



C-PEPTIDE

pour analyses de routine

Détermination immunoenzymatique directe du niveau de C-Peptide dans le sérum ou le plasma.

IVD



LOT

Voir étiquette externe

2°C  8°C



$\Sigma = 96$ déterminations

REF 39817

UTILISATION PREVUE

Le kit C-Peptide est un dosage immunoenzymatique directe en phase solide pour la détermination quantitative du C-Peptide dans le sérum et dans le plasma humain.

1. SIGNIFICATION CLINIQUE

C-peptide est l'abréviation pour peptide de liaison, c'est un peptide de 31 aminoacides. Le C-peptide est le C-terminal libéré durant la maturation de la pro-insuline en insuline. La pro-insuline est créée quand elle est libérée par le pancréas dans la circulation sanguine – une molécule de C-peptide pour chaque molécule d'insuline. Le C-Peptide est sans activité biologique mais semble être nécessaire pour maintenir l'intégrité structurelle de l'insuline.

La détermination in vitro du niveau de C-Peptide et d'insuline est une aide au diagnostic dans le cas de maladies hépatiques, acromégalies, syndrome de Cushing, intolérance héréditaire au glucose, insulinémie, dysfonctionnements rénaux, ingestion orale accidentelle de médicaments hypoglycémisants ou hypoglycémie dépendant du C-peptide.

Le patient auquel on diagnostique le diabète est soumis à la mesure des niveaux de C-peptide, pour déterminer le type de diabète. Le pancréas des patients avec le diabète de type 1 ne peut produire l'insuline, ils auront donc un niveau de C-peptide plus faible, tandis que les niveaux de C-peptide dans le diabète de type 2 sont normaux ou supérieurs à la normale. La mesure du C-peptide chez les patients qui s'injectent de l'insuline peut être utile dans l'évaluation de la sécrétion endogène de l'insuline.

La mesure du C-peptide est analytiquement plus sensible que celle de l'insuline. L'insuline et le C-Peptide sont sécrétés dans la circulation portale en concentrations équimolaires, les niveaux à jeun de C-Peptide sont 5-10 fois supérieurs à ceux de l'insuline, car la demi-vie du C-Peptide est beaucoup plus longue. Le C-peptide n'est pas métabolisé par le foie, il est enlevé de la circulation et dégradé dans les reins avec une fraction qui passe dans les urines sans subir de modifications. Donc, les niveaux du C-Peptide urinaires sont liés aux niveaux à jeun de C-Peptide sérique.

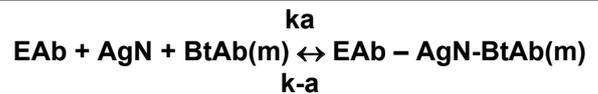
2. PRINCIPE DE LA METHODE

Les réactifs essentiels requis pour un dosage immunoenzymatique incluent des anticorps spécifiques et de forte affinité (conjugués à l'enzyme et immobilisés), avec une reconnaissance distincte et différente des épitopes en excès, et l'antigène natif. Dans cette procédure, l'immobilisation a lieu durant le dosage à la surface du puit de la microplaque à travers l'interaction de la streptavidine (S. Avidin) immobilisée dans le puit et

l'addition de façon exogène de l'anticorps monoclonal anti-C-peptide biotinyllé (Ab).

Dans le mélange : anticorps monoclonal biotinyllé, anticorps conjugué à l'enzyme et sérum contenant l'antigène natif (Ag), la réaction a lieu entre l'antigène natif et les anticorps, sans compétition ou encombrement stérique, pour former un complexe en sandwich soluble.

L'interaction est illustrée par l'équation suivante:



BtAb(m) = Anticorps Monoclonal Biotinyllé (Quantité en excès)

AgN = Antigène Natif (Quantité Variable)

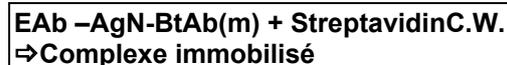
EAb = Anticorps conjugué à l'Enzyme (Quantité en excès)

EAb -AgN-BtAb(m) = Complexe en Sandwich Antigène-Anticorps.

k_a = Constante d'Association

k_{-a} = Constante de Dissociation

En même temps, le complexe est déposé sur le puit à travers la réaction de grande affinité entre la streptavidine et les anticorps biotinyllés. Cette interaction est montrée ci-après:



StreptavidinC.W. = Streptavidine immobilisée sur le puit
Immobilized complex = complexe en sandwich lié au puit.
 A l'équilibre, la fraction d'anticorps lié est séparée de l'antigène libre par décantation ou aspiration. L'activité de l'enzyme dans la fraction d'anticorps liée est directement proportionnelle à la concentration en antigène natif. L'activité de l'enzyme présente sur la surface du puit est mesurée quantitativement avec un substrat approprié par colorimétrie. En utilisant quelques étalons différents à valeur d'antigène connue, on peut créer une courbe de dosage de laquelle peut être extrapolée la concentration d'antigène d'un échantillon inconnu.

3. REACTIFS, MATERIELS ET EQUIPEMENT

3.1. Réactifs et matériels fournis dans le kit

1. Standard C-peptide 6x (1 flacon = 2 mL)

STD0

STD1

STD2

STD3

REF DCE002/7706-0

REF DCE002/7707-0

REF DCE002/7708-0

REF DCE002/7709-0

- STD4 REF DCE002/7710-0
 STD5 REF DCE002/7711-0
 2. **Conjugué** (1 flacon) 13 mL
 Conjugué Anti C-Pep-HRP + Conjugué biotinylé Anti-C-Pep de souris REF DCE002/7702-0
 3. **Microplaque recouverte** (1 microplaque fractionnable)
 Microplaque recouverte avec streptavidine REF DCE002/7703-0
 4. **Substrat TMB** (1 flacon) 12mL REF DCE004-0
 H₂O₂-TMB (0,25 gr/L) (éviter le contact avec la peau)
 5. **Solution d'Arrêt** (1flacon) 12 mL REF DCE005-0
 Acide sulfurique 0,15 mol/L (éviter le contact avec la peau)
 6. **Solution de lavage conc.** 50x (1 flacon) 20 ml
 NaCl 9 gr/l; Tween20 1gr/l REF DCE006-0

3.2. Réactifs nécessaires non fournis dans le kit
 Eau distillée.

3.3. Matériel et équipement auxiliaire

Distributeurs automatiques.
 Lecteur pour microplaques (450 nm).

Remarque

Conserver tous les réactifs entre +2 et + 8°C à l'abri de la lumière.

Ouvrir le sachet du réactif 3 (Microplaque recouverte) uniquement après l'avoir porté à température ambiante et le refermer immédiatement après le prélèvement des barrettes à utiliser.

4. PRECAUTIONS

- Les composants du kit doivent être conservés à 2-8°C et ne doivent pas être utilisés après la date de péremption.
- Éviter l'exposition du réactif TMB/H₂O₂ à la lumière solaire directe, aux métaux ou oxydants.
- Les réactifs ouverts sont stables pendant 60 jours si conservés à 2-8°C.
- Cette méthode permet la détermination quantitative de C-Peptide de 0,2 à 10,0 ng/ml.

5. PROCEDURE

5.1. Préparation des Standards (S₀, S₁, S₂, S₃, S₄, S₅)

Les standards, contenant du sérum humain, ont été calibrés en utilisant une solution de référence, qui est dosée par rapport au 1st IS 96/670.

Les standards ont approximativement les concentrations suivantes:

	S ₀	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄	S ₅
ng/ml	0	0,2	1,0	2,0	5,0	10,0

Reconstituer chaque flacon avec 2 mL d'eau distillée ou déionisée.

Les Standards reconstitués sont stables pendant 7 jours à 2 – 8°C.

Pour des périodes plus longues, diviser les standards dans des petits flacons et les conserver à -20°C (stables pendant 6 mois). Décongeler une seule fois.

5.2. Préparation de la Solution de lavage

Diluer le contenu de la solution de lavage concentrée 50x dans 1000 mL avec de l'eau distillée ou désionisée dans un récipient adapté à la conservation.

(La solution est stable jusqu'à la date de péremption du kit à 2-8°C).

5.3. Préparation de l'échantillon

Suivre les bonnes pratiques de laboratoire pour l'utilisation de produits à base de sang.

Pour une confrontation soignée afin de déterminer les valeurs normales, il faudrait prélever des échantillons de sérum le matin à jeun. Le sang devrait être recueilli dans un tube pour prélèvement sans additifs ou anti-coagulants. Permettre au sang de se coaguler. Centrifuger l'échantillon pour séparer le sérum des cellules. Les échantillons devraient être réfrigérés à 2-8°C pendant une période maximale de 5 jours. S'ils ne peuvent être dosés durant cette période, il faut les conserver à -20°C pendant max 30 jours.

Éviter les cycles de congélation décongélation répétés. Les échantillons de patients avec une concentration en C-Peptide supérieure à 10 ng/ml peuvent être dilués (par exemple 1/10 ou supérieur) avec le standard 0 (C peptide 0 ng/ml) et testés à nouveau. La concentration des échantillons s'obtient en multipliant le résultat par le facteur de dilution.

5.4. Procédure

Porter tous les réactifs à température ambiante (20-27°C). Préparer en double les puits de la microplaque pour chacun des standards, contrôles et les échantillons à tester. Remplacer chaque barrettes inutilisée dans le sachet d'aluminium, sceller et conserver à 2-8°C.

Réactif	Standard	Echant./ Contrôle	Blanc
Standard S ₀ -S ₅	50 µL		
Echantillon/ Contrôle		50 µL	
Conjugué	100 µL	100 µL	
Incuber 2 h à 22-28°C. Enlever le contenu de chaque puit et laver avec 300 µl de solution de lavage diluée. Répéter la procédure de lavage deux fois en éloignant la solution de lavage.			
Substrat TMB	100 µL	100 µL	100 µL
Incuber à température ambiante (20-25°C) pendant 15 minutes à l'abri de la lumière			
Solution d'arrêt	100 µL	100 µL	100 µL
Lire l'absorbance (E) à 450 nm en mettant à zéro avec le blanc.			

6. CONTROLE QUALITE

Chaque laboratoire devrait tester les contrôles à valeurs basses, moyennes et hautes de la courbe de réponse standard pour suivre les performances du kit. Ces contrôles devraient être traités comme inconnus et les valeurs déterminées dans chaque procédure analytique effectuée. Des tableaux de contrôle de la qualité devraient être réalisés pour suivre les prestations des réactifs fournis. Des méthodes statistiques pertinentes devraient être utilisées pour en certifier les tendances. Des déviations significatives des prestations établies peuvent indiquer un changement non notifié des conditions expérimentales ou la péremption des réactifs du kit. Il faudrait utiliser des réactifs frais pour déterminer la cause des variations.

7. LIMITATIONS DE LA PROCEDURE

7.1. Performances de l'analyse

Ne pas utiliser d'échantillons contaminés microbiologiquement, de même que des échantillons

fortement lipémiques ou hémolysés. Pour la reproductibilité des résultats, il est important que la durée de réaction soit constante pour chaque puit. La distribution des réactifs ne devrait pas dépasser 10 minutes. Si plusieurs plaques sont utilisées, il est recommandé de répéter le dosage de la courbe standard. La réaction cinétique commence avec l'ajout de la solution de substrat TMB et se termine avec l'ajout de la solution d'arrêt. L'ajout du substrat et de la solution d'arrêt doit être effectué dans la même séquence de façon à éliminer les différents temps de réaction. Les lecteurs de microplaques mesurent les DO verticalement. Ne pas toucher le fond des puits. L'aspiration non complète de la solution de lavage des puits peut induire une mauvaise réplification ou des résultats inexacts.

7.2. Interprétation des résultats

Si on a utilisé un ordinateur pour calculer les résultats, il faut que les valeurs des étalons se trouvent dans les 10 % des concentrations assignées.

8. RESULTATS

8.1. Remarque

La DO du standard 5 devrait être $\geq 1,0$.

La densité optique (D.O.s) de quelques étalons ou échantillons pourrait être supérieure à 2.0, dans ce cas, ils pourraient être hors de la gamme de mesure du lecteur de microplaque. Il est donc nécessaire, pour des D.O.s supérieures à 2.0, d'effectuer une lecture à 405 nm (=longueur d'onde du palier du pic principal) en plus de 450 nm (longueur d'onde du pic principal) et à 620nm (filtre de référence pour la soustraction des interférences dues au plastique).

Pour les lecteurs de microplaques non conçus pour lire la plaque à trois longueurs d'onde en même temps, il est conseillé de procéder de la façon suivante:

- Lire la microplaque à 450 nm et à 620 nm.
- Lire à nouveau la microplaque à 405 nm et à 620 nm.
- Trouver les puits dont les DOs à 450 nm sont supérieures à 2.0
- Sélectionner les DOs correspondantes lues à 405 nm et multiplier ces valeurs à 405 nm par le facteur de conversion 3.0 (où $DO_{450}/DO_{405} = 3.0$), qui est: $DO_{450\text{ nm}} = DO_{405\text{ nm}} \times 3.0$.

Attention: Le facteur de conversion 3.0 est seulement suggéré. Pour une meilleure précision, l'utilisateur est invité à calculer le facteur de conversion spécifique de son propre lecteur.

8.2. Extinction Moyenne

Calculer l'extinction moyenne (E_m) de chaque point de la courbe standard ($S_0 - S_5$) et de chaque échantillon.

8.3. Courbe Standard – Méthode automatique

Utiliser la « 4 parameters logistic » – préférée – ou bien la fonction « smoothed cubic spline » comme algorithme de calcul.

8.4. Courbe Standard – Méthode manuelle

Une courbe de réponse est utilisée pour déterminer la concentration en C-peptide dans un échantillon inconnu. Enregistrer les DO obtenues dans le tableau du lecteur de la microplaque. Faire le graphique des DO pour chaque standard dupliqué par rapport aux concentrations correspondantes en C-peptide en ng/ml sur papier ligné (ne pas faire la moyenne des duplications des étalons avant de plotter). Tracer la meilleure courbe qui s'approche des valeurs à travers les points dessinés. Pour déterminer la concentration de C-peptide pour un échantillon inconnu, localiser la DO moyenne des duplications des échantillons inconnus correspondants sur l'axe vertical du graphique,

trouver le point d'intersection sur la courbe et lire la concentration (en ng/ml) sur l'axe horizontal du graphique (on peut trouver la moyenne des duplications de l'échantillon inconnu comme indiqué).

9. VALEURS DE REFERENCE

Les valeurs de C-Peptide sont beaucoup plus hautes dans le plasma que dans le sérum; il est cependant préférable d'utiliser le sérum. Des valeurs ont été assignées en se basant sur les données cliniques en accord avec les travaux publiés dans la bibliographie.

Ces valeurs devraient être utilisées uniquement comme indication

Adultes (Sains) 0,7 – 1,9 ng/ml

10. PARAMETRES CARACTERISTIQUES

10.1. Précision

10.1.1. Intra-Test

La variabilité à l'intérieur du même kit a été déterminée en répliquant (20x) la détermination de trois différents sérums de contrôle. La variabilité intra-test a été de 5,14 à 8,43 %.

10.1.2. Inter-Tests

La variabilité entre kits différents a été déterminée en répliquant (20x) la détermination de trois différents sérums de contrôle avec deux kits appartenant à des lots différents. La variabilité inter-tests a été de 4,95 à 9,45 %.

10.2. Spécificité

L'anticorps utilisé présente les réactions croisées suivantes, évaluées par ajout de substances interférentes. La réactivité croisée a été calculée en dérivant le rapport entre doses de substances interférentes sur doses de C-peptide nécessaire pour obtenir la même absorbance.

C-Peptide	100 %
Proinsuline	1,2%
Insuline	0%
Glucagon	0%

10.3. Sensibilité

La concentration minimale en C-peptide mesurable est 0,025 ng/ml avec une limite de confiance de 95%.

10.4. Corrélation avec le dosage RIA

Le kit C-peptide (Zenit) a été comparé avec un kit disponible en commerce. 124 échantillons de sérum ont été testés.

La courbe de régression est:

$$y = 1,012 x + 0,0254$$

$$r = 0,99 \quad (r^2 = 0,98)$$

$$Y = \text{ZENIT}, X = \text{DPC}$$

11. DISPOSITIONS POUR L'ELIMINATION

Les réactifs doivent être éliminés en accord avec les lois locales.

BIBLIOGRAPHIE

- Eastham R.D: Biochemical Values in Clinical Medicine, 7th Ed. Bristol. England. Jonh Wright & Sons, Ltd.; (1985).
- Gerbitz, V.K.D, J.Clin.Chem.Biochem. 18, 313-326 (1980)
- Boehm TM, et al Diabetes Care 479-490. (1079)
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Procedure for the collection of diagnostic blood specimens by venipuncture: approved standards. 4th Ed. NCCLS Document H3-A4, Wayne, PA(1988).
- Turkinton RW, et al Archive of Internal Med. 142

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

SUGGESTIONS POUR LA RESOLUTION DES PROBLEMES /TROUBLESHOOTING

ERREURS CAUSES POSSIBLES/SUGGESTIONS

Aucune réaction colorimétrique de l'échantillon

- absence distribution du conjugué
- contamination du conjugué et/ou du substrat
- erreurs dans l'exécution de l'échantillon (ex. Distribution accidentelle des réactifs en séquence erronée ou provenant de flacons erronés, etc.)

Réaction trop faible (DO trop basses)

- conjugué non adéquat (ex. ne provenant pas du kit original)
- temps d'incubation trop bref, température d'incubation trop basse

Réaction trop intense (DO trop hautes)

- conjugué non adéquat (ex. ne provenant pas du kit original)

- temps d'incubation trop long, température d'incubation trop élevée
- mauvaise qualité de l'eau utilisée pour la solution de lavage (faible degré de déionisation)
- lavages insuffisants (conjugué non complètement enlevé)
- Valeurs inexplicables hors échelle**
- contamination de pipette, embouts ou récipients- lavages insuffisants (conjugué pas complètement enlevé)
- CV% intra-test élevé
- réactifs et/ou strip non portés à température ambiante avant l'utilisation
- le laveur pour microplaques ne lave pas correctement (suggestion: nettoyer la tête du laveur)
- CV% inter-test élevé
- conditions d'incubation non constantes (durée ou température)
- contrôles et échantillons non distribués en même temps (avec les mêmes intervalles) (contrôler la séquence de distribution)
- variabilité intrinsèque des opérateurs

Ed 10/2009

DE*Verwendete Symbole***EL***Επεξήγηση συμβόλων***EN***Explanation of symbols***ES***Explicación de los símbolos***FR***Explication des symboles***IT***Spiegazione dei simboli***PT***Significado dos símbolos*

	DE In-vitro-Diagnostikum EL In vitro διαγνωστική ιατρική συσκευή EN In vitro diagnostic medical device ES Para diagnóstico in vitro FR Dispositif médical de diagnostic in vitro IT Dispositivo di diagnostica in vitro PT Dispositivos médicos para diagnóstico in vitro		DE Hergestellt von EL Κατασκευαστής EN Manufacturer ES Fabricado por FR Fabriqué par IT Fabbrikante PT Produzido por
REF	DE Bestellnummer EL Αριθμός καταλόγου EN Catalogue number ES Número de catálogo FR Références du catalogue IT Numero di catalogo PT Número do catálogo	 yyyy-mm	DE Herstellungsdatum EL Ημερομηνία κατασκευής EN Date of manufacture ES Fecha de producción FR Date de fabrication IT Data di produzione PT Data de produção
 yyyy-mm-dd	DE Verwendbar bis (letzter Tag des Monats) EL Χρήση έως (η τελευταία ημέρα του μήνα) EN Use by (last day of the month) ES Fecha de caducidad (usar antes del último día del mes) FR Utiliser avant (dernier jour du mois indiqué) IT Utilizzare prima del (ultimo giorno del mese) PT Utilizar até (antes do último dia do mês)		DE Biogefährdung EL Βιολογικός κίνδυνος EN Biological risk ES Riesgo biológico FR Risque biologique IT Rischio biologico PT Risco biológico
 	DE Gebrauchsanweisung beachten EL Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης EN Read instructions for use ES Consultar las instrucciones de uso FR Consulter le mode d'emploi IT Consultare le istruzioni per l'uso PT Consultar instruções para uso		DE Chargenbezeichnung EL Αριθμός παρτίδας EN Batch code ES Código de lote FR Numéro de lot IT Codice del lotto PT Lote
 Σ = xx	DE Ausreichend für "n" Tests EL Το περιεχόμενο επαρκεί για "n" δοκιμασίες EN Contents for "n" tests ES Contenido suficiente para "n" ensayos FR Contenu suffisant pour "n" tests IT Contenuto sufficiente per "n" saggi PT Conteúdo suficiente para "n" testes		DE Inhalt EL Περιεχόμενο του κιτ EN Contents of kit ES Contenido del kit FR Contenu du coffret IT Contenuto del kit PT Conteúdo do kit
 Max Min	DE Temperaturbereich EL Όρια θερμοκρασίας EN Temperature interval ES Temperatura de conservación FR Limites de température de conservation IT Limiti di temperatura PT Intervalo de temperatura		

**Manufacturer:****DiaMetra S.r.l. Headquarter:**

Via Garibaldi, 18
20090 SEGRATE (MI)
Tel. 0039-02-2139184 - 02-26921595
Fax 0039-02-2133354.

Manufacturing site:

Via Giustozzi 35/35a
Z.I Paciana
06034 FOLIGNO (PG) ITALY.
Tel. 0039-0762-24864
Fax 0039-0762-316197
E-mail: info@diametra.com

**UK
UNITED KINGDOM**

Distributed by

A. Menarini Diagnostics Ltd
405 Wharfedale Road
Winkersley - Wokingham
Berkshire RG41 5RA

**DE
DEUTSCHLAND**

Vertrieb durch

A. Menarini Diagnostics
Eine Division der
Berlin-Chemie AG
Glienicke Weg 125
12489 Berlin

**EL
Διανέμεται στην**

ΕΛΛΑΔΑ από την

A. Menarini Diagnostics S.A.
575, Vouliagmenis Ave.
16451 Argynroupolis
Attiki

**ES
ESPAÑA**

Distribuido por

A. Menarini Diagnostics S.A.
Avenida del Maresme, 120
08918 Badalona
Barcelona

**FR
FRANCE**

Distribué par

A. Menarini Diagnostics
France S.A.R.L.
3-5, Rue du Jura
BP 70511
94633 Rungis Cedex

**IT
ITALIA**

Distribuito da

A. Menarini Diagnostics
Via Lungo l'Enza, 7
50012 Bagno a Ripoli
Firenze

**PT
PORTUGAL**

Distribuido por

A. Menarini Diagnósticos, Lda
Quinta da Fonte
Edifício D.Manuel I, 2ºB
2770-203 Paço de Arcos