



EIASON[®] C-Peptide



Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung C-Peptid
in humanem Serum, Plasma und Urin

Anleitung

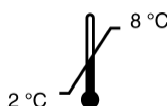
Nur für in-vitro Gebrauch

Produkt von







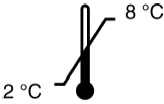











IASON GmbH
Feldkirchner Straße 4
A – 8054 Graz-Seiersberg
Tel.: +43 (0)316 28 43 00
Fax: +43 (0)316 28 43 00-4
Email: office@iason.eu
www.iason.eu

REF E05-088-96



Verwendete IFU-Symbole

Symbol	Deutsch	Symbol	Deutsch
	In vitro Diagnostikum		Substrat
	Bestellnummer		Standards
	Hergestellt von		Stopplösung
	Lagerung bei		Waschbuffer
	Europäische Konformität		Chargenbezeichnung
	Verwendbar bis		Probenverdünnungsmedium
	Enzymkonjugat		Antiserum
	Enzymkomplex		Mikrotiterplatte

Verwendungszweck

Nur für in-vitro Gebrauch

Der EIASON® C-Peptide ELISA Kit wird zur quantitativen Bestimmung C-Peptid in Serum, Plasma und Urin eingesetzt.

Zusammenfassung

Insulin wird in den β -Zellen des Pankreas in Form eines aus 86 Aminosäuren bestehenden Polypeptids, genannt Proinsulin, gebildet (1,2,3). Das Proinsulin besteht aus der A- und B-Kette des Insulins und dem die beiden Ketten verbindenden C-Peptid, einem aus 31 Aminosäuren bestehenden Peptid mit einer molekularen Masse von ca. 3.000 Dalton. Bei der enzymatischen Spaltung von Proinsulin wird Insulin sezerniert und in den Blutkreislauf abgegeben, zusammen mit dem als C-Peptid bezeichneten Rest-Fragment. Die Sekretion von C-Peptid und Insulin erfolgt in äquimolaren Mengen. Die Halbwertszeit von C-Peptid im Blutkreislauf beträgt jedoch das Zwei- bis Fünffache der Halbwertszeit des Insulins.

Aufgrund seiner geringeren Stoffwechselaktivität ist C-Peptid daher im Vergleich zum Insulin ein wesentlich stabilerer Indikator der Insulin-Sekretion. Die C-Peptid Konzentrationen im peripheren venösen Blut betragen das Fünf- bis Sechsfache der Insulin-Werte. Darüber hinaus ermöglicht die C-Peptid Bestimmung eine Unterscheidung zwischen endogenem und injiziertem Insulin.

Niedrige C-Peptid-Konzentrationen sind zu erwarten bei erniedrigtem Insulin (bei Insulin-abhängiger Diabetes) oder bei Insulin-Suppression (als normale Antwort auf exogene Insulingaben). Erhöhte C-Peptid-Werte sind dagegen bei erhöhter β -Zell-Aktivität zu erwarten, die bei Insulinompatienten festgestellt wurde (3, 6, 9). Neben der Ermittlung der Insulinsekretion umfasst die klinische Bedeutung der C-Peptid Bestimmung die Insulinom-Diagnose, Differenzierung von Hypoglycaemia factitia, Verlaufskontrolle nach Pankreasektomie und Einschätzung der Erfolgsaussichten bei Inselzell-Transplantationen (11, 12, 13).

Klinische Indikatoren für EIASON® C-Peptide ELISA:

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

Messprinzip

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

Die Wells der Mikrotiterplatten sind mit Anti-Maus-Antikörpern beschichtet, die an monoklonalen Anti-C-Peptid-Antikörper gebunden sind.

Während der Inkubation konkurriert das C-Peptid aus der Probe mit dem C-Peptid-Enzymkonjugat um die freien Bindungsstellen auf den beschichteten Wells.

Das nicht gebundene Konjugat wird durch Waschen der Wells entfernt. Anschließend wird die Substratlösung zugegeben und die Farbentwicklung nach einer definierten Zeit gestoppt.

Die Intensität der gebildeten Farbe ist umgekehrt proportional der C-Peptid - Konzentration in der Probe. Die Extinktion wird bei 450 nm mit einem Mikrotiterplattenleser gemessen.

Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Der EIASON® C-Peptide ELISA Kit ist nur zur in-vitro Diagnostik und nicht zur Anwendung bei Mensch und Tier geeignet. Dieses Produkt darf nur exakt wie in der mitgelieferten Anleitung beschrieben, eingesetzt werden. IASON kann nicht für einen eventuellen Verlust oder Schaden, (sofern nicht gesetzlich etwas anderes festgelegt ist), haftbar gemacht werden, der durch Nichtbeachtung der Instruktionen entsteht.

VORSICHT: Dieser Kit enthält Material menschlichen und/oder tierischen Ursprungs. Die Kitreagenzien sind so zu handhaben, als ob eine Übertragung einer Infektionskrankheit möglich sei. Rohmaterial humanen Ursprungs, das in diesem Kit zum Einsatz kommt ist negativ auf HBsAg, HCV und HIV-Antikörper geprüft. Da es kein diagnostisches Verfahren gibt, welches derartige Erreger mit 100%iger Sicherheit ausschließt, sind die entsprechenden Komponenten wie potentiell infektiöse Proben handzuhaben.

Angemessene Vorsichtsmaßnahmen und die Regeln der guten Laborpraxis sollten beim Gebrauch und der Entsorgung angewendet werden. Die Entsorgung der Kitreagenzien hat nach den örtlichen Vorschriften zu erfolgen.

Lagerung und Haltbarkeit des Kits

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

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

Die Mikrotiterwells sollten bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden. Der einmal geöffnete Folienbeutel sollte stets sehr sorgfältig wieder verschlossen werden.

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

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

Die verdünnte Waschlösung ist bei Raumtemperatur für 2 Wochen stabil.

Lagerung und Vorbereitung der Patientenproben

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

Lipämische, ikterische und/oder stark hämolysierte Proben sollten nicht verwendet werden.

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

Probenentnahme

Serum: Blut durch Venenpunktion entnehmen, gerinnen lassen und das Serum durch Zentrifugation bei Raumtemperatur abtrennen. Vor der Zentrifugation muss die Gerinnung vollständig abgeschlossen sein. Bei Patienten, die Antikoagulantien erhalten, kann die Gerinnungszeit länger dauern.

Plasma: Die Blutentnahme erfolgt mit Röhrchen, die ein Antikoagulantien enthalten. Das Plasma wird als Überstand nach einer Zentrifugation gewonnen.

Urin: Urinproben werden über einen Zeitraum von 24 Stunden gesammelt und gekühlt bei 4 °C aufbewahrt. Das Gesamtvolumen wird gemessen, der Urin gut durchmischt und eine Teilmenge für den Testansatz abgefüllt.

Probenaufbewahrung

Serum / Plasma:

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

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

Urin:

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

Probenverdünnung

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

Beispiel:

- a) Verdünnung 1:10: 10 µL Serum + 90 µL **DIL** gründlich mischen)
- b) Verdünnung 1:100: 10 µL Verdünnung a) 1:10 + 90 µL **DIL** (gründlich mischen).

Urin:

Urinproben müssen vor dem Einsatz 1:20 mit Sample Diluent verdünnt werden. Sollte das im Kit enthaltene Sample Diluent nicht ausreichen, kann zusätzliches **DIL** (40 mL Fläschchen) bestellt werden mit.

Kitbestandteile

Alle Reagenzien 1 – 11 vor Gebrauch auf Raumtemperatur bringen.

1. **MPL** 96 Wells, 12x8 Wells (einzeln brechbar),
Mit anti-Maus Antikörper beschichtet.
2. **CAL 0-5**; 6 Fläschchen (lyophilisiert.) Rekonstituieren Sie den lyophilisierten Inhalt der Standardfläschchen mit 0,75 mL destilliertem Wasser.
Konzentrationen 0 – 16 ng/mL (exakte Werte auf den Etiketten oder dem QC-Datenblatt). Die Standards sind kalibriert gegen das WHO Referenzmaterial IRR C-Peptide, Code 84/510.
Bei 2 °C bis 8 °C sind die rekonstituierten Standards 3 Tage haltbar. Für eine längere Aufbewahrung aliquotieren und bei -20 °C einfrieren.
3. **DIL** Probenverdünnungsmedium 1 Fläschchen, 3mL, gebrauchsfertig.
4. **AS** Antiserum, 1 Fläschchen, 7mL, gebrauchsfertig
monoklonaler Maus anti-C-Peptide Antikörper
5. **CONJ** Enzymkonjugat, 1 Fläschchen, 14 mL, gebrauchsfertig
enthält Meerrettichperoxidase,;
6. **COMPL** Enzymkomplex, 1 Fläschchen, 14mL, gebrauchsfertig
contains horseradish peroxidase

7. **WASH** (30 mL, 40 x concentrated);
Die 40-fach konzentrierte Wash Solution (30 mL) mit 1170 mL destilliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 1200 mL verdünnen.
Die verdünnte Waschlösung ist bei Raumtemperatur für 2 Wochen stabil.
8. **SUB** Substratlösung (Tetramethylbenzidin; TMB; 14 mL ready to use).
9. **STOP** Stopplösung (0,5 M H₂SO₄; 14 mL ready to use).

Anmerkung: Zusätzliches **DIL** zur Probenverdünnung ist auf Anfrage erhältlich.

Erforderliche aber nicht enthaltene Geräte und Materialien:

- Kalibriertes Mikrotiterplattenlesegerät mit 450 ± 10 nm Filter), (z.B. das IASON Instruments Mikrotiterplattenlesegerät)
- Kalibrierte variable Präzisions-Mikropipette
- Saugfähiges Papier
- Aqua dest.

Testdurchführung

- Alle Reagenzien und Proben müssen vor Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht und gut durchmischt werden. Dabei sollte Schaumbildung vermieden werden.
- Wenn die Testdurchführung einmal begonnen wurde, muss sie ohne Unterbrechung zu Ende geführt werden.
- Für jeden Standard, jede Kontrolle oder Probe eine neue Plastikspitze verwenden, um Verschleppungen zu vermeiden.
- Die Optische Dichte ist abhängig von Inkubationszeit und Temperatur. Deshalb ist es notwendig, vor Beginn der Testdurchführung alle Reagenzien in einen arbeitsbereiten Zustand zu bringen, die Deckel der Fläschchen zu öffnen, alle benötigten Wells in den Halter zu setzen. Nur eine solche Vorbereitung garantiert gleiche Zeiten für jeden Pipettiervorgang ohne Pausen.
- Als generelle Regel gilt, dass die enzymatische Reaktion linear proportional zu Zeit und Temperatur ist.
- Jeder Lauf muss eine Standardkurve und die Kontrollproben beinhalten.
 1. Je 100 µL **CAL 0-5**, Controls und Proben mit neuen Plastikspitzen in die entsprechenden Wells geben.
 2. 50 µL **AS** in jedes Well geben
 3. 100 µL **CONJ** in jedes Well geben.
 4. Für 10 Sekunden gut schütteln. Es ist sehr wichtig, in diesem Schritt eine komplette Durchmischung zu erreichen.
 5. 60 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Schüttler (400 – 500 rpm) inkubieren.
 6. Den Inhalt der Wells kräftig ausschütteln. Wells 3-mal mit verdünnter Waschlösung waschen. Verbleibende Flüssigkeit durch Ausklopfen der Wells auf saugfähigem Papier entfernen.

Achtung: Die Sensitivität und Präzision dieses Assays wird erheblich beeinflusst von der korrekten Durchführung des Waschschrilles!

7. 100 µL **COMPL** in jedes Well geben.
8. 30 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Schüttler (400 – 500 rpm) inkubieren
9. Den Inhalt der Wells kräftig ausschütteln. Wells 3-mal mit verdünnter **WASH** waschen. Verbleibende Flüssigkeit durch Ausklopfen der Wells auf saugfähigem Papier entfernen.
10. 100 µL **SUB** in jedes Well geben.
11. 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
12. Die enzymatische Reaktion durch Zugabe von 100 µL Stop Solution in jedes Well abstoppen.
13. Die Optische Dichte bei 450 ± 10 nm mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät innerhalb von 10 Minuten nach Zugabe der Stop Solution bestimmen.

oder vollautomatisiert auf:

- **IASON® Quardette**
- **IASON® PersonalLab**
- **IASON® Gladiator**

Qualitätskontrolle

Es wird empfohlen, die Kontrollproben gemäß den nationalen gesetzlichen Bestimmungen einzusetzen.

Durch die Verwendung von Kontrollproben wird eine Tag-zu-Tag Überprüfung der Ergebnisse erzielt. Es sollten Kontrollen sowohl mit normalem als auch pathologischem Level eingesetzt werden.

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

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

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

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

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

Ergebnisberechnung

- Eine Standardkurve anlegen, indem man die Werte der Absorption eines jeden Standards gegen die Konzentration aufträgt. So können die Konzentrationen der Patientenproben abgelesen werden. Proben, die eine

höhere Konzentration als die des höchsten Standards enthalten, müssen verdünnt werden. Dieser Verdünnungsfaktor muss bei der Berechnung der Konzentration beachtet werden.

- Alternative Auswertemethoden können verwendet werden, allerdings sollte bestätigt werden, dass der gewählte Kurvenverlauf geeignet ist und akzeptable Ergebnisse liefert. 4PL (4 Parameter Logistik) oder Point-to-Point – Auswertung werden empfohlen.

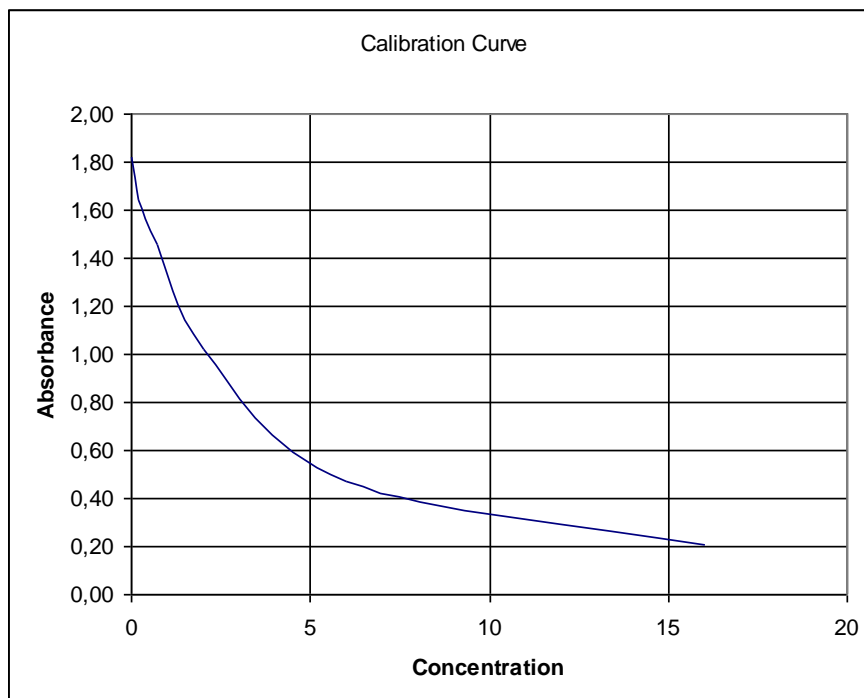
Assay Beispieldaten

Typische Ergebnisse der EIASON® C-Peptide Standards:

Standard Konz. [ng/mL]	Absorbtion bei 450 nm
0	1,82
0,2	1,64
0,7	1,46
2	1,02
6	0,47
16	0,21

Diese Daten dienen nur zur Illustration und sollten nicht für die Berechnung der Probenergebnisse verwendet werden.

Typische Eichkurve



Diese Eichkurve dient nur zur Illustration.

Erwartete Werte

	n	Mittelwert ± 2SD
Serum (Nach 12 Stunden Fasten)	60	0,5 – 3,2 ng/mL
Urin		1 – 200 µg/Tag

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

Assay Charakteristika

Messbereich

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

Spezifität der Antikörper (Kreuzreaktivität)

Die Kreuzreaktivität von intakten oder Split-Proinsulin ist klinisch nicht signifikant.

Analytische Sensitivität: 0,064 ng/mL

Die analytische Sensitivität, definiert als Mittelwert minus der zweifachen Standardabweichung des CAL 0 (n = 20), beträgt 0,064 ng/mL.

Präzision

Intra-Assay-Präzision (n = 20)			Intra-Assay-Präzision (n = 12)		
Probe	Konzentration (ng/mL)	VK [%]	Probe	Konzentration (ng/mL)	VK [%]
1	0,48	6,54	1	0,42	9,33
2	2,30	6,70	2	2,05	9,92
3	3,86	5,13	3	4,23	8,38

Wiederfindung

Seren wurden mit einer C-Peptid Lösung von bekannter Konzentration im Verhältnis 1:1 gemischt. Die % Wiederfindung wird in folgender Weise berechnet: gemessener Wert/erwarteter (berechneter Werte aus Mischungsverhältnis) Wert x 100%.

Serum Probe	Endogenes C-Peptid [ng/mL]	Addiert Konzentration 1:1 (v/v) [ng/mL]	Gemessene Konz. [ng/mL]	Erwartete Konz. [ng/mL]	Wiederfindung [%]
1	5,36	0,0	5,36		
		16,0	10,31	10,68	96,6
		6,0	5,57	5,68	98,0
		2,0	3,63	3,68	98,7
		0,7	3,08	3,03	101,8
2	9,7	16,0	9,7		
		6,0	12,49	12,85	97,2
		2,0	8,23	7,85	104,8
		0,7	5,15	5,85	87,9
3	12,12	16,0	12,12		
		6,0	15,52	14,06	110,4
		2,0	9,72	9,06	107,3
		0,7	7,30	7,06	103,4
			5,65	6,41	88,1

Urin Probe	Endogenes C-Peptid [ng/mL]	Addiert Konzentration 1:1 (v/v) [ng/mL]	Gemessene Konz. [ng/mL]	Erwartete Konz. [ng/mL]	Wiederfindung [%]
1	4,1	16,0	10,9	10,1	107,9
		6,0	5,57	5,1	109,2
		2,0	2,6	3,05	85,2
2	2,1	16,0	1,01	9,01	102,1
		6,0	9,2	4,01	100,5
		2,0	4,03	2,01	109,5
3	5,0	16,0	2,5	10,5	96,2
		6,0	10,1	5,5	96,4
		2,0	5,3	3,5	108,6

Linearität

Serum Probe	Verdünnung	Gemessene Konz. [ng/mL]	Erwartete Konz. [ng/mL]	Wiederfindung [%]
A	Keine	6,1	6,1	
	1:2	3,25	3,05	106,7
	1:4	1,61	1,52	105,3
	1:8	0,84	0,76	110,6
	1:16	0,41	0,38	107,6
B	Keine	9,90	9,90	
	1:2	5,59	4,95	112,8
	1:4	2,48	2,48	100,3
	1:8	1,29	1,24	104,0
	1:16	0,69	0,62	111,8
C	Keine	13,25	13,25	
	1:2	6,97	6,62	105,1
	1:4	3,22	3,31	97,1
	1:8	1,7	1,66	102,8
	1:16	0,85	0,83	103,1

Urin Probe	Verdünnung	Gemessene Konz. [ng/mL]	Erwartete Konz. [ng/mL]	Wiederfindung [%]
A	Keine	8,7	8,7	
	1:2	4,29	4,35	98,6
	1:4	2,01	2,18	92,4
	1:8	1,09	1,09	100,2
B	Keine	9,2	9,2	
	1:2	4,7	4,6	102,2
	1:4	2,25	2,3	97,8
	1:8	1,12	1,15	97,5
C	Keine	13,9	13,9	
	1:2	6,6	6,95	95,0
	1:4	3,3	3,48	95,0
	1:8	1,8	1,74	103,6

Grenzen des Tests

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

Interferenzen: Hämoglobin (bis zu 4 mg/mL), Bilirubin (bis zu 0.5 mg/mL) und Triglyceride (bis zu 30 mg/mL) haben keinen Einfluss auf das Testergebnis.

Beeinflussung durch Medikamente

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

Ein Hook-Effekt tritt in diesem Test nicht auf.

Rechtliche Grundlagen

Zuverlässigkeit der Ergebnisse

Der Test muss exakt gemäß der Testanleitung des Herstellers abgearbeitet werden. Darüber hinaus muss der Benutzer sich strikt an die Regeln der GLP (Good Laboratory Practice) oder andere eventuell anzuwendende Regeln oder nationale gesetzliche Vorgaben halten. Dies betrifft besonders den Gebrauch der Kontrollreagenzien. Es ist sehr wichtig, bei der Testdurchführung stets eine ausreichende Anzahl Kontrollen zur Überprüfung der Genauigkeit und Präzision mitlaufen zu lassen. Die Testergebnisse sind nur gültig, wenn alle Kontrollen in den vorgegebenen Bereichen liegen, und wenn alle anderen Testparameter die vorgegebenen Spezifikationen für diesen Assay erfüllen. Wenn Sie bezüglich eines Ergebnisses Zweifel oder Bedenken haben, setzen Sie sich bitte mit der Firma IASON GmbH in Verbindung.

Therapeutische Konsequenzen

Therapeutische Konsequenzen sollten keinesfalls nur aufgrund von Laborergebnissen erfolgen, selbst dann nicht, wenn alle Testergebnisse mit den in „Zuverlässigkeit der Ergebnisse“ genannten Voraussetzungen übereinstimmen. Jedes Laborergebnis ist nur ein Teil des klinischen Gesamtbildes eines Patienten. Nur in Fällen, in denen die Laborergebnisse in akzeptabler Übereinstimmung mit dem allgemeinen klinischen Bild des Patienten stehen, sollten therapeutische Konsequenzen eingeleitet werden. Das Testergebnis allein sollte niemals als alleinige Grundlage für die Einleitung therapeutischer Konsequenzen dienen.

Haftung

Jegliche Veränderungen des Testkits und/oder Austausch oder Vermischung von Komponenten unterschiedlicher Chargen von einem Testkit zu einem anderen, können die gewünschten Ergebnisse und die Gültigkeit des gesamten Tests negativ beeinflussen. Solche Veränderungen und/oder Austausch haben den Ausschluss jeglicher Ersatzansprüche zur Folge. Reklamationen, die aufgrund von Falschinterpretation von Laborergebnissen durch den Kunden gemäß Punkt „Therapeutische Konsequenzen“ erfolgen, sind ebenfalls abzuweisen. Im Falle jeglicher Reklamation ist die Haftung des Herstellers maximal auf den Wert des Testkits beschränkt. Jegliche Schäden, die während des Transports am Kit entstanden sind, unterliegen nicht der Haftung des Herstellers.

Useful publications

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

Arbeitsschema

Alle Reagenzien vorher auf Raumtemperatur bringen (20-25°C).

1. Pipettieren	CAL 0-5 100 µL	Controls 100 µL	Samples 100µL
2. Pipettieren	AS		50µL
3. Pipettieren	ECONJ		100µL
	10 Sekunden gründlich mischen. Es ist wichtig, eine vollständige Vermischung in diesem Schritt haben		
4. Inkubieren	1 Stunde bei Raumtemperatur (20-25°C) auf einem Schüttler (400 – 500 rpm)		
5. Waschen	Waschschritt 3x : Flüssigkeit absaugen oder dekantieren, 400 µL WASH pipettieren Flüssigkeit absaugen oder dekantieren, auf Zellstoff abtropfen		
6. Pipettieren	COMPL		100µL
7. Inkubieren	30 Minuten bei Raumtemperatur (20-25°C) auf einem Schüttler (400 – 500 rpm)		
8. Waschen	Waschschritt 3x : Siehe Punkt 5		
9. Pipettieren	SUB		100µL
10. Inkubieren	20 bei Raumtemperatur (20-25°C)		
11. Pipettieren	STOP		100µL
12. Messen	450 nm (RF 620nm) Optional Overage Filter: 405 nm, Faktor: 3 (vom Photometer abhängig), innerhalb von 10 Min. Ergebnisberechnung: 4-Parameter oder Punkt für Punkt		

Erwartete Werte

	NIBSC 84/510
Serum (Nach 12 Stunden Fasten)	0,5 – 3,2 ng/mL
Urin	1 – 200 µg/Tag



EIASON® C-Peptide

IVD

Enzyme immunoassay for the quantitative determination of C-Peptide
in human serum, plasma and urine

Kit instruction

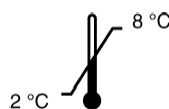
For in-vitro use only

Product of







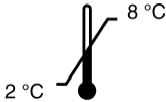











IASON GmbH

Feldkirchner Straße 4
A – 8054 Graz-Seiersberg
Tel.: +43 (0)316 28 43 00
Fax: +43 (0)316 28 43 00-4
Email: office@iason.eu
www.iason.eu



Used IFU-Symbols

Symbol	English	Symbol	English
	In vitro diagnostic device		Substrate
	Order number		Calibrators
	Product of		Stopping solution
	Storage		Wash buffer
	European Conformity		Batch code
	Expiry date		Sample diluent
	Enzym conjugate		Antiserum
	Enzyme complex		Microplate

Intended Use

For in-vitro use only.

The EIASON® C-Peptide ELISA is an enzyme immunoassay for the quantitative in vitro diagnostic measurement of C-Peptide in serum, plasma and urine.

Summary

Insulin is synthesized in the pancreatic beta cells as a 6000 MW component of an 86 amino acid polypeptide called proinsulin (1, 2, 3). Proinsulin is subsequently cleaved enzymatically, releasing insulin into the circulation along with a residual 3000 MW fragment called connection ("C") peptide, so-named because it connects A and B chains of insulin within the proinsulin molecule (1, 2, 3, 4). Human C-Peptide, a 31 amino acid residue peptide, has a molecular mass of approximately 3000 daltons.

C-Peptide has no metabolic function. However, since C-Peptide and insulin are secreted in equimolar amounts, the immunoassay of C-Peptide permits the quantitation of insulin secretion (4, 5, 6). This is the reason for the clinical interest of serum and urinary determinations of C-Peptide. Moreover, C-Peptide measurement has several advantages over immunoassays of insulin. The half-life of C-Peptide in the circulation is between two and five times longer than that of insulin (7). Therefore, C-Peptide levels are a more stable indicator of insulin secretion than the more rapidly changing levels of insulin. A very clear practical advantage of C-Peptide measurement arising from its relative metabolic inertness as compared to insulin is that C-Peptide levels in peripheral venous blood are about 5-6 times greater than insulin levels (3). Also, relative to an insulin assay, the C-Peptide assay's advantage is its ability to distinguish endogenous from injected insulin. Thus, low C-Peptide levels are to be expected when insulin is diminished (as in insulin-dependent diabetes) or suppressed (as a normal response to exogenous insulin), whereas elevated C-Peptide levels may result from the increased β -cell activity observed in insulinomas (3, 6, 9). C-Peptide has also been measured as an additional means for evaluating glucose tolerance and glibenclamide glucose tests (2, 3, 9, 10). C-Peptide levels are in many ways a better measurement of endogenous insulin secretion than peripheral insulin levels. C-Peptide may be measured in either blood or urine (9). With improved sensitive C-Peptide immunoassays, it is now possible to measure C-Peptide values at extremely low levels. The clinical indications for C-Peptide measurement include diagnosis of insulinoma and differentiation from factitious hypoglycemia, follow-up of pancreatectomy, and evaluation of viability of islet cell transplants (11, 12, 13). Recently, these indications have been dramatically expanded to permit evaluation of insulin dependence in maturity onset diabetes mellitus.

Clinical Indications for the EIASON® C-Peptide ELISA

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

Assay principle

The EIASON® C-Peptide ELISA Kit is a solid phase enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), based on the principle of competitive binding. The microtiter wells are coated with anti-mouse antibodies, which bind a monoclonal antibody directed towards a unique antigenic site on the C-Peptide molecule. Endogenous C-Peptide of a patient sample competes with a C-Peptide-horseradish peroxidase conjugate for binding to the coated antibody. After incubation the unbound conjugate is washed off. The amount of bound peroxidase conjugate is inversely proportional to the concentration of C-Peptide in the sample. After addition of the substrate solution, the intensity of colour developed is inversely proportional to the concentration of C-Peptide in the patient sample.

Warnings and precautions

The EIASON® C-Peptide ELISA Kit is for in vitro diagnostic use only and is not for internal use in humans or animals. This product must be used strictly in accordance with the instructions set out in the Package Insert. IASON will not be held responsible for any loss or damage (except as required by statute) caused, arising out of non-compliance with the instructions provided.

CAUTION: this kit contains material of human and/or animal origin. Handle kit reagents as if capable of transmitting an infectious agent.

Source material from Human origin which is used in this kit was tested and found negative for HbsAG and HIV as well as for HCV antibodies. However, since there is no diagnostic procedure that excludes these agents with 100 percent certainty all components should be handled as potentially hazardous material.

Appropriate precautions and good laboratory practices must be used in the storage, handling and disposal of the kit reagents. Disposal of kit reagents should be in accordance with local regulations.

Shelf life and storage of reagents

This kit is stable until the stated expiry date if stored as specified. Upon receipt, store all reagents at 2-8°C. Do not use reagents beyond this date.

Opened reagents must be stored at 2-8°C. Microtiter wells must be stored at 2-8°C. Once the foil bag has been opened, care should be taken to close it tightly again.

Reconstitute the lyophilized contents of the calibrator vials with 0.75 mL Aqua dest.

Note: The reconstituted calibrators are stable for 3 days at 2 °C to 8 °C. For longer storage freeze at -20°C.

The diluted Wash Solution is stable for 2 weeks at room temperature.

Specimen collection and preparation

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

Do not use haemolytic, icteric or lipaemic specimens.

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

Specimen collection

Serum:

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

Plasma:

Whole blood should be collected into centrifuge tubes containing anti coagulant and centrifuged immediately after collection.

Urine:

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

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

Specimen storage

Storage: Serum/Plasma

Specimens should be capped and may be stored for up to 24 hours at 2-8°C prior to assaying. Specimens held for a longer time should be frozen only once at -20°C prior to assay. When required, thaw test sera at room temperature and mix gently to ensure homogeneity.

Storage: Urine

Aliquot a well-mixed sample to be used in the assay. Centrifuge sample to clear. Urine samples may be stored for up to 36 hours at 2-8°C prior to assaying. Specimens held for a longer time should be frozen only once at -20°C prior to assay.

Specimen dilution

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

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

Example:

a) Dilution 1:10: 10 µL Serum + 90 µL **DIL** (mix thoroughly)

b) Dilution 1:100: 10 µL dilution a) 1:10 + 90 µL **DIL** (mix thoroughly).

Urine Dilution:

Prior to use dilute urine samples 1:20 with **DIL**

Urine samples

Prior to use dilute urine samples **1:20** with **DIL**

If the Sample Diluent included in the kit is insufficient, you can order additional **DIL** (40 mL vial) at IASON.

Materials provided

Allow all reagents 1-9 to reach room temperature before use.

10. **MPL** ELISA strip wells coated with anti mouse antibody. (96 wells in total, 8 wells per strip). Before opening the packet of strip wells, allow it to stand at room temperature (20-25°C) for at least 30 minutes. After opening, keep any unused wells in the original foil packet (reseal with adhesive tape) and in the self-seal plastic bag with the desiccant provided.
11. **CAL 0-5**; lyophilized: Reconstitute each vial with 0.75 mL Aqua. Dest. Stability: see "Storage of reagents". Concentrations: 0-16 ng/mL (see exact value on the vial label or on the QC-Datasheet). The calibrators are calibrated against IRR C-Peptide 84/510.
12. **DIL** Sample Diluent 1 vial, 3mL, ready for use
13. **AS** Antiserum, 1 vial, 7mL, ready for use
monoclonal mouse anti C-Peptide antibody

14. **CONJ** Enzyme Conjugate, 1 vial, 14 mL, ready to use biotinylated C-Peptide
15. **COMPL** Enzyme Complex, 1 vial, 14mL, ready for use contains horseradish peroxidase
16. **WASH** (30 mL, 40 x concentrated); dilute to 1.2 L with distilled water before use.
The diluted Wash Solution is stable for 2 weeks at room temperature
17. **SUB** Peroxidase substrate (tetramethyl benzidine; TMB; 14 mL ready to use).
18. **STOP** Stop solution (0.5 M sulphuric acid; 14 mL ready to use).

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

Materials required but not provided in the kit

- Pipettes capable of dispensing 50 µL and 100 µL
- Distilled water
- ELISA plate reader suitable for 96 well formats and capable of measuring absorbances at 450 nm.

Assay procedure

All reagents and specimens must be allowed to come to room temperature before use. All reagents must be mixed without foaming. Once the test has been started, all steps should be completed without interruption. As a general rule the enzymatic reaction is linearly proportional to time and temperature. Calculate the number of individual **MPL** wells needed for the assay. Allow all the reagents supplied including the appropriate number of strips to reach room temperature, fit the number of strip wells required firmly into the frame provided. Controls and standard curve should always be included in each assay run.

1. Pipette 100 µL of **CAL 0-5**, controls and test sera into the wells (in duplicate).
2. Pipette carefully 50 µL of **ANTISER** into each well.
3. Pipette carefully 100 µL of **CONJ** into each well. Thoroughly mix for 10 seconds. It is important to have a complete mixing in this step
4. Cover the frame and shake the wells containing the various samples and incubate for 60 minutes at 20-25° on an ELISA plate shaker.
5. After the incubation with **CONJ**, discard the **CONJ** by briskly inverting the wells over a suitable receptacle, wash 3 times with 400µL diluted **WASH** per well and each time tap the inverted wells gently on a clean dry absorbent surface to remove any droplets of wash buffer.
6. Pipette carefully 100 µL of **COMPL** into each well.
7. Cover the frame and shake the wells containing the various samples and incubate for 30 minutes at 20-25° on an ELISA plate shaker.

8. After the incubation with **COMPL**, discard the **COMPL** by briskly inverting the wells over a suitable receptacle, wash 3 times with 300µL diluted **WASH** per well and each time tap the inverted wells gently on a clean dry absorbent surface to remove any droplets of wash buffer.
9. Pipette carefully 100 µL of **SUB** into each well.
10. Incubate for 20 minutes at 20-25°C in the dark during which time a blue colour will develop.
11. Stop the substrate reaction by careful addition of 100 µL of **STOP** to each well (this will cause the blue colour to turn yellow) and shake the plate for about 5 seconds on a plate shaker to ensure uniformity of the solution in each well. It is most important to ensure that the substrate incubation time (i.e. time from addition of **SUB** to addition of **STOP**) is the same for each well.
12. Measure the absorbance of each well at 450 nm as reading filter (and 405 nm as overrange filter if possible) (reference 620 – 650 nm) within 10 minutes after adding the stop solution.

or fully automated on:

- **IASON® Quardette**
- **IASON® PersonalLab**
- **IASON® Gladiator**

Quality control

The regular use of control samples at several analyte levels is advised to ensure day-to-day validity of results. Controls should be tested as unknowns. Quality Control charts should be maintained to follow the assay performance.

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

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

The controls and the corresponding results of the QC-Laboratory are stated in the QC certificate added to the kit. The values and ranges stated on the QC sheet always refer to the current kit lot and should be used for direct comparison of the results. It is also recommended to make use of national or international Quality Assessment programs in order to ensure the accuracy of the results.

Employ appropriate statistical methods for analysing control values and trends. If the results of the assay do not fit to the established acceptable ranges of control materials patient results should be considered invalid. In this case, please check the following technical areas: Pipetting and timing devices; photometer, expiration dates of reagents, storage and incubation conditions, aspiration and washing methods. After checking the above mentioned items without finding any error contact your distributor or IASON directly.

Calculation of results

- Draw a standard curve by plotting the absorbance of each standard against its concentration. Read off the values of the test samples. Samples with concentrations higher than that of the highest standard have to be further diluted. For the calculation of the concentrations this dilution factor has to be taken into account.
- Alternative data reduction techniques may be employed but users should confirm that the selected curve fit is appropriate and gives acceptable results. 4PL (4 parameter logistics) or point-to-point fits are recommended.

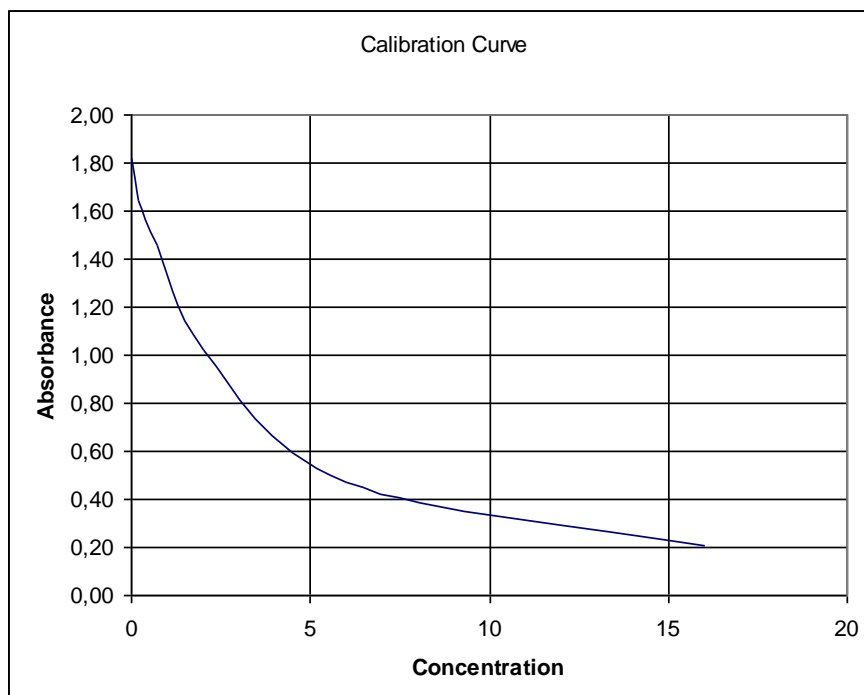
Sample assay data

Example of typical results obtained with EIASON® C-Peptide calibrators:

Calibrator	Absorbance
ng / mL	450 nm
0	1.82
0.2	1.64
0.7	1.46
2	1.02
6	0.47
16	0.21

This data is for illustration only and must not be used for the calculation of any sample result.

Typical calibration curve



This sample calibration curve is for illustration only.

Expected values

	n	Mean ± 2SD
Serum (Post 12-hour fasting)	60	0.5 – 3.2 ng/mL
Urine		1 – 200 µg/day

Each laboratory is recommended to determine ranges for their local population. The results alone should not be the only reason for any therapeutic consequences. The results should be correlated to other clinical observations and diagnostic tests.

Performance characteristics

Assay dynamic range

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

Specificity to antibodies (cross-reactivity)

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

Analytical sensitivity: 0.064 ng/mL

The analytical sensitivity was calculated from the mean plus two standard deviations of twenty (20) replicate analyses of **CAL 0**

Reproducibility

Intra-assay-precision (n = 20)			Inter-assay-precision (n = 12)		
Sample	Concentration (ng/mL)	CV [%]	Sample	Concentration (ng/mL)	CV [%]
1	0.48	6.54	1	0.42	9.33
2	2.30	6.70	2	2.05	9.92
3	3.86	5.13	3	4.23	8.38

Recovery

Samples have been spiked by adding C-Peptide solutions with known concentrations in a 1:1 ratio. The % Recovery has been calculated by multiplication of the ratio of the measurements and the expected values with 100.

Serum sample	Endogenous C-Peptide ng/mL	Added concentration 1:1 (v/v) (ng/mL)	Measured conc. (ng/mL)	Expected conc. (ng/mL)	Recovery (%)
1	5.36	0.0	5.36		
		16.0	10.31	10.68	96.6
		6.0	5.57	5.68	98.0
		2.0	3.63	3.68	98.7
		0.7	3.08	3.03	101.8
2	9.7	16.0	9.7	12.85	97.2
		6.0	12.49	7.85	104.8
		2.0	8.23	5.85	87.9
		0.7	5.15	5.20	87.2
3	12.12	16.0	12.12	14.06	110.4
		6.0	15.52	9.06	107.3
		2.0	9.72	7.06	103.4
		0.7	7.30	6.41	88.1
		0.7	5.65		

Urine sample	Endogenous C-Peptide ng/mL	Added concentration 1:1 (v/v) (ng/mL)	Measured conc. (ng/mL)	Expected conc. (ng/mL)	Recovery (%)
1	4.1	16.0	2.1	10.1	107.9
		6.0	10.	5.1	109.2
		2.0	5.57	3.05	85,2
2	2.1	16.0	1.01	9.01	102.1
		6.0	9.2	4.0	100.5
		2.0	4.03	2.01	109.5
3	5.0	16.0	2.5	10.5	96.2
		6.0	10.1	5.5	96.4
		2.0	5.3	3.5	108.6
		2.0	3.8		

Linearity

Serum sample	Dilution	Measured conc. (ng/m)	Expected conc. (ng/m)	Recovery (%)
A	None	6.1	6.1	
	1:2	3.25	3.05	106.7
	1:4	1.61	1.52	105.3
	1:8	0.84	0.76	110.6
	1:16	0.41	0.38	107.6
B	None	9.90	9.90	
	1:2	5.59	4.95	112.8
	1:4	2.48	2.48	100.3
	1:8	1.29	1.24	104.0
	1:16	0.69	0.62	111.8
C	None	13.25	13.25	
	1:2	6.97	6.62	105.1
	1:4	3.22	3.31	97.1
	1:8	1.7	1.66	102.8
	1:16	0.85	0.83	103.1

Urine sample	Dilution	Measured conc. (ng/m)	Expected conc. (ng/m)	Recovery (%)
A	None	8.7	8.7	
	1:2	4.29	4.335	98.6
	1:4	2.01	2.18	92.4
	1:8	1.09	1.09	100.2
B	None	9.2	9.2	
	1:2	4.7	4.6	102.2
	1:4	2.25	2.3	97.8
	1:8	1.12	1.15	97.5
C	None	13.9	13.9	
	1:2	6.6	6.95	95.0
	1:4	3.3	3.48	95.0
	1:8	1.8	1.74	103.6

Limitation of use

Reliable and reproducible results will be obtained when the assay procedure is performed with a complete understanding of the package insert instruction and with adherence to good laboratory practice. Any improper handling of samples or modification of this test might influence the results.

Interferences:

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

Drug Interferences:

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

No hook effect as observed in this test.

Legal aspects

Reliability of results

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

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

Therapeutic consequences

Therapeutic consequences should never be based on laboratory results alone even if all test results are in agreement with the items as stated under point Reliability of Results. Any laboratory result is only a part of the total clinical picture of a patient. Only in cases where the laboratory results are in acceptable agreement with the overall clinical picture of the patient should therapeutic consequences be derived. The test result itself should never be the sole determinant for deriving any therapeutic consequences.

Liability

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

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

Useful publications

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

Pipetting scheme

Allow all reagents to reach room temperature (20-25°C)

1. Pipetting	CAL 0-5 100 µL	Controls 100 µL	Samples 100µL
2. Pipetting	AS		50µL
3. Pipetting	ECONJ		100µL
	Thoroughly mix for 10 seconds. It is important to have a complete mixing in this step		
4. Incubation	1 hours at room temperature on a shaker (20-25°C)		
5. Washing	wash 3 x : aspirate or decant add 400 µL WASH aspirate or decant and dry on an absorbent material		
6. Pipetting	COMPL		100µL
7. Incubation	30 minutes at room temperature on a shaker (20-25°C)		
8. Washing	wash 3 x : aspirate or decant add 400 µL WASH aspirate or decant and dry on an absorbent material		
9. Pipetting	SUB		100µL
10. Incubation	20 min at room temperature (20-25°C)		
11. Pipetting	STOP		100µL
12. Reading	450nm (RF 620 – 650nm) Optional Overage Filter: 405nm, Factor: 3 (dependent on photometer), reading within 10 min. Calculation: 4-parameter or point to point		

Expected values

NIBSC 84/510	
Serum (Post 12-hour fasting)	0.5 – 3.2 ng/mL
Urine	1 – 200 µg/day