	Ab	Biotin-Konjugat
	Ab	Spezifischer Antikörper
	SAV	HRP Streptavidinkonzentrat
	NSB	Unspezifische Bindung
	2nd Ab	Sekundärer Antikörper
	ACID	Ansäuerungspuffer

		<u>Gebruikte symbolen</u>
		Raadpleeg de gebruiksaanwijzing
		Bewaar temperatuur
		Houdbaar tot
LOT		Lotnummer
REF		Catalogusnummer
CONTROL		Controle
IVD		Medisch hulpmiddel voor in-vitro diagnostiek
		Fabrikant
		Inhoud voldoende voor <n> testen
	WASH	Wasoplossing, geconcentreerd
	CAL	Nulkalibrator
	CAL	Kalibrator #
	CONTROL	Controle #
	Ag	Tracer
	Ab	Tracer
	Ag	Tracer geconcentreerd
	Ab	Tracer geconcentreerd
		Buisjes
	INC	Incubatiebuffer
		Acetonitrile
		Serum
	DIL	Specimen diluent
	BUF	Verdunningsbuffer
		Antiserum
		Immunoabsorbent
	DIL	Kalibratorverdunner
	REC	Reconstitutieoplossing
		Polyethyleen glycol
	EXTR	Extractieoplossing
	ELU	Elutieoplossing
		Bond Elut Silica kolom
	PRE	Pre-behandelingsoplossing
	NEUTR	Neutralisatieoplossing
	BUF	Tracerbuffer
		Microtiterplaat
	Ab	HRP Conjugaat
	Ag	HRP Conjugaat
	Ab	HRP Conjugaat geconcentreerd
	Ag	HRP Conjugaat geconcentreerd
	CONJ	Conjugaat buffer
	CHROM	Chromogene TMB geconcentreerd
	TMB	Chromogene Oplossing TMB
	SUB	Substraatbuffer
	STOP	Stopoplossing
	SER	Incubatieserum
		Buffer
	Ab	AP Conjugaat
	SUB	Substraat PNPP
	BIOT	Geconcentreerd Biotine conjuagat
	AVID	Geconcentreerd Avidine-HRP conjuagat
	ASS	Assay buffer
	BIOT	Biotine conjuagat
	Ab	Specifiek antilichaam
	SAV	Streptavidine-HRP concentrat
	NSB	Aspecifieke binding
	2nd Ab	2de antilichaam
	ACID	Verzuringsbuffer

		<u>Símbolos utilizados</u>
		Consultar las instrucciones de uso
		LIMITACIÓN DE TEMPERATURA
		FECHA DE CADUCIDAD
LOT		Código de lote
REF		Número de catálogo
CONTROL		Control
IVD		Producto sanitario para diagnóstico in vitro
		Fabricante
		CONTENIDO SUFFICIENTE PARA <n> ensayos
		Solución de lavado concentrada
		Calibrador cero
		Calibrador #
		Control #
		Trazador
		Trazador
		Trazador concentrada
		Trazador concentrada
		Tubos
		Tampón de incubación
		Acetonitrilo
		Suero
		Diluyente de Muestra
		Tampón de dilución
		Antisuero
		Inmunoabsorbente
		Diluyente de calibrador
		Solución de Reconstitución
		Glicol Polietileno
		Solución de extracción
		Solución de elución
		Cartuchos Bond Elut Silica
		Solución de Pre-tratamiento
		Solución de Neutralización
		Tampón de trazador
		Placa de microvaloración
		HRP Conjugado
		HRP Conjugado
		HRP Conjugado concentrada
		HRP Conjugado concentrada
		Tampón de Conjugado
		Cromógena TMB concentrada
		Solución Cromógena TMB
		Tampón de sustrato
		Solución de Parada
		Suero de Incubación
		Tampón
		AP Conjugado
		Sustrato PNPP
		Concentrado de conjugado de biotina
		Concentrado avidina-HRP
		Tampón de ensayo
		Conjugado de biotina
		Anticuerpo específico
		Estreptavidina-HRP Concentrado
		Unión no específica
		Segundo anticuerpo
		Tampón de Acidificación

		<u>Simboli utilizzati</u>
		Consultare le istruzioni per l'uso
		Limitazioni di temperatura
		Utilizzare entro
LOT		Numero di lotto
REF		Numero di catalogo
CONTROL		Controllo
IVD		Dispositivo medico-diagnostico in vitro
		Fabbricante
		Contenuto sufficiente per <n> saggi
	WASH	Tampone di lavaggio concentrato
	CAL 0	Calibratore zero
	CAL N	Standard #
	CONTROL N	Controllo #
	Ag 125I	Marcato
	Ab 125I	Marcato
	Ag 125I CONC	Marcato concentrato
	Ab 125I CONC	Marcato concentrato
		Provette
	INC BUF	Tampone incubazione
		Acetonitrile
		Siero
	DIL SPE	Diluente campione
	DIL BUF	Tampone diluizione
		Antisiero
		Immunoassorbente
	DIL CAL	Diluente calibratore
	REC SOLN	Soluzione di ricostituzione
		Polietilenglicole
	EXTR SOLN	Soluzione di estrazione
	ELU SOLN	Soluzione di eluizione
		Cartucce di silice bond elut
	PRE SOLN	Soluzione di pretrattamento
	NEUTR SOLN	Soluzione di neutralizzazione
	TRACEUR BUF	Tracer Buffer
		Piastra di microtitolazione
	Ab HRP	HRP Coniugato
	Ag HRP	HRP Coniugato
	Ab HRP CONC	HRP Coniugato concentrato
	Ag HRP CONC	HRP Coniugato concentrato
	CONJ BUF	Buffer coniugato
	CHROM TMB CONC	Cromogena TMB concentrato
	CHROM TMB	Soluzione cromogena TMB
	SUB BUF	Tampone substrato
	STOP SOLN	Soluzione di arresto
	INC SER	Incubazione con siero
		Buffer
	Ab AP	AP Coniugato
	SUB PNPP	Substrato PNPP
	BIOT CONJ CONC	Concentrato coniugato con biotina
	AVID HRP CONC	Concentrato avidina HRP
	ASS BUF	Soluzione tampone per test
	Ab BIOT	Coniugato con biotina
	Ab	Anticorpo Specifico
	SAV HRP CONC	Streptavidina-HRP concentrata
	NSB	Legame non-specifico
	2nd Ab	2° Anticorpo
	ACID BUF	Tampone Acidificante

			<u>Επεξήγηση συμβόλων</u>
			Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης
			Θερμοκρασία αποθήκευσης
			Ημερομηνία λήξης
LOT			Αριθμός παρτίδας
REF			Αριθμός καταλόγου
CONTROL			Πρότυπο ελέγχου
IVD			In Vitro Διαγνωστικό Ιατροτεχνολογικό προϊόν
			Κατασκευαστής
			Περιεχόμενο επαρκές για «ν» εξετάσεις
	SOLN	CONC	Συμπυκνωμένο διάλυμα έκπλυσης
CAL	0		Μηδενικός βαθμονομητής
CAL	N		Βαθμονομητής #
CONTROL	N		Ορός ελέγχου #
Ag	125I		Ιχνηθέτης
Ab	125I		Ιχνηθέτης
Ag	125I	CONC	Χρωμογόνος Ιχνηθέτης
Ab	125I	CONC	Χρωμογόνος Ιχνηθέτης
			Σωληνάρια
INC	BUF		Ρυθμιστικό διάλυμα επώασης
ACETONITRILE			Ακετονιτρίλιο
SERUM			Ορός
DIL	SPE		Διάλυμα αραίωσης δειγμάτων
DIL	BUF		Ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης
ANTISERUM			Αντιορός
IMMUNOADSORBENT			Ανοσοπροσφρητικό
DIL	CAL		Αραιωτικό βαθμονομητών
REC	SOLN		Διάλυμα ανασύστασης
PEG			Πολυαιθυλενογλυκόλη
EXTR	SOLN		Διάλυμα εκχύλισης
ELU	SOLN		Διάλυμα έκλουσης
GEL			Φύσιγγες πυριτίου Bond Elut
PRE	SOLN		Διάλυμα προεπεξεργασίας
NEUTR	SOLN		Διάλυμα εξουδετέρωσης
TRACEUR	BUF		Ρυθμιστικό διάλυμα
			Πλάκα μικροτιτλοδότησης
Ab	HRP		HRP Σύζευγμα
Ag	HRP		HRP Σύζευγμα
Ab	HRP	CONC	Χρωμογόνος HRP Σύζευγμα
Ag	HRP	CONC	Χρωμογόνος HRP Σύζευγμα
CONJ	BUF		Ρυθμιστικό διάλυμα συζεύγματος
CHROM	TMB	CONC	Χρωμογόνος TMB
CHROM	TMB		Διάλυμα χρωμογόνου TMB
SUB	BUF		Ρυθμιστικό διάλυμα υποστρώματος
STOP	SOLN		Ανασχετικό αντιδραστήριο
INC	SER		Ορός επώασης
BUF			Ρυθμιστικό διάλυμα
Ab	AP		AP Σύζευγμα
SUB	PNPP		PNPP υποστρώματος
BIOT	CONJ	CONC	Συμπυκνωμένο αντιδραστήριο συζεύγμένο με βιοτίνη
AVID	HRP	CONC	Συμπυκνωμένο διάλυμα αβιδίνης-HRP
ASS	BUF		Ρυθμιστικό διάλυμα προσδιορισμού
Ab	BIOT		αντιδραστήριο συζεύγμένο με βιοτίνη
Ab			Ειδικό Αντίσωμα
SAV	HRP	CONC	Συμπυκνωμένη στρεπταβιδίνη συνεζευγμένη με HRP
NSB			μη-ειδική δέσμευση
2nd Ab			2o Αντίσωμα
ACID	BUF		Ρυθμιστικό Διάλυμα ζέινο

		<u>Използвани символи</u>
		Вижте инструкцията за работа
		Температура на съхранение
		Използвайте с
LOT		Партиден код
REF		Каталожен номер
CONTROL		Контрол
IVD		Ин витро диагностично медицинско изделие
		Производител
		Съдържание достатъчно за <n> теста
	WASH SOLN CONC	Концентриран измиващ разтвор
	CAL 0	Нулев калибратор
	CAL N	Калибратор #
	CONTROL N	Контрол #
	Ag 125I	Трейсър
	Ab 125I	Трейсър
	Ag 125I CONC	Концентриран маркер
	Ab 125I CONC	Концентриран маркер
		Епруетки
	INC BUF	Инкубационен буфер
	ACETONITRILE	Ацетонитрил
	SERUM	Серум
	DIL SPE	Разредител за пробите
	DIL BUF	Буфер за разреждане
	ANTISERUM	Антисерум
	IMMUNOADSORBENT	Имуноабсорбент
	DIL CAL	Разредител за калибратора
	REC SOLN	Пресъздаващ разтвор
	PEG	Полиетилен гликол
	EXTR SOLN	Екстрактов разтвор
	ELU SOLN	Разтвор за елюиране
	GEL	Силикагелни пълнители
	PRE SOLN	Пред-лечебен разтвор
	NEUTR SOLN	Неутрализиращ разтвор
	TRACEUR BUF	Маркерен буфер
	LL	Микротитърна пластина
	Ab HRP	HRP конюгат / Конюгат на хрянова пероксидаза
	Ag HRP	HRP конюгат / Конюгат на хрянова пероксидаза
	Ab HRP CONC	HRP конюгиран концентрат
	Ag HRP CONC	HRP конюгиран концентрат
	CONJ BUF	Буфер за конюгата
	CHROM TMB CONC	Хромогенен TMB концентрат
	CHROM TMB	Хромогенен TMB разтвор
	SUB BUF	Субстратен буфер
	STOP SOLN	Стоп разтвор
	INC SER	Инкубационен серум
	BUF	Буфер
	Ab AP	AP конюгат / конюгат на алкална фосфатаза
	SUB PNPP	Субстрат PNPP / пара нитрофенил фосфат
	BIOT CONJ CONC	Биотин конюгиран концентрат
	AVID HRP CONC	Авидин HRP концентрат
	ASS BUF	Буфер за пробите
	Ab BIOT	Биотин конюгат
		специфично антитяло
	SAV HRP CONC	стрептавидин HRP концентрат
	NSB	не специфично свързване
	2nd Ab	второ антитяло
	ACID BUF	киселинизиращ буфер

		<u>Anvendte symboler</u>
		Læs brugsvejledningen
		Opbevaringstemperatur
		Anvend inden
LOT		Batchkode
REF		Katalognummer
CONTROL		Kontrol
IVD		Medicinsk udstyr til in vitro-diagnosticering
		Fabrikant
		Indeholder nok til <n> test
		Koncentreret vaskeopløsning
		Nul-kalibrator
		Kalibrator nr.
		Kontrol nr.
		Markør
		Markør
		Koncentreret markør
		Koncentreret markør
		Tuber
		Inkubationsbuffer
		Acetonitril
		Serum
		Prøvediluent
		Fortyndingsbuffer
		Antiserum
		Immonoabsorbent
		Kalibratordiluent
		Rekonstitueringsopløsning
		Polyetylenglykol
		Ekstraktionsopløsning
		Elueringsopløsning
		Patroner med bindingselueringssilika
		Forbehandlingsopløsning
		Neutraliseringssopløsning
		Markørbuffer
		Mikrotiterplade
		HRP-konjugat
		HRP-konjugat
		HRP-konjugat-koncentreret
		HRP-konjugat-koncentreret
		Konjugatbuffer
		Kromogen TMB-koncentreret
		Kromogen TMB-opløsning
		Substratbuffer
		Stopopløsning
		Inkubationsserum
		Buffer
		AP-konjugat
		Substrat PNPP
		Biotin konjugat koncentrat
		Avidin HRP koncentrat
		Prøvebuffer
		Biotin konjugat
		-
		-
		-
		-
		-

		<u>Símbolos utilizados</u>
		Consulte instruções de utilização
		Temperatura de conservação
		Utilizar antes de
LOT		Código de lote
REF		Número de catálogo
CONTROL		Controlo
IVD		Dispositivo médico de diagnóstico in vitro
		Fabricante
		Conteúdo suficiente para <n> testes
	WASH SOLN CONC	Solução de lavagem concentrada
	CAL 0	Calibrador zero
	CAL N	Calibrador #
	CONTROL N	Controlo #
	Ag 125I	Marcador
	Ab 125I	Marcador
	Ag 125I CONC	Marcador concentrada
	Ab 125I CONC	Marcador concentrada
		Tubos
	INC BUF	Tampão de incubação
		Acetonitrilo
		Soro
	DIL SPE	Diluidor de espécimes
	DIL BUF	Tampão de diluição
		Anti-soro
		Imunoadsorvente
	DIL CAL	Diluente do calibrador
	REC SOLN	Solução de Reconstituição
		Polietileno-glicol
	EXTR SOLN	Solução de Extração
	ELU SOLN	Solução de Eluição
		Cartuchos de silica Bond Elut
	PRE SOLN	Solução de pré-tratamento
	NEUTR SOLN	Solução de neutralização
	TRACEUR BUF	Tampão Marcador
		Placa de micro titulação
	Ab HRP	HRP Conjugação
	Ag HRP	HRP Conjugação
	Ab HRP CONC	HRP Conjugação concentrada
	Ag HRP CONC	HRP Conjugação concentrada
	CONJ BUF	Conjugue o tampão
	CHROM TMB CONC	Cromogénica TMB concentrada
	CHROM TMB	Solução Cromogénica TMB
	SUB BUF	Tampão de substrato
	STOP SOLN	Solução de Paragem
	INC SER	Soro de incubação
		Tampão
	Ab AP	AP Conjugação
	SUB PNPP	Substrato PNPP
	BIOT CONJ CONC	Concentrado conjugado de biotina
	AVID HRP CONC	Concentrado HRP de avidina
	ASS BUF	Tampão de ensaio
	Ab BIOT	Conjugado de biotina
	Ab	Anticorpo específico
	SAV HRP CONC	Estreptavidina HRP concentrado
	NSB	Ligações não específicas
	2nd Ab	Anticorpo secundário
	ACID BUF	Tampão de acidificação

		<u>Stosowane symbole</u>
		Przed zastosowaniem zapoznać się z instrukcją
		Temperatura przechowywania
		Zużyć przed
LOT		Kod serii
REF		Numer katalogowy
CONTROL		Kontrola
IVD		Urządzenie medyczne do diagnostyki in vitro
		Producent
		Zawartość wystarczająca do <n> testów
	WASH	Roztwór płuczający stężony
	CAL	Kalibrator zerowy
	CAL	Kalibrator nr
	CONTROL	Kontrola nr
	Ag	Znacznik izotopowy
	Ab	Znacznik izotopowy
	Ag	Znacznik izotopowy stężony
	Ab	Znacznik izotopowy stężony
		Probówki
	INC	Wymagana inkubacja buforu
	ACETONITRILE	Acetonitril
	SERUM	Surowica
	DIL	Rozcieńczalnik próbki
	BUF	Bufor do rozcieńczania
	ANTISERUM	Antysurowica
	IMMUNOADSORBENT	Immunoabsorbent
	DIL	Rozcieńczalnik kalibratora
	CAL	
	REC	Roztwór do rozcieńczania
	SOLN	
	PEG	Glikol poli(oksy)etylenowy
	EXTR	Roztwór ekstrakcyjny
	SOLN	
	ELU	Roztwór elucencyjny
	SOLN	
	GEL	Kolumny krzemionkowe Bond Elut
	PRE	Roztwór do przygotowania wstępnego
	SOLN	
	NEUTR	Roztwór neutralizujący
	SOLN	
	TRACEUR	Bufor znacznika
	BUF	
		mikropłytki
	Ab	Koniugat peroksydazy chrzanowej
	HRP	
	Ag	Koniugat peroksydazy chrzanowej
	HRP	
	Ab	Koncentrat koniugatu peroksydazy chrzanowej
	HRP	
	CONC	Koncentrat koniugatu peroksydazy chrzanowej
	Ag	
	HRP	
	CONC	
	CONJ	Bufor do koniugacji
	BUF	
	CHROM	Koncentrat chromogenu TMB (czterometylobenzydyny)
	TMB	
	CONC	
	SUB	Roztwór chromogenu TMB (czterometylobenzydyny)
	BUF	
	SUB	Bufor substratu
	BUF	
	STOP	Roztwór zatrzymujący reakcję
	SOLN	
	INC	Wymagana inkubacja surowicy
	SER	
		Bufor
	Ab	Koniugat AP (fosfatazy alkalicznej)
	AP	
	SUB	p-nitrofenylofosforan substratowy
	PNPP	
	BIOT	Koncentrat koniugatu biotyny
	CONJ	
	CONC	
	AVID	Koncentrat peroksydazy chrzanowej z avidyną
	HRP	
	CONC	
	ASS	Bufor do oznaczania
	BUF	
	Ab	Koniugatu biotyny
	BIOT	
		Przeciwciało swoiste
	SAV	Koncentrat streptawidyny HRP
	HRP	
	CONC	
	NSB	Wiążanie nieswoiste
	2nd Ab	Drugie przeciwciało
		Bufor zakwaszający
	ACID	
	BUF	