



IGF-1-RIA-CT

KIP1588

Read entire protocol before use.

IGF-1-RIA-CT

I. INTENDED USE

Radioimmunoassay for the *in vitro* quantitative measurement of human Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1) in serum.

II. GENERAL INFORMATION

- A. **Proprietary name :** DIAsource IGF-1-RIA-CT Kit
- B. **Catalog number :** KIP1588 : 96 tests
- C. **Manufactured by :** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue de l'Industrie 8, B-1400 Nivelles, Belgium.

For technical assistance or ordering information contact :
Tel : +32 (0)67 88.99.99 Fax : +32 (0)67 88.99.96

III. CLINICAL BACKGROUND

A. Biological activities

Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) or Somatomedin-C (SM-C) is a basic 70 amino acid single chain polypeptide (MW : 7649 Da) similar to proinsulin (50% sequence homology), and to the other well-characterized member of the somatomedin family : IGF II (67AA, 70 % sequence homology with IGF-1). IGF-1 is the most important factor, which mediates the growth promoting actions of growth hormone, a pituitary hormone with highly fluctuating blood levels due to pulsatile release. The blood concentration of IGF-1 is more stable due to the binding to carrier proteins. The concentration of the predominant binding protein (MW 53000) as well as the production of IGF-1, are regulated by growth hormone. IGF-1 is produced by the liver, and other tissues, and it has endocrine, paracrine and autocrine activities. It stimulates growth and regulates differentiation of various tissues, displays insulin-like activities and promotes cartilage growth. Although GH is the most important factor controlling IGF-1 secretion and concentration, other factors are also determinant: the age (with a peak at adolescence), the sex, the nutritional status, and other hormones (oestrogen, thyroxin, prolactin, ...). Specific trophic stimuli mainly control IGF-1 secretion in the local microenvironment of a particular organ (paracrine activities), while blood IGF-1 concentration is the most important variable for balanced systemic growth (endocrine activities).

B. Clinical applications

· **Growth retardation:** Growth retardation may be due to several causes, among which deficient GH production (hypopituitarism), which is associated with low IGF-1 blood levels. Because of the difficulties to get interpretable results from GH measurements (by dynamic multiple or stimulation tests), the determination of the stable IGF-1 concentration in plasma is often considered as a simple screening test to evaluation "GH impregnation" of the patient before deciding more extensive investigations. In several clinical situations with impaired growth, low IGF-1 levels may be observed despite normal or high GH production (i.e. malnutrition, chronic diseases states, some genetic dwarfs like Pygmies, ...). Interestingly, children with discrete GH neuro-secretory dysfunction may display low IGF-1 values despite normal GH levels by conventional testing. The results of IGF-1 assay must be interpreted cautiously by considering the normal variations of IGF-1 during childhood and adolescence (see Rosenfeld et al).

· **Acromegaly:** IGF-1 levels are elevated in acromegaly (excess production of GH) and may serve as an indicator of disease severity. Results are more readily interpreted because the normal values are more easily defined in adults. IGF-1 measurements are also useful to monitor treatment.

· **Research:** The IGF-1 RIA kit is an invaluable tool to study the modifications of this growth factor during physiologic (i.e. pregnancy) or pathologic (i.e. diabetes) situations, and the local regulation of IGF-1 production in relation to its paracrine and autocrine activities (wound healing, organ regeneration, neoplastic growth, foetal development, gonadal regulation, etc).

IV. PRINCIPLES OF THE METHOD

In the present kit, DIASource has introduced a pre-treatment step in order to improve the clinical performance of the assay. It is well established that the binding proteins interfere with the radioimmunoassay for IGF-1. A fixed amount of ^{125}I labelled IGF-1 compete with the IGF-1 to be measured present in the sample or in the calibrator for a fixed amount of antibody sites immobilized on the wall of a polystyrene tube. After 2 hours incubation at room temperature with shaking, an aspiration step terminates the competition reaction. The tubes are then washed with 2 ml of washing solution and aspirated. A calibration curve is plotted and the IGF-1 concentrations of the samples are determined by dose interpolation from the calibration curve.

V. REAGENTS PROVIDED

Reagents	96 Test Kit	Colour Code	Reconstitution			
 Tubes coated with anti IGF-1	2 x 48	green	Ready for use			
<table border="1"><tr><td>Ag</td><td>125I</td><td>CONC</td></tr></table> TRACER: ¹²⁵Iodine labelled IGF-1 (HPLC grade) in phosphate buffer with bovine albumin and azide (<0.1%)	Ag	125I	CONC	1 vial 0.4 ml 300 kBq	red	Dilute 101x with Tracer Buffer (see section VII. C)
Ag	125I	CONC				
<table border="1"><tr><td>TRACER</td><td>BUF</td></tr></table> Tracer Buffer in phosphate buffer with bovine casein and azide (<0.1%)	TRACER	BUF	1 vial 25 ml	black	Ready for use	
TRACER	BUF					
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>0</td></tr></table> Zero calibrator in phosphate buffer with ovalbumin and gentamycin	CAL	0	1 vial lyophilised	yellow	Add 1 ml dilution buffer	
CAL	0					
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>N</td></tr></table> Calibrators - N = 1 to 5 (see exact values on vial labels) in phosphate buffer with ovalbumin and gentamycin Calibrators are prediluted	CAL	N	5 vials lyophilised	yellow	Add 1 ml dilution buffer	
CAL	N					
<table border="1"><tr><td>PRE</td><td>SOLN</td></tr></table> Pre-treatment Solution containing HCl 0.1N	PRE	SOLN	1 vial 5 ml	black	Ready for use	
PRE	SOLN					
<table border="1"><tr><td>DIL</td><td>BUF</td></tr></table> Dilution buffer containing Tris-HCl buffer with bovine casein and azide (<0.1%)	DIL	BUF	1 vial 50 ml	green	Ready for use	
DIL	BUF					
<table border="1"><tr><td>WASH</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table> Wash solution (TRIS-HCl)	WASH	SOLN	CONC	1 vial 10 ml	brown	Dilute 70 x with distilled water (use a magnetic stirrer).
WASH	SOLN	CONC				
<table border="1"><tr><td>CONTROL</td><td>N</td></tr></table> Controls - N = 1 or 2 in human serum with thymol	CONTROL	N	2 vials lyophilised	silver	Add 0.5 ml distilled water	
CONTROL	N					

Note : 1. Use the dilution buffer for sample dilutions.
2. 1 ng of the calibrator preparation is equivalent to 1 ng of the NIBSC 1st IRR 87/518.

VI. SUPPLIES NOT PROVIDED

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

- Distilled water
- Pipettes for delivery of: 50 μl , 100 μl , 200 μl , 500 μl , 1 ml and 3 ml (the use of accurate pipettes with disposable plastic tips is recommended)
- Plastic tubes for pre-treatment of samples
- Vortex mixer
- Magnetic stirrer
- 5 ml automatic syringe (Cornwall type) for washing
- Aspiration system (optional)
- Tube shaker (400 rpm)
- Any gamma counter capable of measuring ^{125}I may be used (minimal yield 70%).

VII. REAGENT PREPARATION

- Calibrators:** Reconstitute the zero calibrator and other calibrators with 1.0 ml dilution buffer.
- Controls:** Reconstitute the controls with 0.5 ml distilled water.
- Tracer solution :** Prepare an adequate volume of Tracer solution by adding 20 μl of Tracer to 2 ml of Tracer Buffer. Use a vortex to homogenize.

Example Tracer dilution

Number of tubes	Tracer (μl)	Tracer buffer (ml)	Tracer solution volume (ml)
24	50	5.0	5.050
48	100	10.0	10.100
72	150	15.0	15.150
96	200	20.0	20.200

Extemporaneous dilution of the tracer is required

- 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 kit components are stable until the expiry date, indicated on the label, if kept at 2 to 8°C.
- After reconstitution, calibrators and controls are stable for one week at 2 to 8°C. For longer storage periods, aliquots should be made and kept at -20°C for maximum 3 months. Avoid successive freezing and thawing.
- Freshly prepared Working Wash solution should be used on the same day.
- After its first use, tracer is stable until expiry date, if kept in the original well-closed vial at 2 to 8°C.
- Freshly prepared Tracer solution should be used on the same day.
- Alterations in physical appearance of kit reagents may indicate instability or deterioration.

IX. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATIONS

- Serum samples must be kept at 2 to 8°C.
- If the test is not run within 48 hrs, storage at -20°C is recommended.
- Avoid subsequent freeze-thaw cycles

X. PROCEDURE

- 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. In order to avoid cross-contamination, use a clean disposable pipette tip for the addition of each reagent and sample.
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.

- Pre-treatment step**
 - Label one plastic tube for each sample and control.
 - Dispense 50 μl of each sample and control into the tube.
 - Add 50 μl of pre-treatment solution into this tube.
 - Vortex each tube during 5 seconds.
 - Incubate 30 minutes at room temperature.
 - Add 1 ml of the dilution buffer into the tube.
 - Vortex each tube.

- Procedure**
 - Label coated tubes in duplicate for each calibrator, control and sample. For the determination of total counts, label 2 normal tubes.
 - Briefly vortex calibrators, controls and samples and dispense 100 μl of each into respective tubes.
 - Dispense 200 μl of Tracer solution into each tube, including the uncoated tubes for total counts.
 - Shake the tube rack gently by hand to liberate any trapped air bubbles.
 - Incubate for 120 minutes at room temperature on a tube shaker (400 rpm).
 - 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.
 - Wash tubes with 2 ml Working Wash solution (except total counts) and aspirate (or decant). Avoid foaming during the addition of the Working Wash solution.
 - Let the tubes stand upright for two minutes and aspirate the remaining drop of liquid.
 - 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 :

B/B0(%)= Counts (Calibrator or sample) / Counts (Zero Calibrator) x100

- 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 IGF-1 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 IGF-1 concentrations of the samples from the calibration curve.
- 6. For each assay, the percentage of total tracer bound in the absence of unlabelled IGF-1 (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.

IGF-1	cpm	B/Bo (%)
Total count	71038	
Calibrator		
0.0 ng/ml	38117	100.0
33.0 ng/ml	35753	93.8
81.4 ng/ml	30816	80.8
228.8 ng/ml	19914	52.2
640.2 ng/ml	10525	27.6
1529.0 ng/ml	5331	14.0

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 3.4 ng/ml.

B. Specificity

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

Compound	Cross-Reactivity (%)
IGF-1	100.0
IGF-II	0.7
Insuline	ND
GH	ND

Note: this table shows the cross-reactivity for the anti IGF-1.

C. Precision

INTRA-ASSAY PRECISION				INTER-ASSAY PRECISION			
Serum	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)	Serum	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)
A	20	36.1 ± 3.3	9.1	A	17	129.1 ± 11.6	9.0
B	20	81.4 ± 1.9	1.9	B	17	362.5 ± 14.9	4.1
C	20	402.8 ± 6.8	1.7				

SD: Standard Deviation; CV: Coefficient of variation

D. Accuracy

DILUTION TEST			
Sample	Dilution	Theoretical Concent. (ng/ml)	Measured Concent. (ng/ml)
Serum A	1/1	-	818
	1/2	409	418
	1/4	205	216
	1/8	102	110
	1/16	51	54
Serum B	1/1	-	501
	1/2	251	250
	1/4	125	130
	1/8	63	62
	1/16	31	26

Samples were diluted with the dilution buffer.

RECOVERY TEST			
Sample	Added IGF-1 (ng/ml)	Recovered IGF-1 (ng/ml)	Recovered (%)
C1	17	18	108
C2	53	55	104
C3	160	164	103
C4	382	411	107

Conversion factor:

From ng/ml to nmol/L: x 0.1307

From nmol/L to ng/ml: x 7.649

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.

Normal subjects

Age Group	MALES (ng/ml)			FEMALES (ng/ml)		
	Mean	Range	N	Mean	Range	N
0 - 2 years	102	73-184	14	98	59-143	3
3 - 5 years	124	103-189	7	159	84-447	9
6 - 8 years	177	115-249	9	276	79-432	10
9 - 11 years	362	181-656	9	272	175-445	8
12 - 14 years	315	168-557	10	418	202-1101	19
15 - 17 years	409	224-592	9	414	138-658	25
18 - 20 years	330	190-390	4	355	144-519	10
21 - 30 years	313	235-408	6	310	191-478	52
31 - 40 years	225	154-270	10	279	180-437	53
41 - 50 years	222	160-318	15	233	123-406	39
51 - 60 years	195	144-286	26	217	122-327	36
> 60 years	171	94-245	23	186	91-320	27

Rem : ranges are based on min – max values.

XVI. PRECAUTIONS AND WARNINGS

Safety

For in vitro diagnostic use only.

This kit contains ¹²⁵I (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. DAUGHADAY W.H. and ROTWEIN P. (1989)
Insulin-like growth factors I and II. peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum and tissue concentrations.
Endocrine Rev., 10(1) : 68-91.
2. FROESCH E.R. and ZAPF J. (1985)
Insulin-like growth factors and insulin : comparative aspects.
Diabetologia, 28 : 485-493.
3. FURLANETTO R.W., UNDERWOOD L., VAN WYK J.J., D'ERCOLE A.J. (1977)
Estimation of spmatomedin-C levels in normals and patients with pituitary disease by radioimmunoassay.
J. Clin. Invest. 60 : 648.
4. ROSENFELD R.G., WILSON D.M., LEE P.D.K. and HINTZ R.L. (1986)
Insulin-like growth factors I and II in evaluation of growth retardation.
J. Pediatr., 109 : 428.
5. RUDMAN D., KUTNER M.H. and CHAWLA R.K. (1985)
The short child with subnormal plasma somatomedin-C.
Pediatric Res., 19(10) : 975-980.
6. ALBERTSSON-WIKLAND K. and HALL K. (1987)
Growth hormone treatment in short children : relationship between growth and serum insulin-like growth factor I and II levels.
J. Clin. Endocrinol Metab., 65 : 671.
7. WASS J.A.H., CLEMMONS D.R., UNDERWOOD L.E., BARROW L., BESSER G.M. and VAN WYK J.J. (1982)
Changes in circulating somatomedin-C levels in bromocriptine treated acromegaly.
Clin. Endocrinol., 17 : 369-377.

8. DAUGHADAY W.H., MARIZ I.K. and BLETHEN S.L. (1980)
Inhibition of access of bound somatomedin to membrane receptor and immunobinding sites - a comparison of radioreceptor and radioimmunoassay of somatomedin in native and acid-ethanol extracted serum.
J. Clin. Endocrinol. Metab., 51 : 781.
9. BREIERB.H., GALLAHER B.W. and GLUCKMAN P.D. (1991)
Radioimmunoassay for insulin-like growth factor-I : solutions to some potential problems and pitfalls.
Journal of Endocrinology, 128 : 347-357.
10. SCHOUTEN J.S.A.G. and al. (1993)
IGF1 : a prognostic factor of knee osteoarthritis.
British J. Rheumatol., 32 : 274-280.
11. GRONBAEK H., SKJAERBAEK C., NIELSEN B., FRYSTYK J., FOEGH M.L., FLYVBJERG A., ORSKOV H. (1995)
Growth hormone and insulin-like growth factor-I: a suggested role in renal transplantation and graft vessel disease.
Transplant. Proceed., 27/3 : 2133-2136.
12. TSITOURAS P.D., ZHONG Y.G., SPUNGEN A.M., BAUMAN W.A. (1995)
Serum testosterone and growth hormone insulin-like growth factor-I in adults with spinal cord injury.
Hormone and metabolic Research , 27/6 : 287-292.
13. KOCH A., DORR H.G., GERLING S., BEHRENS R., BOHLES H.J. (1995)
Effect of growth hormone on IDF-I levels in patients with growth hormone deficiency and Wilson disease.
Hormone Research, 44/1 : 40-44.

XVIII. SUMMARY OF THE PROTOCOL

	TOTAL COUNTS µl	CALIBRATORS µl	SAMPLE(S) CONTROLS µl
<u>PRE-TREATMENT</u> Samples, controls Pre-treatment solution	- -	- -	50 50
Incubation	Vortex 5 seconds and incubate 30 minutes at room temperature		
Dilution buffer	-	-	1000
Shaking	Vortex		
<u>INCUBATION</u> Calibrators (0 to 5) Pre-treated Samples, controls Tracer solution	- - 200	100 - 200	- 100 200
Incubation	120 minutes at room temperature with shaking at 400 rpm		
Separation Working Wash solution Separation	-	Aspirate (or decant) 2.0 ml Aspirate (or decant)	
Counting	Count tubes for 60 seconds		

DIAsource Catalogue Nr : KIP1588	P.I. Number : 1700868/en	Revision nr : 1102041
-------------------------------------	-----------------------------	--------------------------

Lire entièrement le protocole avant utilisation.

IGF-1-RIA-CT

I. BUT DU DOSAGE

Trousse de dosage radio-immunologique pour la mesure quantitative *in vitro* du facteur de croissance insuline-like (IGF-1) dans le sérum humain.

II. INFORMATIONS GENERALES

- A. **Nom du produit :** DIAsource IGF-1-RIA-CT kit
- B. **Numéro de catalogue:** KIP1588 : 96 tests
- C. **Fabriqué par :** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue de l'Industrie, 8, B-1400 Nivelles, Belgique.

Pour une assistance technique ou une information sur une commande :

Tel : +32 (0)67 88.99.99

Fax : +32 (0)67 88.99.96

III. CONTEXTE CLINIQUE

A. Activités biologiques

Le facteur de croissance insuline-like (IGF-1) ou Somatomédine-C (SM-C) est un polypeptide basique de 70 acides aminés dans une chaîne unique (PM : 7649) similaire à la proinsuline (50% de homologie de séquence), et à l'autre membre bien caractérisé de la famille somatomédine : l'IGF II (67AA, 70 % de homologie de séquence avec l'IGF-1). L'IGF-1 est le facteur le plus important, qui intervient dans les actions de promotion de croissance de l'hormone de croissance, une hormone pituitaire avec des taux dans le sang très fluctuants dus à la sécrétion pulsatile. La concentration d'IGF-1 dans le sang est plus stable en raison de sa liaison à des protéines porteuses. La concentration de la protéine porteuse prédominante (PM 53000), ainsi que la production du IGF-1, sont régulées par l'hormone de croissance. L'IGF-1 est produit par le foie, et d'autres tissus, et a des activités endocrines, paracrines et autocrines. Il stimule la croissance et régule la différenciation de tissus divers, présente des activités insuline-like et stimule la croissance cartilagineuse. Bien que la GH soit le facteur le plus important dans le contrôle de la sécrétion et la concentration d'IGF-1, il y a d'autres facteurs déterminants : l'âge (avec un sommet à l'adolescence), le sexe, le statut nutritionnel, et d'autres hormones (l'œstrogène, la thyroxine, la prolactine, ...). Des stimulations trophiques spécifiques contrôlent principalement la sécrétion d'IGF-1 dans le microenvironnement d'un organe particulier (activités paracrines), tandis que la concentration d'IGF-1 dans le sang est la variable la plus importante pour la croissance systémique balancée (activités endocrines).

B. Applications cliniques

· **Retard de croissance:** Le retard de croissance peut être l'effet de différentes causes, comme une production de GH déficiente (hypopituitarisme), associée à des taux dans le sang d'IGF-1 bas. A cause de la difficulté d'obtenir des résultats interprétables des mesures de GH (par des tests dynamiques multiples ou de stimulation), la détermination de la concentration d'IGF-1 stable dans le plasma n'est considérée souvent que comme un test de base pour l'évaluation de « l'impregnation GH » du patient avant de décider des recherches plus détaillées. Dans beaucoup de situations avec une croissance retardée, des taux d'IGF-1 bas peuvent être observés malgré une production de GH normale ou élevée (à savoir la malnutrition, des maladies chroniques, quelques nains génétiques comme les Pygmées, ...). Chose intéressante : des enfants avec une dysfonction GH neuro-sécrétoire discrète peuvent présenter des taux d'IGF-1 bas, malgré des taux GH normaux avec des tests conventionnels. Les résultats du test IGF-1 doivent être interprétés prudemment en considérant les variations d'IGF-1 normaux lors de l'enfance et l'adolescence (voir Rosenfeld et al).

· **Acromégalie:** les taux d'IGF-1 sont élevés au cours de l'acromégalie (production excessive de GH) et peuvent servir comme un indicateur de la gravité de la maladie. Les résultats sont interprétés plus facilement parce que les taux normaux sont plus faciles à définir dans des adultes. Les mesures d'IGF-1 sont aussi utiles à suivre le traitement.

· **Recherche:** La trousse IGF-1 RIA est un instrument inestimable pour l'étude des modifications de ce facteur de croissance dans des situations physiologiques (à savoir la grossesse) ou pathologiques (à savoir le diabète), et la régulation locale de la production d'IGF-1 en relation avec ses activités paracrines et autocrines (guérison d'une blessure, régénération organique, croissance néoplastique, développement fœtal, régulation gonadale, etc).

IV. PRINCIPE DU DOSAGE

Dans la présente trousse, DIASource a introduit une phase pré-traitement afin d'améliorer les performances cliniques de la trousse. Il est prouvé que les protéines d'adhésion ont une influence sur la trousse radio-immunologique pour le dosage de la IGF-1. Une quantité fixe d'IGF-1 marquée à l'125I est en compétition avec l'IGF-1 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. Après 2 heures d'incubation à température ambiante sous agitation, le liquide est aspiré pour terminer la réaction de compétition. Les tubes sont lavés avec 2 ml de Solution de Lavage et aspirés à nouveau. Une courbe de calibration est réalisée et la concentration en IGF-1 des échantillons est déterminée par interpolation de la dose sur la courbe de calibration.

V. REACTIFS FOURNIS

Réactifs	96 Tests	Code couleur	Reconstitution			
 Tubes recouverts avec l'anti IGF-1	2 x 48	Vert	Prêt à l'emploi			
<table border="1"><tr><td>Ag</td><td>125I</td><td>CONC</td></tr></table> TRACEUR: IGF-1 marquée à l' ¹²⁵ Iodine (grade HPLC) dans un tampon phosphate avec de l'albumine bovine et de l'azide de sodium (<0,1%)	Ag	125I	CONC	1 flacon 0,4 ml 300 kBq	Rouge	Diluer 101x avec le Tampon Traceur (voir section VII. C)
Ag	125I	CONC				
<table border="1"><tr><td>TRACER</td><td>BUF</td></tr></table> Tampon du traceur dans un tampon phosphate avec de la caséine bovine et de l'azide (<0.1%)	TRACER	BUF	1 flacon 25 ml	noir	Prêt à l'emploi	
TRACER	BUF					
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>0</td></tr></table> Calibrateur zéro dans un tampon phosphate avec de l'ovalbumine et de la gentamycine	CAL	0	1 flacon lyophilisés	jaune	Ajouter 1 ml de Tampon de Dilution	
CAL	0					
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>N</td></tr></table> Calibrateurs IGF-1 - N = 1 à 5 (cfr. valeurs exactes sur chaque flacon) dans un tampon phosphate avec de l'ovalbumine et de la gentamycine. Les calibrateurs sont pré-dilués.	CAL	N	5 flacons lyophilisés	Jaune	Ajouter 1 ml de Tampon de Dilution	
CAL	N					
<table border="1"><tr><td>PRE</td><td>SOLN</td></tr></table> Solution de Pré-traitement contenant HCl 0,1 N	PRE	SOLN	1 flacon 5 ml	noir	Prêt à l'emploi	
PRE	SOLN					
<table border="1"><tr><td>DIL</td><td>BUF</td></tr></table> Tampon de Dilution: un tampon Tris-HCl avec de la caséine bovine et de l'azide de sodium (<0,1%)	DIL	BUF	1 flacon 50 ml	Vert	Prêt à l'emploi	
DIL	BUF					
<table border="1"><tr><td>WASH</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table> Solution de lavage (TRIS-HCl)	WASH	SOLN	CONC	1 flacon 10 ml	Brun	Diluer 70x avec de l'eau distillée (utiliser un agitateur magnétique).
WASH	SOLN	CONC				
<table border="1"><tr><td>CONTROL</td><td>N</td></tr></table> Contrôles - N = 1 ou 2 dans du sérum humain et thymol	CONTROL	N	2 flacons lyophilisés	Gris	Ajouter 0,5 ml d'eau distillée	
CONTROL	N					

Note : Utiliser le tampon de dilution pour la dilution des échantillons.
1 ng de la préparation du calibrateur est équivalent à 1 ng de NIBSC 1st IRR 87/518

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, 200 µl, 500 µl, 1 ml et 3 ml (l'utilisation de pipettes précises et de pointes jetables en plastique est recommandée)
- Des tubes en plastique pour le pré-traitement des échantillons.

- Agitateur vortex
- Agitateur magnétique
- Seringue automatique de 5 ml (type Cornwall) pour les lavages
- Système d'aspiration
- Agitateur de tubes (400 rpm)
- Tout compteur gamma capable de mesurer l'125I peut être utilisé (rendement minimum 70%).

VII. PREPARATION DES REACTIFS

- Calibrateurs:** Reconstituer les calibrateurs avec 1 ml de Tampon de Dilution.
- Contrôles :** Reconstituer les contrôles avec 0,5 ml d'eau distillée.
- Solution du traceur:** Préparer un volume adéquat de solution de Traceur en ajoutant 20 µl de Traceur à 2 ml de tampon du traceur. Utiliser un vortex pour homogénéiser.

Exemple de dilution du traceur

Nombre de tubes	Traceur (µl)	Tampon du traceur (ml)	Solution du traceur volume (ml)
24	50	5,0	5,050
48	100	10,0	10,100
72	150	15,0	15,150
96	200	20,0	20,200

La dilution du traceur est requise extemporanément.

- 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, les calibrateurs et les contrôles sont stables pendant 7 jours entre 2 et 8°C. Pour de plus longues périodes de stockage, des aliquots devront être réalisés et ceux-ci seront gardés 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.
- Après la première utilisation, le traceur est stable jusqu'à la date d'expiration, si celui-ci est conservé entre 2 et 8°C dans le flacon d'origine correctement fermé.
- 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 48 heures, un stockage à -20°C est recommandé.
- Eviter des cycles de congélation et décongélation successifs.

X. MODE OPERATOIRE

- 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 trousses 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.

- Phase de pré-traitement**
 - Identifier un tube en plastique pour chaque échantillon et contrôle.
 - Distribuer 50 µl de chaque échantillon et contrôle dans le tube.
 - Ajouter 50 µl de Solution de Pré-traitement à ce tube.
 - Agiter au vortex chaque tube pendant 5 secondes.
 - Incuber 30 minutes à température ambiante.
 - Distribuer 1 ml du Tampon de Dilution dans chaque tube.
 - Agiter au vortex chaque tube.
 -

C. Mode opératoire

- 1. 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.
- 2. Agiter au vortex brièvement les calibrateurs, les échantillons et les contrôles. Puis distribuer 100 µl de chacun d'eux dans leurs tubes respectifs.
- 3. Distribuer 200 µl de solution du traceur dans chaque tube, y compris les tubes sans anticorps pour la détermination de l'activité totale.
- 4. Agiter gentiment le portoir de tube pour libérer toute bulle d'air emprisonnée.
- 5. Incuber 2 heures à température ambiante sous agitation (400 rpm).
- 6. 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.
- 7. Laver les tubes avec 2 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.
- 8. Laisser les tubes droits pendant 2 minutes et aspirer le reste de liquide.
- 9. Placer les tubes dans un compteur gamma pendant 60 secondes pour quantifier la radioactivité.

XI. CALCUL DES RESULTATS

- 1. Calculer la moyenne de chaque détermination réalisée en double.
- 2. 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 :

$$B/B_0(\%) = \frac{\text{moyenne des cpm (CAL ou échantillon)}}{\text{moyenne des cpm (CAL 0)}} \times 100$$

- 3. Utiliser un "3 cycle semi-logarithmic" ou un papier graphique "logit-log", porter en ordonnée les valeurs exprimées en pourcentage de liaison (B/B0(%)) de chaque point de calibration et en abscisse leur concentration respective en IGF-1, écarter les valeurs aberrantes.
- 4. 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.
- 5. L'interpolation des valeurs de chaque échantillon (B/B0(%)) détermine les concentrations en IGF-1 à partir de la courbe de calibration.
- 6. Pour chaque essai, le pourcentage total de traceur lié en absence de IGF-1 non marquée (B0/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.

IGF-1		cpm	B/Bo (%)
Activité totale		71038	
Calibrateur	0,0 ng/ml	38117	100,0
	33,0 ng/ml	35753	93,8
	81,4 ng/ml	30816	80,8
	228,8 ng/ml	19914	52,2
	640,2 ng/ml	10525	27,6
	1529,0 ng/ml	5331	14,0

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 3,4 ng/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 (%)
IGF-1	100,0
IGF-II	0,7
Insuline	ND
GH	ND

Note: cette table montre la réactivité croisée pour l'anti-IGF-1

D. Précision

INTRA-ESSAI				INTER-ESSAI			
Sérum	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)	Sérum	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)
A	20	36,1 ± 3,3	9,1	A	17	129,1 ± 11,6	9,0
B	20	81,4 ± 1,9	1,9	B	17	362,5 ± 14,9	4,1
C	20	402,8 ± 6,8	1,7				

SD : Déviation Standard; CV: Coefficient de variation

D. Exactitude

TEST DE DILUTION			
Echantillon	Dilution	Concent. Théorique (ng/ml)	Concent. Mesurée (ng/ml)
Sérum A	1/1	-	818
	1/2	409	418
	1/4	205	216
	1/8	102	110
	1/16	51	54
Sérum B	1/1	-	501
	1/2	251	250
	1/4	125	130
	1/8	63	62
	1/16	31	26

L'échantillon a été dilué avec le Tampon de Dilution.

TEST DE RECUPERATION			
Echantillon	IGF-1 ajouté (ng/ml)	IGF-1 récupéré (ng/ml)	Recupération (%)
C1	17	18	108
C2	53	55	104
C3	160	164	103
C4	382	411	107

Facteur de conversion:

De ng/ml à nmol/L: x 0,1307

De nmol/L à ng/ml: x 7,649

XIV. CÔNTROLE QUALITE 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 duplicat des échantillons doivent être basés sur les pratiques de laboratoire courantes.

XIV. VALEURS ATTENDUES

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

Sujets normaux

Age	MASCULIN (ng/ml)			FEMININ (ng/ml)		
	Moyen	Portée	N	Moyen	Portée	N
0 - 2 ans	102	73-184	14	98	59-143	3
3 - 5 ans	124	103-189	7	159	84-447	9
6 - 8 ans	177	115-249	9	276	79-432	10
9 - 11 ans	362	181-656	9	272	175-445	8
12 - 14 ans	315	168-557	10	418	202-1101	19
15 - 17 ans	409	224-592	9	414	138-658	25
18 - 20 ans	330	190-390	4	355	144-519	10
21 - 30 ans	313	235-408	6	310	191-478	52
31 - 40 ans	225	154-270	10	279	180-437	53
41 - 50 ans	222	160-318	15	233	123-406	39
51 - 60 ans	195	144-286	26	217	122-327	36
> 60 ans	171	94-245	23	186	91-320	27

Remarque : les portées sont basées sur les valeurs min – max.

XV. PRECAUTIONS ET AVERTISSEMENTS

Sécurité

Pour utilisation en diagnostic *in vitro* uniquement.
Cette trousse contient de l'125I (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 composés 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. DAUGHADAY W.H. and ROTWEIN P. (1989)
Insulin-like growth factors I and II. peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum and tissue concentrations.
Endocrine Rev., 10(1) : 68-91.

2. FROESCH E.R. and ZAPF J. (1985)
Insulin-like growth factors and insulin : comparative aspects.
Diabetologia, 28 : 485-493.

3. FURLANETTO R.W., UNDERWOOD L., VAN WYK J.J., D'ERCOLE A.J. (1977)
Estimation of spmatomedin-C levels in normals and patients with pituitary disease by radioimmunoassay.
J. Clin. Invest. 60 : 648.

4. ROSENFELD R.G., WILSON D.M., LEE P.D.K. and HINTZ R.L. (1986)
Insulin-like growth factors I and II in evaluation of growth retardation.
J. Pediatr., 109 : 428.

5. RUDMAN D., KUTNER M.H. and CHAWLA R.K. (1985)
The short child with subnormal plasma somatomedin-C.
Pediatric Res., 19(10) : 975-980.

6. ALBERTSSON-WIKLAND K. and HALL K. (1987)
Growth hormone treatment in short children : relationship between growth and serum insulin-like growth factor I and II levels.
J. Clin. Endocrinol Metab., 65 : 671.

7. WASS J.A.H., CLEMMONS D.R., UNDERWOOD L.E., BARROW L., BESSER G.M. and VAN WYK J.J. (1982)
Changes in circulating somatomedin-C levels in bromocriptine treated acromegaly.
Clin. Endocrinol., 17 : 369-377.

8. DAUGHADAY W.H., MARIZ I.K. and BLETHEN S.L. (1980)
Inhibition of access of bound somatomedin to membrane receptor and immunobinding sites - a comparison of radioreceptor and radioimmunoassay of somatomedin in native and acid-ethanol extracted serum.
J. Clin. Endocrinol. Metab., 51 : 781.

9. BREIERB.H., GALLAHER B.W. and GLUCKMAN P.D. (1991)
Radioimmunoassay for insulin-like growth factor-I : solutions to some potential problems and pitfalls.
Journal of Endocrinology, 128 : 347-357.

10. SCHOUTEN J.S.A.G. and al. (1993)
IGF1 : a prognostic factor of knee osteoarthritis.
British J. Rheumatol., 32 : 274-280.

11. GRONBAEK H., SKJAERBAEK C., NIELSEN B., FRYSTYK J., FOEGH M.L., FLYVBJERG A., ORSKOV H. (1995)
Growth hormone and insulin-like growth factor-I: a suggested role in renal transplantation and graft vessel disease.
Transplant. Proceed., 27/3 : 2133-2136.

12. TSITOURAS P.D., ZHONG Y.G., SPUNGEN A.M., BAUMAN W.A. (1995)
Serum testosterone and growth hormone insulin-like growth factor-I in adults with spinal cord injury.
Hormone and metabolic Research , 27/6 : 287-292.

13. KOCH A., DORR H.G., GERLING S., BEHRENS R., BOHLES H.J. (1995)
Effect of growth hormone on IDF-I levels in patients with growth hormone deficiency and Wilson disease.
Hormone Research, 44/1 : 40-44.

XVIII. RESUME DU PROTOCOLE

	ACTIVITE TOTALE (µl)	CALIBRA- TEURS (µl)	ECHANTILLON(S) CONTROLES (µl)
<u>PRE-TRAITEMENT</u> Echantillons, contrôles Solution de Pré- traitement	- -	- -	50 50
Incubation	Vortex durant 7 seconds et Incuber 30 minutes à température ambiante		
Tampon de dilution	-	-	1000
Agiter	Vortex		
<i>INCUBATION</i> Calibrateurs (0 à 5) Echantillons pré-traités, contrôles Solution du traceur	- - 200	100 - 200	- 100 200
Incubation	2 heures à température ambiante sous agitation à 400 rpm		
Séparation Solution de Lavage Séparation	-	Aspiration (ou décanter) 2,0 ml Aspiration (ou décanter)	
Comptage (radioactivité)	Temps de comptage des tubes : 60 secondes		

Numéro de catalogue DIASource : KIP1588	Numéro de P.I.: 1700868/fr	Numéro de révision : 110204/1
--	-------------------------------	----------------------------------

Lees het hele protocol vóór gebruik.

IGF-1-RIA-CT

I. BEOOGD GEBRUIK

Radioimmunoassay voor de kwantitatieve bepaling *in vitro* van menselijke Insuline-achtige groeifactor-1 (IGF-1) in serum.

II. ALGEMENE INFORMATIE

- A. **Gedeponeerd handelsmerk:** DIASource IGF-1-RIA-CT kit
- B. **Catalogusnummer:** KIP1588: 96 testen.
- C. **Geproduceerd door:** DIASource ImmunoAssays S.A.
Rue de l'Industrie, 8, B-1400 Nivelles, België.

Voor technische assistentie of voor bestelinformatie
kunt u contact opnemen met :
Tel : +32 (0)67 88.99.99 Fax: +32 (0)67 88.99.96

III. KLINISCHE ACHTERGROND

- A. **Biologische activiteiten**
Insuline-achtige groeifactor 1 (IGF-1) of Somatomedine-C (SM-C) is een basisch polypeptide van 70 aminozuren in een enkele keten (MG : 7649 Da) gelijkaardig aan pro-insuline (50% sequentiehomologie), en aan het andere goed gekarakteriseerde lid van de somatomedine-familie: IGF II (67AA, 70 % sequentiehomologie met IGF-1). IGF-1 is de belangrijkste factor die de groeistimulerende acties van het groeihormoon bemiddelt, een hypofysehormoon met sterk fluctuerende bloedniveaus te wijten aan de pulsatiele vrijgave. De bloedconcentratie van IGF-1 is stabiel door de binding aan draagproteïnen. De concentratie van het dominante bindingsproteïne (MG 53000 Da) evenals de productie van IGF-1, worden geregeld door groeihormoon. IGF-1 wordt geproduceerd door de lever, en andere weefsels, en heeft endocriene, paracriene en autocriene activiteiten. Het stimuleert de groei en regelt de differentiatie van verschillende weefsels, vertoont insulineachtige activiteiten en bevordert kraakbeengroei. Hoewel GH de belangrijkste factor is in de controle van IGF-1 secretie en concentratie, zijn er ook andere determinerende factoren: de leeftijd (met een piek in de adolescentie), de sekse, de voedingsstatus, en andere hormonen (oestrogeen, thyroxine, prolactine, ...). Specifieke trofische stimuli controleren vooral IGF-1 secretie in de lokale micro-omgeving van een bepaald orgaan (paracriene activiteiten), terwijl de IGF-1 concentratie in bloed de belangrijkste variabele is voor gebalanceerde systemische groei (endocriene activiteiten).
- B. **Klinische toepassingen**
- **Groeivertraging:** Groeivertraging kan te wijten zijn aan verschillende oorzaken, waaronder deficiënte GH-productie (hypopituitarisme), wat geassocieerd wordt met lage IGF-1 bloedspiegel. O.w.v. de moeilijkheden om interpreteerbare resultaten te bekomen van GH bepalingen (door dynamische multiple of stimulatietesten), wordt de determinatie van de stabiele IGF-1 concentratie in plasma vaak beschouwd als een eenvoudige screening-test voor de evaluatie van "GH impregnatie" van de patiënt alvorens te besluiten tot uitgebreider onderzoek. In verschillende klinische situaties met gestoorde groei kunnen lage IGF-1 spiegels geobserveerd worden ondanks normale of hoge GH-productie (bv. ondervoeding, chronische ziekte toestanden, sommige genetische dwergen zoals pygmeeën, ...). Interessant genoeg kunnen kinderen met discrete GH neuro-afscheiding dysfunctie lage IGF-1-waarden vertonen ondanks normale GH-niveaus bij conventionele testen. De resultaten van de IGF-1 bepaling moeten voorzichtig geïnterpreteerd worden door het in overweging nemen van de normale variaties van IGF-1 tijdens de kindertijd en de adolescentie (zie Rosenfeld et al).
 - **Acromegalie:** IGF-1 spiegels zijn verhoogd bij acromegalie (excessieve productie van GH) en kunnen dienen als een indicator voor de ernst van de ziekte. Resultaten worden sneller geïnterpreteerd omdat de normale waarden gemakkelijker gedefinieerd worden bij volwassenen. IGF-1- bepalingen zijn ook nuttig om de behandeling op te volgen.
 - **Research:** De IGF-1 RIA kit is een onschatbaar instrument om de modificaties van deze groeifactor te bestuderen tijdens fysiologische (i.e. zwangerschap) of pathologische (i.e. diabetes) situaties, en de lokale regulering van IGF-1-productie in relatie met zijn paracriene and autocriene activiteiten (wondheling, regenereren van organen, neoplastische groei, foetale ontwikkeling, gonadale regulering, etc).

IV. BESCHRIJVING VAN DE METHODE

In deze kit heeft DIAsource een pre-behandelingsstap geïntroduceerd om de klinische prestatie van de bepaling te verbeteren. Het is duidelijk aangetoond dat de bindingproteïnen tussenkomen in het radioimmunoassay voor IGF-1. Een vaste hoeveelheid ¹²⁵I gelabeld IGF-1 concurreert met IGF-1 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. Na een incubatieperiode van 2 uur bij kamertemperatuur op een schudder, wordt de concurrentiereactie beëindigd door een aspiratiefase. Daarna worden de buisjes gewassen met 2 ml werk-wasoplossing en opnieuw afgezogen. Een kalibratiecurve wordt uitgezet en de concentraties van IGF-1 van de monsters worden bepaald door dosisinterpolatie van de kalibratiecurve.

V. GELEVERDE REAGENTIA

Reagens	Kit voor 96 testen	Kleur-code	Reconstitutie			
 Buisjes gecoat met anti IGF-1	2 x 48	Groen	Klaar voor gebruik			
<table border="1"><tr><td>Ag</td><td>125I</td><td>CONC</td></tr></table> Tracer : IGF-1 gelabeld met ¹²⁵ Jood (HPLC-kwaliteit) in fosfaat buffer met bovien albumine en azide (< 0,1%)	Ag	125I	CONC	1 flacon 0,4 ml 300 kBq	Rood	101x met Tracer Buffer verdunnen (zie sectie VII. C)
Ag	125I	CONC				
<table border="1"><tr><td>TRACER</td><td>BUF</td></tr></table> Tracer Buffer in fosfaat buffer met bovien caseïne en azide (<0.1%)	TRACER	BUF	1 flacon 25 ml	zwart	Klaar voor gebruik	
TRACER	BUF					
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>0</td></tr></table> Nulkalibrator in fosfaat buffer met ovalbumine en gentamycine	CAL	0	1 flacon, gevries- droogd	geel	1 ml Verdunningsbuffer toevoegen	
CAL	0					
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>N</td></tr></table> Kalibrators IGF-1 : N = 1 tot 5 (zie de exacte waarden op de flaconetiketten) in fosfaat buffer met ovalbumine en gentamycine Kalibrators zijn voorverdund	CAL	N	5 flacons, gevries- droogd	Geel	1 ml Verdunningsbuffer toevoegen	
CAL	N					
<table border="1"><tr><td>PRE</td><td>SOLN</td></tr></table> Pre-behandelingsoplossing die 0,1N HCl bevat	PRE	SOLN	1 flacon 5 ml	zwart	Klaar voor gebruik	
PRE	SOLN					
<table border="1"><tr><td>DIL</td><td>BUF</td></tr></table> Verdunningsbuffer: fosfaat buffer met bovien caseïne en azide (< 0,1%)	DIL	BUF	1 flacon 50 ml	groen	Klaar voor gebruik	
DIL	BUF					
<table border="1"><tr><td>WASH</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table> Wasoplossing 70x : TRIS-HCl	WASH	SOLN	CONC	1 flacon 10 ml	Bruin	70x met gedistilleerd water verdunnen (gebruik een magnetische roerder)
WASH	SOLN	CONC				
<table border="1"><tr><td>CONTROL</td><td>N</td></tr></table> Controlles : N = 1 of 2 in humaan serum met thymol	CONTROL	N	2 flacons, gevries- droogd	zilver	0,5 ml gedistilleerd water toevoegen	
CONTROL	N					

Opmerking: Gebruik de verdunningsbuffer voor monsterverdunningen. 1 ng van de kalibratorbereiding is gelijk aan 1 ng van NIBSC 1st IRR 87/518.

VI. NIET MEEGELEVERDE MATERIALEN

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

- Gedistilleerd water.
- Pipetten voor een volume van 50 µl, 100 µl, 200 µl, 500 µl, 1 ml en 3 ml (het gebruik van nauwkeurige pipetten met plastic wegwerptips wordt aanbevolen).
- Plastic tubes voor de pre-behandeling van de stalen.
- Vortexmenger.
- Magnetische roerder.
- Automatische spuit van 5 ml (type Cornwall) voor de wasfase.

- Afzuigsysteem (facultatief).
- Schudder voor de buisjes (400 rpm)
- Een gammateller die geschikt is voor de bepaling van ¹²⁵I. Een maximale efficiëntie moet worden gegarandeerd.

VII. BEREIDING VAN HET REAGENS

- Kalibrators:** Reconstitueer de kalibratoren met 1 ml verdunningsbuffer.
- Controles:** Reconstitueer de controles met 0,5 ml gedistilleerd water.
- Tracer Oplossing:** Bereid een voldoende hoeveelheid Tracer oplossing door 20 µl Tracer toe te voegen aan 2 ml Tracer Buffer. Gebruik een vortexmenger voor de homogenisering .

Voorbeeld verdunning Tracer

Aantal buisjes	Tracer (µl)	Tracer buffer (ml)	Volume Tracer oplossing (ml)
24	50	5,0	5,050
48	100	10,0	10,100
72	150	15,0	15,150
96	200	20,0	20,200

Het is noodzakelijk om de verdunning van de tracer net voor gebruik uit te voeren.

- Werk-wasoplossing:** Bereid een voldoende hoeveelheid werk-wasoplossing door 69 eenheden gedistilleerd 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 afgevoerd 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 zijn de kalibrators en de controles gedurende 7 dagen houdbaar bij 2 tot 8°C. Voor een langere bewaartermijn moeten aliquots gemaakt worden, die bij -20°C bewaard moeten worden voor maximaal 3 maanden. Vermijd herhaalde invriezing en ontdooiing.
- Een vers bereide werk-wasoplossing moet op dezelfde dag nog gebruikt worden.
- Na het eerste gebruik is de tracer houdbaar tot de vervaldatum, indien bewaard bij 2 tot 8°C in de oorspronkelijke, goed afgesloten flacon.
- Een vers bereide Tracer oplossing 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 bepaling niet binnen 48 uur uitgevoerd wordt, dan wordt aanbevolen om ze bij -20°C te bewaren.
- Vermijd herhaalde invriezing en ontdooiing.

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. Pre-behandelingsstap

- Etiketteam een plastic buisje voor elk staal en controle.
- Pipetteer 50 µl van elk monster en controle in het buisje.
- Voeg 50 µl van de pre-behandelingsoplossing toe in dit buisje.
- Vortex elk buisje gedurende 5 seconden.
- Incubeer 30 minuten bij kamertemperatuur.
- Pipetteer 1 ml verdunningsbuffer in elke tube.
- Vortex elk buisje.

C. Procedure

- Etiketteam de gecoate buisjes in duplo voor elke kalibrator, voor elk monster, voor elke controle. Etiketteam 2 normale buisjes voor de bepaling van de totaalcellingen.

- Vortex de kalibrators, monsters en controles gedurende korte tijd en pipetteer 100 µl van elk in het desbetreffende buisje.
- Pipetteer 200 µl Tracer oplossing in elk buisje, inclusief de niet gecoat buisjes voor de totaal tellingen.
- Schud het rek met de buisjes voorzichtig zodat eventuele ingesloten luchtballen vrijkomen.
- Incubeer 2 uur bij kamertemperatuur op een schudder (400 rpm).
- Zuig de inhoud van elk buisje (met uitzondering van de totaal tellingen) op Zorg ervoor dat de plastic tip van de aspirator tot aan de bodem van het gecoat buisje komt zodat alle vloeistof verwijderd wordt.
- Was de buisjes met 2 ml werk-wasvloeistof (met uitzondering van de totaal tellingen) en zuig op. Vermijd schuimvorming tijdens toevoeging van de werk-wasvloeistof.
- Na de wasfase moeten de buisjes gedurende twee minuten rechtop blijven staan en zuig daarna de overblijvende vloeistof op.
- Tel de buisjes in een gammateller gedurende 60 seconden.

XI. BEREKENING VAN DE RESULTATEN

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

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

- Zet de (B/B₀(%)) waarden uit voor elk kalibratorpunt, als een functie van de IGF-1 concentratie van elk kalibratorpunt, op 3-cyclisch semi-logaritmisch of dubbellogaritmisch papier, verwerp hierbij de duidelijke uitschieters.
- 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.
- Bepaal de IGF-1concentraties van de monsters uit de referentiecurve door de monsterwaarden (B/B₀(%)) te interpoleren.
- Voor elke bepaling moet het totaalpercentage van de tracer, gebonden in afwezigheid van ongelabeld IGF-1 (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 kalibratiecurve.

IGF-1	cpm	B/Bo (%)
Totaaltelling	71038	
Kalibrator		
0,0 ng/ml	38117	100,0
33,0 ng/ml	35753	93,8
81,4 ng/ml	30816	80,8
228,8 ng/ml	19914	52,2
640,2 ng/ml	10525	27,6
1529,0 ng/ml	5331	14,0

XIII. EIGENSCHAPPEN EN GRENZEN

A. Detectielimiet

Twintig nulkalibrators 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 3,4 ng/ml.

B. Specificiteit

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

Bestanddeel	Kruisreactiviteit (%)
IGF-1	100,0
IGF-II	0,7
Insuline	geen
GH	geen

Nota: deze tabel toont de kruisreactiviteit voor het anti IGF-1

C. Precisie

PRECISIE BINNEN EEN TEST				PRECISIE TUSSEN TESTEN			
Serum	N	<X> ± SD (ng/ml)	VC (%)	Serum	N	<X> ± SD (ng/ml)	VC (%)
A	20	36,1 ± 3,3	9,1	A	17	129,1 ± 11,6	9,0
B	20	81,4 ± 1,9	1,9	B	17	362,5 ± 14,9	4,1
C	20	402,8 ± 6,8	1,7				

SD: standaarddeviatie; VC: variatiecoëfficiënt

D. Nauwkeurigheid

VERDUNNINGSTEST			
Monster	Verdunning	Theoretische concentratie (ng/ml)	Concentratie die bepaald werd (ng/ml)
Serum A	1/1	-	818
	1/2	409	418
	1/4	205	216
	1/8	102	110
	1/16	51	54
Serum B	1/1	-	501
	1/2	251	250
	1/4	125	130
	1/8	63	62
	1/16	31	26

Monsters werden verdund met de Verdunningsbuffer.

RECOVERY-TEST			
Monster	IGF-1 toegevoegd (ng/ml)	Recovery van IGF-1 (ng/ml)	Recovery (%)
C1	17	18	108
C2	53	55	104
C3	160	164	103
C4	382	411	107

Conversiefactor:

Van ng/ml naar nmol/L: x 0,1307

Van nmol/L naar ng/ml: x 7,649

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.
- Aanvaardingscriteria voor het verschil tussen de resultaten in duplo van stalen 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.

Normale subjecten

Leeftijd	MANNEN (ng/ml)			VROUWEN (ng/ml)		
	Gemid-delde	Bereik	N	Gemid-delde	Bereik	N
0 - 2 jaar	102	73-184	14	98	59-143	3
3 - 5 jaar	124	103-189	7	159	84-447	9
6 - 8 jaar	177	115-249	9	276	79-432	10
9 - 11 jaar	362	181-656	9	272	175-445	8
12 - 14 jaar	315	168-557	10	418	202-1101	19
15 - 17 jaar	409	224-592	9	414	138-658	25
18 - 20 jaar	330	190-390	4	355	144-519	10
21 - 30 jaar	313	235-408	6	310	191-478	52
31 - 40 jaar	225	154-270	10	279	180-437	53
41 - 50 jaar	222	160-318	15	233	123-406	39
51 - 60 jaar	195	144-286	26	217	122-327	36
> 60 jaar	171	94-245	23	186	91-320	27

Opmerking: het bereik is gebaseerd op minimum – maximum waardes

XVI. VOORZORGSMAATREGELEN EN WAARSCHUWINGEN

Veiligheid

Uitsluitend voor in vitro diagnostisch gebruik.
Deze kit bevat ¹²⁵I (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 gesegregeerd 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 plasmamonsers 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 conserveermiddel) in contact komen met de huid. Azide in deze kit kan reageren met lood en koper in de afvoerleidingen en op die manier zeer explosieve 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. DAUGHADAY W.H. and ROTWEIN P. (1989)
Insulin-like growth factors I and II. peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum and tissue concentrations.
Endocrine Rev., 10(1) : 68-91.

2. FROESCH E.R. and ZAPF J. (1985)
Insulin-like growth factors and insulin : comparative aspects.
Diabetologia, 28 : 485-493.

3. FURLANETTO R.W., UNDERWOOD L., VAN WYK J.J., D'ERCOLE A.J. (1977)
Estimation of spmatomedin-C levels in normals and patients with pituitary disease by radioimmunoassay.
J. Clin. Invest. 60 : 648.

4. ROSENFELD R.G., WILSON D.M., LEE P.D.K. and HINTZ R.L. (1986)
Insulin-like growth factors I and II in evaluation of growth retardation.
J. Pediatr., 109 : 428.

5. RUDMAN D., KUTNER M.H. and CHAWLA R.K. (1985)
The short child with subnormal plasma somatomedin-C.
Pediatric Res., 19(10) : 975-980.

6. ALBERTSSON-WIKLAND K. and HALL K. (1987)
Growth hormone treatment in short children : relationship between growth and serum insulin-like growth factor I and II levels.
J. Clin. Endocrinol Metab., 65 : 671.

7. WASS J.A.H., CLEMMONS D.R., UNDERWOOD L.E., BARROW L., BESSER G.M. and VAN WYK J.J. (1982)
Changes in circulating somatomedin-C levels in bromocriptine treated acromegaly.
Clin. Endocrinol., 17 : 369-377.

8. DAUGHADAY W.H., MARIZ I.K. and BLETHEN S.L. (1980)
Inhibition of access of bound somatomedin to membrane receptor and immunobinding sites - a comparison of radioreceptor and radioimmunoassay of somatomedin in native and acid-ethanol extracted serum.
J. Clin. Endocrinol. Metab., 51 : 781.

9. BREIERB.H., GALLAHER B.W. and GLUCKMAN P.D. (1991)
Radioimmunoassay for insulin-like growth factor-I : solutions to some potential problems and pitfalls.
Journal of Endocrinology, 128 : 347-357.

10. SCHOUTEN J.S.A.G. and al. (1993)
IGF1 : a prognostic factor of knee osteoarthritis.
British J. Rheumatol., 32 : 274-280.

11. GRONBAEK H., SKJAERBAEK C., NIELSEN B., FRYSTYK J., FOEGH M.L., FLYVBJERG A., ORSKOV H. (1995)
Growth hormone and insulin-like growth factor-I: a suggested role in renal transplantation and graft vessel disease.
Transplant. Proceed., 27/3 : 2133-2136.

12. TSITOURAS P.D., ZHONG Y.G., SPUNGEN A.M., BAUMAN W.A. (1995)
Serum testosterone and growth hormone insulin-like growth factor-I in adults with spinal cord injury.
Hormone and metabolic Research , 27/6 : 287-292.

13. KOCH A., DORR H.G., GERLING S., BEHRENS R., BOHLES H.J. (1995)
Effect of growth hormone on IDF-I levels in patients with growth hormone deficiency and Wilson disease.
Hormone Research, 44/1 : 40-44.

XVIII. SAMENVATTING VAN HET PROTOCOL

	TOTAAL- TELLINGEN (µl)	KALIBRATORS (µl)	MONSTER(S) CONTROLES (µl)
<u>PRE-BEHANDELING</u>			
Monsters, controles	-	-	50
Pre-behandelingsoplossing	-	-	50
Incubatie	Vortex gedurende 7 seconden en Incubeer 30 minuten bij kamertemperatuur		
Verdunningsbuffer	-	-	1000
Schudden	Vortex		
<i>INCUBATIE</i>			
Kalibratoren (0 to 5)	-	100	-
Pre-behandelde	-	-	100
Monsters, controles			
Tracer oplossing	200	200	200
Incubatie	2 uur bij kamertemperatuur op een schudder (400 rpm)		
Scheiding	-	Opzuigen (of overgieten) 2,0 ml	
Werk-wasoplossing		Opzuigen (of overgieten)	
Scheiding			
Telling	Tel buisjes gedurende 60 seconden		

DIAsource catalogusnummer: KIP1588	Bijsluiternummer : 1700868/nl	Revisienummer : 110204/1
---------------------------------------	----------------------------------	-----------------------------

Vor Gebrauch des Kits lesen Sie bitte diese Packungsbeilage.

IGF-1-RIA-CT

I. VERWENDUNGSZWECK

Ein Radio-Immunoassay für die quantitative *in vitro* Bestimmung von humanem Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor 1 (IGF-1) in Serum.

II. ALLGEMEINE INFORMATION

- A. **Handelsbezeichnung :** DIAsource IGF-1-RIA-CT Kit
- B. **Katalognummer :** KIP1588 : 96 Tests
- C. **Hergestellt von:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue de l'Industrie, 8, B-1400 Nivelles, Belgien.

Für technische Unterstützung oder Bestellungen wenden Sie sich bitte an:

Tel : +32 (0)67 88.99.99 Fax : +32 (0)67 88.99.96

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

Der Insulin-ähnliche Wachstumsfaktor 1 (IGF-1) oder Somatomedin-C (SM-C) ist ein Polypeptid von 70 Aminosäuren (7650 Dalton) und ähnelt Proinsulin (50%ige Sequenzhomologie) und dem anderen gut charakterisierten Mitglied der Gruppe der Somatomedine: IGF-II (67AS, 70%ige Sequenzhomologie mit IGF-1). IGF-1 ist der wichtigste Faktor, der die wachstumsfördernden Effekte von Wachstumshormon (GH) beeinflusst, ein Hypophysenhormon mit starken Schwankungen der Konzentration im Blut, da es in Schüben ausgeschüttet wird. Die Konzentration von IGF-1 im Blut ist durch die Träger-Bindungsproteine stabiler. Die Konzentration des Hauptbindungsproteins (53000 Dalton) sowie die Produktion von IGF-1 werden durch Wachstumshormon gesteuert. IGF-1 wird von der Leber und anderen Geweben produziert. Er hat endokrine, parakrine und autokrine Wirkungen. Er stimuliert das Wachstum und reguliert die Differenzierung verschiedener Gewebe, zeigt Insulin-ähnliche Wirkungen und fördert das Wachstum von Knorpel. Obwohl GH der wichtigste Kontrollfaktor für die Sekretion und Konzentration des IGF-1 ist, gibt es noch andere determinierende Faktoren: Alter (mit einer Spitze in der Adoleszenz), Geschlecht, Nahrungsstatus und andere Hormone (Östrogen, Thyroxin, Prolaktin, usw.). Vor allem spezifische trophische Stimuli regulieren die IGF-1-Sekretion im lokalen Mikroumfeld eines bestimmten Organs (parakrine Wirkungen), während die IGF-1-Konzentration im Blut die wichtigste Variable für ein ausgeglichenes systemisches Wachstum ist (endokrine Wirkungen).

B. Klinische Anwendungen

- **Wachstumsretardierung:** Wachstumsretardierung kann mehrere Ursachen haben, unter anderem eine mangelnde Produktion von GH (Hypopituitarismus), die mit niedrigen IGF-1-Konzentrationen im Blut verbunden ist. Wegen der Schwierigkeit, interpretierbare Resultate aus GH-Messungen (durch dynamische, multiple oder Stimulationstests) zu erhalten, wird die Bestimmung der stabilen IGF-1-Konzentration im Plasma oft als einfacher Screeningtest zur Beurteilung der ‚GH-Imprägnation‘ des Patienten betrachtet, bevor zu extensiveren Untersuchungen übergegangen wird. In mehreren klinischen Situationen mit Wachstumsbehinderung können niedrige IGF-1-Konzentrationen trotz normaler oder hoher GH-Produktion beobachtet werden (z. B. Mangelernährung, chronische Krankheitszustände, manche Fälle genetisch bedingten Minderwuchses wie bei Pygmäen, usw.). Interessanterweise können Kinder mit diskontinuierlicher neurosekretorischer GH-Dysfunktion bei konventionellen Tests trotz eines normalen GH-Spiegels niedrige IGF-1-Werte aufweisen. Die Resultate des IGF-1-Assay müssen unter Berücksichtigung der normalen Schwankungen von IGF-1 während der Kindheit und Jugend vorsichtig interpretiert werden (siehe Rosenfeld et al).
- **Akromegalie:** Die IGF-1-Konzentrationen sind bei Akromegalie (überhöhter GH-Produktion) erhöht und können als Hinweis auf die Schwere der Krankheit dienen. Die Resultate werden leichter interpretiert, weil die Normalwerte bei Erwachsenen einfacher bestimmt werden. IGF-1-Messungen sind auch zur Kontrolle der Behandlung nützlich.
- **Forschung:** Der IGF-1-RIA-Kit ist ein unschätzbares Instrument zur Untersuchung der Veränderungen dieses Wachstumsfaktors während physiologischer (z. B. Schwangerschaft) oder pathologischer (z. B. Diabetes) Situationen sowie zur Untersuchung der lokalen Regulierung der IGF-1-Produktion in Bezug auf die parakrinen und autokrinen Wirkungen dieses Faktors (Wundheilung, Organregeneration, neoplastisches Wachstum, fetale Entwicklung, Steuerung der Gonaden, usw.).

IV. GRUNDSÄTZLICHES ZUR DURCHFÜHRUNG

Im vorliegenden Kit hat DIASource einen Vorbehandlungsschritt eingeführt, um die klinische Leistung des Assay zu steigern. Es wurde bereits nachgewiesen, dass die Bindungsproteine mit dem Radioimmunassay für IGF-1 interferieren. Eine festgesetzte Menge an ¹²⁵I markiertem IGF-1 konkurriert mit dem zu messenden, in der Probe oder in dem Standard vorhandenen IGF-1 um eine Menge an Antikörperbindungsstellen, die an der Wand des Polystyren Röhrchens fixiert sind. Nach einer zweistündigen Inkubation bei RT auf einem Schüttler, beendet das Absaugen die Verdrängungsreaktion. Die Röhrchen werden anschliessend mit Waschlösung gewaschen, danach wird nochmals abgesaugt. Eine Standardkurve wird gedruckt und die IGF-1-Konzentrationen der Proben werden über Dosis-Interpolation der Kalibrationskurve bestimmt.

V. MITGELIEFERTE REAGENZIEN

Reagenz	96 Test Kit	Farbcode	Rekonstitution			
 Mit anti IGF-1-beschichtete Röhrchen	2 x 48	grün	Gebrauchsfertig			
<table border="1"><tr><td>Ag</td><td>125I</td><td>CONC</td></tr></table> Tracer : ¹²⁵ Iod markiertes IGF-1 (HPLC grade) in Phosphatpuffer mit Rinder Albumin und Azid (<0,1%)	Ag	125I	CONC	1 Gefäß 0,4 ml 300 kBq	rot	Verdünnen Sie 101 x mit Tracerpuffer (siehe Abschnitt VII.C)
Ag	125I	CONC				
<table border="1"><tr><td>TRACER</td><td>BUF</td></tr></table> Tracerpuffer in Phosphatpuffer mit Rinderkasein und Azid (<0,1%)	TRACER	BUF	1 Gefäß 25 ml	Schwarz	Gebrauchsfertig	
TRACER	BUF					
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>0</td></tr></table> Null Kalibrator in Phosphatpuffer mit ovalbumin und gentamicin	CAL	0	1 Gefäß lyophilisiert	gelb	1 ml Verdünnungspuffer zugeben	
CAL	0					
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>N</td></tr></table> Standards IGF-1 : N = 1 bis 5 (genaue Werte auf Gefäß-Etiketten) in Phosphatpuffer mit ovalbumin und gentamicin Kalibratoren sind vorverdünnt	CAL	N	5 Gefäße lyophilisiert	gelb	1 ml Verdünnungspuffer zugeben	
CAL	N					
<table border="1"><tr><td>PRE</td><td>SOLN</td></tr></table> Vorbehandlungslösung mit HCl 0,1N	PRE	SOLN	1 Gefäß 5 ml	Schwarz	Gebrauchsfertig	
PRE	SOLN					
<table border="1"><tr><td>DIL</td><td>BUF</td></tr></table> Verdünnungspuffer: Tris-HCl Puffer mit Rinderkasein und Azid (<0,1%)	DIL	BUF	1 Gefäß 50 ml	grün	Gebrauchsfertig	
DIL	BUF					
<table border="1"><tr><td>WASH</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table> Waschlösung (TRIS-HCl)	WASH	SOLN	CONC	1 Gefäß 10 ml	braun	70x mit dest. Wasser (Magnetrührer verwenden) verdünnen .
WASH	SOLN	CONC				
<table border="1"><tr><td>CONTROL</td><td>N</td></tr></table> Kontrollen : N = 1 oder 2 in Humanserum und Thymol	CONTROL	N	2 Gefäße lyophilisiert	silber	0,5 ml dest. Wasser zugeben	
CONTROL	N					

Bemerkung: Verwenden Sie den Verdünnungspuffer für Probeverdünnungen. 1 ng der Standardzubereitung ist äquivalent zu 1 ng NIBSC 1st IRR 87/518.

VI. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL

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

1. Dest. Wasser
2. Pipetten: 50 µl, 100 µl, 200 µl, 500 µl, 1 ml und 3 ml (Verwendung von Präzisionspipetten mit Einwegpipettenspitzen wird empfohlen)
3. Kunststoffröhrchen zur Vorbehandlung von Proben
4. Vortexmixer
5. Magnetrührer
6. 5 ml automatische Spritze (Cornwall-Typ) zum Waschen
7. Absaugsystem (optional)
8. Schüttler für Röhrchen (400 rpm)
9. Jeder Gamma-Counter, der ¹²⁵I messen kann, kann verwendet werden. Maximale Messeffizienz sollte gewährleistet sein.

VII. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- A. **Standards:** Rekonstituieren Sie die Standards mit 1 ml Verdünnungspuffer.
- B. **Kontrollen:** Rekonstituieren Sie die Kontrollen mit 0,5 ml dest. Wasser.
- C. **Tracerlösung:** Eine geeignete Menge an Tracerlösung wird durch Zugabe von 20 µl Tracer zu 2 ml Tracerpuffer hergestellt. Benutzen Sie einen Vortex zur Homogenisierung.

Tracerverdünnung Beispiel

Anzahl der Röhrchen	Tracer (µl)	Tracerpuffer (ml)	Tracerlösung Gesamtvolumen (ml)
24	50	5,0	5,050
48	100	10,0	10,100
72	150	15,0	15,150
96	200	20,0	20,200

Die Verdünnung des Tracer muss kurz vor der Anwendung erfolgen.

- D. **Waschlösung:** Zur Vorbereitung eines angemessenen Volumens nutzbarer Waschlösung, mischen Sie zu einem Volumen Waschlösung (70x) 69 Volumen destilliertes 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 Rekonstitution sind die Kalibratoren und Kontrollen bei 2°C bis 8°C, 7 Tage stabil. Aliquots müssen bei längerer Aufbewahrung bei -20°C eingefroren werden während max. 3 Monaten. Vermeiden Sie wiederholtes Einfrieren und Auftauen.
- Die Waschlösung sollte frisch hergestellt und am selben Tag aufgebraucht werden.
- Wenn der Tracer nach der ersten Benutzung wieder im gutverschlossenen Originalgefäß bei 2 bis 8°C aufbewahrt wird, ist er bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar.
- Frisch zubereitete Tracerlösung sollte am selben Tag benutzt 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 48 Std. durchgeführt wird, müssen die Porben 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 Pipettiersystem 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. Vorbehandlungsschritt

1. Beschriften Sie je ein Plastikröhrchen für jede Probe und Kontrolle.
2. Geben Sie 50 µl jeder Probe und Kontrolle in das Röhrchen.
3. Pipettieren Sie 50 µl der Vorbehandlungslösung in dieses Röhrchen.
4. Vortexen Sie jedes Röhrchen 5 Sekunden lang.
5. Inkubieren Sie 30 Minuten bei Raumtemperatur.
6. Geben Sie 1 ml Verdünnungspuffer in jedes Röhrchen.
7. Vortexen Sie jedes Röhrchen.

C. Durchführung

1. Beschriften Sie je 2 beschichtete Röhrchen für jeden Kalibrator, jede Probe und jede Kontrolle. Zur Bestimmung der Gesamtaktivität, beschriften Sie 2 normale Röhrchen.
2. Vortexen Sie Kalibratoren, Proben und Kontrollen kurz und geben Sie 100 µl von jedem in ihre Röhrchen.
3. Geben Sie 200 µl des Tracerlösung in jedes Röhrchen
4. Schütteln Sie vorsichtig die Halterung mit den Röhrchen um Blasen zu entfernen.
5. Inkubieren Sie 2 Stunden bei Raumtemperatur unter ständigem Schütteln (400rpm).

6. 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.
7. Waschen Sie die Röhrchen mit 2 ml Waschlösung (außer Gesamtaktivität) und saugen Sie ab. Vermeiden Sie Schaumbildung bei Zugabe der Waschlösung.
8. Lassen Sie die Röhrchen 2 Minuten aufrecht stehen, und saugen Sie den verbleibenden Flüssigkeitstropfen ab.
9. Werten Sie die Röhrchen in einem Gamma-Counter 60 Sekunden aus.

XI. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

1. Berechnen Sie den Durchschnitt aus den Doppelbestimmungen.
2. Berechnen Sie die gebundene Radioaktivität als Prozentsatz des am Null-Standardpunkt (0) bestimmten Wertes nach folgender Formel:

$$B/B0 \text{ (}\%) = \frac{\text{Aktivität (Kalibrator oder Probe)}}{\text{Aktivität (Null-Kalibrator)}} \times 100$$

3. Verwenden Sie semi-logarithmisches oder doppelt-logarithmisches Millimeterpapier (über 3 Größenordnungen) drucken Sie die (B/B0(%)) Werte für jeden Standardpunkt als Funktion der IGF-1-Konzentration für jeden Standardpunkt, schließen Sie offensichtliche „Ausreißer“ aus.
4. Computergestützte Methoden können ebenfalls zur Erstellung der Kalibrationskurve verwendet werden. Falls die Ergebnisberechnung mit dem Computer durchgeführt wird, empfehlen wir die Berechnung mit einer „4 Parameter“-Kurvenfunktion.
5. Bestimmen Sie die IGF-1-Konzentrationen der Proben über Interpolation der Probenwerte B/B0(%) der Referenzkurve.
6. Bei jedem Assay muss der Prozentsatz des gesamten gebundenen Tracers ohne unmarkiertes IGF-1 (B0/T) geprüft werden.

XII. TYPISCHE WERTE

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

IGF-1	Cpm	B/Bo (%)
Gesamtaktivität	71038	
Kalibrator		
0,0 ng/ml	38117	100,0
33,0 ng/ml	35753	93,8
81,4 ng/ml	30816	80,8
228,8 ng/ml	19914	52,2
640,2 ng/ml	10525	27,6
1529,0 ng/ml	5331	14,0

XIII. LEISTUNGSMERKMALE UND GRENZEN DER METHODIK

A. Nachweisgrenze

Zwanzig Null-Standards wurden zusammen mit einem Satz anderer Standards gemessen.

Die Nachweisgrenze, definiert als die scheinbare Konzentration bei zwei Standardabweichungen unterhalb des gemessenen Durchschnittswerts bei Nullbindung, entsprach 3,4 ng/ml.

B. Spezifität

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

Substanz	Kreuzreaktivität (%)
IGF-I	100,0
IGF-II	0,7
Insulin	ND
GH	ND

Bemerkung: Diese Tabelle zeigt die Kreuzreaktivität für die anti-IGF-1.

C. Präzision

INTRA-ASSAY PRÄZISION				INTER-ASSAY PRÄZISION			
Serum	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)	Serum	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)
A	20	36,1 ± 3,3	9,1	A	17	129,1 ± 11,6	9,0
B	20	81,4 ± 1,9	1,9	B	17	362,5 ± 14,9	4,1
C	20	402,8 ± 6,8	1,7				

SD : Standardabweichung; CV: Variationskoeffizient

D. Genauigkeit

VERDÜNNUNGSTEST			
Probe	Verdünnung	Theoretische Konz. (ng/ml)	Gemessene Konz. (ng/ml)
Serum A	1/1	-	818
	1/2	409	418
	1/4	205	216
	1/8	102	110
	1/16	51	54
Serum B	1/1	-	501
	1/2	251	250
	1/4	125	130
	1/8	63	62
	1/16	31	26

Die Proben wurden mit Verdünnungspuffer verdünnt.

WIEDERFINDUNGSTEST			
Probe	Zugeg. IGF-1 (ng/ml)	Wiedergef. IGF-1 (ng/ml)	Wiedergefunden (%)
C1	17	18	108
C2	53	55	104
C3	160	164	103
C4	382	411	107

Umrechnungsfaktor:

Von ng/ml in nmol/L: x 0,1307

Von nmol/L in ng/ml: x 7,649

XIV. INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE

- Entsprechen die Ist-Werte nicht den auf den Fläschchen angegebenen Soll-Werten, können die Werte, ohne treffende Erklärung der 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.

Gesunde Personen

Altersgruppe	MÄNNER (ng/ml)			FRAUEN (ng/ml)		
	Mittelwert	Bereich	N	Mittelwert	Bereich	N
0 - 2 Jahre	102	73-184	14	98	59-143	3
3 - 5 Jahre	124	103-189	7	159	84-447	9
6 - 8 Jahre	177	115-249	9	276	79-432	10
9 - 11 Jahre	362	181-656	9	272	175-445	8
12 - 14 Jahre	315	168-557	10	418	202-1101	19
15 - 17 Jahre	409	224-592	9	414	138-658	25
18 - 20 Jahre	330	190-390	4	355	144-519	10
21 - 30 Jahre	313	235-408	6	310	191-478	52
31 - 40 Jahre	225	154-270	10	279	180-437	53
41 - 50 Jahre	222	160-318	15	233	123-406	39
51 - 60 Jahre	195	144-286	26	217	122-327	36
> 60 Jahre	171	94-245	23	186	91-320	27

Bemerkung: Die Bereiche basieren auf Min./Max.-Werten.

XV. VORSICHTMASSNAHMEN UND WARNUNGEN

Sicherheit

Nur für diagnostische Zwecke.

Dieser Kit enthält ¹²⁵I (Halbwertszeit: 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 USA erprobten FDA-Methoden getestet, sie waren negativ für HBsAg, anti-HCV und anti-HIV 1 und 2. Keine bekannte Methode kann jedoch vollkommene Sicherheit 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 Rindern 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 Abflußrohren reagieren und so hochexplosive Metallazide bilden. Spülen Sie während der Waschschrte 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. DAUGHADAY W.H. and ROTWEIN P. (1989)
Insulin-like growth factors I and II. peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum and tissue concentrations.
Endocrine Rev., 10(1) : 68-91.

2. FROESCH E.R. and ZAPF J. (1985)
Insulin-like growth factors and insulin : comparative aspects.
Diabetologia, 28 : 485-493.

3. FURLANETTO R.W., UNDERWOOD L., VAN WYK J.J., D'ERCOLE A.J. (1977)
Estimation of spmatomedin-C levels in normals and patients with pituitary disease by radioimmunoassay.
J. Clin. Invest. 60 : 648.

4. ROSENFELD R.G., WILSON D.M., LEE P.D.K. and HINTZ R.L. (1986)
Insulin-like growth factors I and II in evaluation of growth retardation.
J. Pediatr., 109 : 428.

5. RUDMAN D., KUTNER M.H. and CHAWLA R.K. (1985)
The short child with subnormal plasma somatomedin-C.
Pediatric Res., 19(10) : 975-980.

6. ALBERTSSON-WIKLAND K. and HALL K. (1987)
Growth hormone treatment in short children : relationship between growth and serum insulin-like growth factor I and II levels.
J. Clin. Endocrinol Metab., 65 : 671.

7. WASS J.A.H., CLEMMONS D.R., UNDERWOOD L.E., BARROW L., BESSER G.M. and VAN WYK J.J. (1982)
Changes in circulating somatomedin-C levels in bromocriptine treated acromegaly.
Clin. Endocrinol., 17 : 369-377.

8. DAUGHADAY W.H., MARIZ I.K. and BLETHEN S.L. (1980)
Inhibition of access of bound somatomedin to membrane receptor and immunobinding sites - a comparison of radioreceptor and radioimmunoassay of somatomedin in native and acid-ethanol extracted serum.
J. Clin. Endocrinol. Metab., 51 : 781.

9. BREIERB.H., GALLAHER B.W. and GLUCKMAN P.D. (1991)
Radioimmunoassay for insulin-like growth factor-I : solutions to some potential problems and pitfalls.
Journal of Endocrinology, 128 : 347-357.

10. SCHOUTEN J.S.A.G. and al. (1993)
IGF1 : a prognostic factor of knee osteoarthritis.
British J. Rheumatol., 32 : 274-280.

11. GRONBAEK H., SKJAERBAEK C., NIELSEN B., FRYSTYK J., FOEGH M.L., FLYVBJERG A., ORSKOV H. (1995)
Growth hormone and insulin-like growth factor-I: a suggested role in renal transplantation and graft vessel disease.
Transplant. Proceed., 27/3 : 2133-2136.

12. TSITOURAS P.D., ZHONG Y.G., SPUNGEN A.M., BAUMAN W.A. (1995)
Serum testosterone and growth hormone insulin-like growth factor-I in adults with spinal cord injury.
Hormone and metabolic Research , 27/6 : 287-292.

13. KOCH A., DORR H.G., GERLING S., BEHRENS R., BOHLES H.J. (1995)
Effect of growth hormone on IDF-I levels in patients with growth hormone deficiency and Wilson disease.
Hormone Research, 44/1 : 40-44.

XVIII.ZUSAMMENFASSUNG DES PROTOKOLLS

	GESAMT- AKTIVITÄT (µl)	KALIBRA- TOREN (µl)	PROBE(N)- KONTROLLEN (µl)
<u>VORBEHANDLUNG</u>			
Proben, Kontrollen	-	-	50
Vorbehandlungslösung	-	-	50
Inkubation	Vortex 5 Sekunden und Inkubieren Sie 30 Minuten bei Raumtemperatur		
Verdünnungspuffer	-	-	1000
Schütteln	Vortexen		
<i>INKUBATION</i>			
Kalibratoren (0 to 5)	-	100	-
Vorbehandelte	-	-	100
Proben, Kontrollen			
Tracerlösung	200	200	200
Inkubation	2 Stunden bei Raumtemperatur unter ständigem Schütteln (400 rpm)		
Separation	-	Absaugen (oder dekant.)	
Waschlösung	-	2,0 ml	
Separation	-	Absaugen (oder dekant.)	
Auswertung	Messen der Röhrchen 60 Sekunden		

DIAsource Katalognummer : KIT1588	Beipackzettel- nummer : 1700686/de	Nummer der Originalausgabe : 110204/1
---	---------------------------------------	---

Revisionsdatum : 2011-02-04

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

IGF-1-RIA-CT

I. USO DEL KIT

Kit radioimmunologico per la determinazione quantitativa in vitro del fattore di crescita insulinosimile I (IGF-1) in siero.

II. INFORMAZIONI DI CARATTERE GENERALE

- A. Nome commerciale:** DIASource IGF-1-RIA-CT Kit
- B. Numero di catalogo:** KIP1588: 96 test
- C. Prodotto da:** DIASource ImmunoAssays S.A.
Rue de l'Industrie, 8, B-1400 Nivelles, Belgio.

Per informazioni tecniche o su come ordinare il prodotto contattare:

Tel: +32 (0) 67 88.99.99

Fax: +32 (0) 67 88.99.96

III. INFORMAZIONI CLINICHE

A. Attività biologiche

Il fattore di crescita similinsulinico 1 (IGF-1) o somatomedina-C (SM-C) è un polipeptide basico a catena singola a 70 amminoacidi (MW : 7649) simile alla proinsulina (omologia nella sequenza del 50%) e all'altro elemento ben caratterizzato della famiglia delle somatomedine, l'IGF II (67AA, omologia nella sequenza del 70 % con l'IGF-1). L'IGF-1 è il fattore principale che controlla la crescita modulando le azioni dell'ormone della crescita, ormone ipofisario con livelli ematici altamente fluttuanti per il rilascio di tipo pulsatile. La concentrazione ematica di IGF-1 è maggiormente stabile per il legame con proteine carrier. La concentrazione della proteina legante predominante (MW 53000) e la produzione di IGF-1 vengono regolate dall'ormone della crescita. L'IGF-1 è prodotto dal fegato e da altri tessuti e svolge attività endocrine, paracrine e autocrine. Stimola la crescita e regola la differenziazione dei vari tessuti, dimostra attività insulinosimili e promuove la crescita delle cartilagini. Sebbene il GH rappresenti il principale fattore di controllo della secrezione e della concentrazione di IGF-1, anche altri fattori risultano determinanti: l'età (con un picco nella fase adolescenziale), il sesso, lo stato di nutrizione e altri ormoni (estrogeni, tiroxina, prolattina, ecc.). Gli stimoli trofici controllano principalmente la secrezione di IGF-1 nel microambiente specifico di un determinato organo (attività paracrine), mentre la concentrazione di IGF-1 nel sangue rappresenta la principale variabile della crescita sistemica bilanciata (attività endocrine).

B. Applicazioni cliniche

- **Ritardo della crescita:** Il ritardo della crescita può essere dovuto a cause gravi, tra le quali una carente produzione di GH (ipopituitarismo) associata a bassi livelli ematici di IGF-1. A causa delle difficoltà di interpretazione dei risultati ottenuti dalla misurazione del GH (tramite test di stimolazione o test multipli dinamici), la determinazione della concentrazione stabile di IGF-1 nel plasma viene spesso considerata alla stregua di un semplice test di screening volto alla valutazione "dell'impregnazione di GH" del paziente prima di decidere se procedere a indagini più estensive. Nei casi clinici gravi di deficit di crescita, è possibile riscontrare bassi livelli di IGF-1 anche in presenza di una produzione di GH normale o elevata (ossia malnutrizione, patologie croniche, nanismo genetico come nel caso dei pigmei, ecc.). È interessante notare che bambini con discreta disfunzione neuro-secretoria di GH possono mostrare bassi valori di IGF-1 anche in presenza di livelli di GH normali riscontrati durante i normali test. È necessario interpretare con molta cautela gli esiti del dosaggio di IGF-1 tenendo conto delle normali variazioni di IGF-1 durante l'infanzia e l'adolescenza (vedi Rosenfeld et al).
- **Acromegalia:** Nella acromegalia i livelli di IGF-1 sono elevati (eccesso di produzione di GH) e possono fungere da indicatore della gravità della malattia. I risultati sono più facili da interpretare in quanto i valori normali sono più facilmente definiti negli adulti. Le misurazioni di IGF-1 sono, inoltre, utili al monitoraggio del trattamento.
- **Ricerca:** Il kit IGF-1 RIA è un indispensabile strumento per lo studio delle modifiche del fattore della crescita in presenza di situazioni fisiologiche (gravidanza) o patologiche (diabete) e per lo studio della regolazione locale della produzione di IGF-1 rispetto alle sue attività paracrine e autocrine (cicatizzazione, rigenerazione di organi, crescita neoplastica, sviluppo fetale, regolazione delle gonadi, ecc.).

IV. PRINCIPIO DEL METODO

Nel presente kit, DAsource ha introdotto una fase di pre-trattamento per migliorare le caratteristiche cliniche del dosaggio. È stato ben stabilito che le proteine leganti interferiscono con il kit radioimmunologico per IGF-1. Una quantità definita di IGF-1 marcata con ¹²⁵I compete con il IGF-1 presente in calibratore e campioni per un numero definito di siti di un anticorpo adsorbito sulla superficie interna di provette di polistirene. Dopo 2 ore di incubazione in agitazione 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 IGF-1 nei campioni viene calcolata per interpolazione sulla curva calibratore.

V. REATTIVI FORNITI

Reattivi	Kit da 96 test	Codice colore	Volume di ricostituzione			
 Provette sensibilizzate con anticorpo anti IGF-1	2 x 48	verde	Pronte per l'uso			
<table border="1"><tr><td>Ag</td><td>125I</td><td>CONC</td></tr></table> Marcato: IGF-1 marcato con ¹²⁵ I (grado HPLC), in tampone fosfato con albumina bovina e sodio azide (<0,1%)	Ag	125I	CONC	1 flacone 0,4 ml 300 kBq	rosso	Diluire 101x con Tampone per Tracciante (vedi sezione VII. C)
Ag	125I	CONC				
<table border="1"><tr><td>TRACER</td><td>BUF</td></tr></table> Tampone per Tracciante in tampone fosfato con caseina bovina e sodio azide (<0,1%)	TRACER	BUF	1 flacone 25 ml	nero	Pronte per l'uso	
TRACER	BUF					
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>0</td></tr></table> Calibratore zero in tampone fosfato con ovalbumina e gentamicina	CAL	0	1 flacone liofilizzati	giallo	Aggiungere 1 ml di Tampone diluizione	
CAL	0					
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>N</td></tr></table> Calibratore 1-5 di IGF-1, (le concentrazioni esatte degli calibratore sono riportate sulle etichette dei flaconi), in tampone fosfato con ovalbumina e gentamicina I calibratori sono prediluiti	CAL	N	5 flaconi liofilizzati	giallo	Aggiungere 1 ml di Tampone diluizione	
CAL	N					
<table border="1"><tr><td>PRE</td><td>SOLN</td></tr></table> Soluzione di pretrattamento contenente HCl 0,1 N	PRE	SOLN	1 flacone 5 ml	nero	Pronte per l'uso	
PRE	SOLN					
<table border="1"><tr><td>DIL</td><td>BUF</td></tr></table> Tampone diluizione: tampone fosfato con caseina bovina e sodio azide (<0,1%)	DIL	BUF	1 flacone 50 ml	verde	Pronte per l'uso	
DIL	BUF					
<table border="1"><tr><td>WASH</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table> Tampone di lavaggio (TRIS-HCl)	WASH	SOLN	CONC	1 flacone 10 ml	bruno	Diluire 70 x con acqua distillata usando un agitatore magnetico
WASH	SOLN	CONC				
<table border="1"><tr><td>CONTROL</td><td>N</td></tr></table> Controlli: N = 1 o 2, in siero umano e timolo	CONTROL	N	2 flaconi liofilizzati	argento	Aggiungere 0,5 ml di acqua distillata	
CONTROL	N					

Nota : usare il tampone diluizione per diluizioni campione.
1 ng della preparazione standard è equivalente a 1 ng di NIBSC 1st IRR 87/518.

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, 200 µl, 500 µl, 1 ml e 3 ml (Si raccomanda di utilizzare pipette accurate con puntale in plastica monouso).
 - Provette di plastica per campioni pre-trattamento
 - Agitatore tipo vortex.
 - Agitatore magnetico.

- Pipetta a ripetizione automatica 5 ml per i lavaggi.
- Sistema di aspirazione dei campioni (facoltativo).
- Agitatore rotante (400 rpm)
- Contatore gamma con finestra per ¹²⁵I (efficienza minima 70%)

VII. PREPARAZIONE DEI REATTIVI

- Calibratore:** Ricostituire i calibratore con 1 ml di Tampone diluizione.
- Controlli:** Ricostituire i controlli con 0,5 ml di acqua distillata.
- Soluzione del Tracciante:** Preparare un adeguato volume della soluzione del Tracciante aggiungendo 20 µl di Tracciante a 2 ml di Tampone per Tracciante. Utilizzare un vortex per omogeneizzare.

Esempio di diluizione del Tracciante

Numero di provette	Tracciante (µl)	Tampone per Tracciante (ml)	Volume della soluzione del Tracciante (ml)
24	50	5,0	5,050
48	100	10,0	10,100
72	150	15,0	15,150
96	200	20,0	20,200

E' necessaria la diluizione estemporanea del tracciante.

- 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 recostituzione, calibratore e controlli sono stabili 7 giorni a 2-8°C e suddivisi in aliquote a -20°C per periodi pi? lunghi per 3 mesi. Evitare ripetuti cicli di congelamento-scongelo.
- La soluzione di lavoro del tampone di lavaggio deve essere preparata fresca ogni volta e usata nello stesso giorno della preparazione.
- Dopo apertura del flacone, il marcato è stabile fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta, se conservato a 2-8°C nel flacone originale ben tappato.
- La soluzione del Tracciante appena preparata dovrà essere utilizzata in giornata.
- 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 48 ore dal prelievo, si raccomanda di conservare i campioni a -20°C.
- Evitare ripetuti cicli di congelamento-scongelo dei campioni.

X. METODO DEL DOSAGGIO

- 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 usi 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.

- Fase di pre-trattamento**
 - Numerare una provetta di plastica per ogni campione e controllo.
 - Dispensare 50 µl di ogni campione e controllo nella provetta.
 - Aggiungere 50 µl di soluzione di pre-trattamento in questa provetta.
 - Agitare su vortex ogni provetta per 5 secondi.
 - Incubare 30 minuti a temperatura ambiente
 - Dispensare 1 ml di tampone di diluizione in ciascuna provetta.
 - Agitare su vortex ogni provetta.
- Metodo del dosaggio**
 - Numerare le provette sensibilizzate necessarie per dosare in duplicato ogni calibratore, campione o controllo. Numerare 2 provette non sensibilizzate per la determinazione dell'attività totale.

2.

Agitare brevemente su vortex calibratore, campioni e controlli. Dispensare 100 µl di calibratore, campioni e controlli nelle rispettive provette.
3.

Dispensare 200 µl di soluzione del Tracciante in tutte le provette, comprese quelle per l'attività totale.
4.

Scuotere gentilmente il portaprovette per liberare eventuali bolle d'aria intrappolate nel liquido contenuto nelle provette.
5.

Incubare 2 ore in agitazione a temperatura ambiente (400rpm)
6.

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.
7.

Lavare tutte le provette, tranne quelle per l'attività totale, con 2 ml di soluzione di lavoro di tampone di lavaggio, evitando di provocare la formazione di schiuma.
8.

Lasciare decantare le provette in posizione verticale per due minuti circa e aspirare eventuali gocce di liquido residue.
9.

Contare tutte le provette per 1 minuto con il contatore gamma.

XI. CALCOLO DEI RISULTATI

1.

Calcolare la media delle determinazioni in duplicato.
2.

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 (%) =

cpm (Calibratore, campioni o controlli)

cpm (Zero Calibratore)

x 100

3.

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 IGF-1, 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 IGF-1.
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 IGF-1 in campioni e controlli al posto della curva calibratore eseguita contemporaneamente.

IGF-1		cpm	B/Bo (%)
Attività totale		71038	
Calibratore	0,0 ng/ml	38117	100,0
	33,0 ng/ml	35753	93,8
	81,4 ng/ml	30816	80,8
	228,8 ng/ml	19914	52,2
	640,2 ng/ml	10525	27,6
	1529,0 ng/ml	5331	14,0

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 3,4 ng/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 (%)
IGF-1	100,0
IGF-II	0,7
Insulina	Nessuno
GH	Nessuno

Nota : questa tabella mostra la cross-reattività relativa all’anti IGF-1

C. Precisione

INTRA SAGGIO				INTER SAGGIO			
Siero	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)	Siero	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)
A	20	36,1 ± 3,3	9,1	A	17	129,1 ± 11,6	9,0
B	20	81,4 ± 1,9	1,9	B	17	362,5 ± 14,9	4,1
C	20	402,8 ± 6,8	1,7				

SD : Deviazione Standard; CV: Coefficiente di Variazione

D. Accuratezza

TEST DI DILUIZIONE			
Campione	Diluizione	Concentrazione teorica (ng/ml)	Concentrazione misurata (ng/ml)
Siero A	1/1	-	818
	1/2	409	418
	1/4	205	216
	1/8	102	110
	1/16	51	54
Siero B	1/1	-	501
	1/2	251	250
	1/4	125	130
	1/8	63	62
	1/16	31	26

I campioni sono stati diluiti con tampone di diluizione.

TEST DI RECUPERO			
Campione	IGF-1 aggiunto (ng/ml)	IGF-1 recuperato (ng/ml)	Recupero (%)
C1	17	18	108
C2	53	55	104
C3	160	164	103
C4	382	411	107

Fattore di conversione:

Da ng/ml a nmol/l: x 0,1307

Da nmol/l a ng/ml: x 7,649

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 duplicato 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.

Soggetti normali

Gruppo di età	MASCHI(ng/ml)			FEMMINE (ng/ml)		
	Media	Intervallo	N	Media	Intervallo	N
0 - 2 anni	102	73-184	14	98	59-143	3
3 - 5 anni	124	103-189	7	159	84-447	9
6 - 8 anni	177	115-249	9	276	79-432	10
9 - 11 anni	362	181-656	9	272	175-445	8
12 - 14 anni	315	168-557	10	418	202-1101	19
15 - 17 anni	409	224-592	9	414	138-658	25
18 - 20 anni	330	190-390	4	355	144-519	10
21 - 30 anni	313	235-408	6	310	191-478	52
31 - 40 anni	225	154-270	10	279	180-437	53
41 - 50 anni	222	160-318	15	233	123-406	39
51 - 60 anni	195	144-286	26	217	122-327	36
> 60 anni	171	94-245	23	186	91-320	27

Nota : gli intervalli sono basati su valori min – max.

XVI. PRECAUZIONI PER L'USO

Sicurezza
Il kit è solo per uso diagnostico in vitro.
Il kit contiene ¹²⁵I (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. E' 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. DAUGHADAY W.H. and ROTWEIN P. (1989)
Insulin-like growth factors I and II. peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum and tissue concentrations.
Endocrine Rev., 10(1) : 68-91.

2. FROESCH E.R. and ZAPF J. (1985)
Insulin-like growth factors and insulin : comparative aspects.
Diabetologia, 28 : 485-493.

3. FURLANETTO R.W., UNDERWOOD L., VAN WYK J.J., D'ERCOLE A.J. (1977)
Estimation of spmatomedin-C levels in normals and patients with pituitary disease by radioimmunoassay.
J. Clin. Invest. 60 : 648.

4. ROSENFELD R.G., WILSON D.M., LEE P.D.K. and HINTZ R.L. (1986)
Insulin-like growth factors I and II in evaluation of growth retardation.
J. Pediatr., 109 : 428.

5. RUDMAN D., KUTNER M.H. and CHAWLA R.K. (1985)
The short child with subnormal plasma somatomedin-C.
Pediatric Res., 19(10) : 975-980.

6. ALBERTSSON-WIKLAND K. and HALL K. (1987)
Growth hormone treatment in short children : relationship between growth and serum insulin-like growth factor I and II levels.
J. Clin. Endocrinol Metab., 65 : 671.

7. WASS J.A.H., CLEMMONS D.R., UNDERWOOD L.E., BARROW L., BESSER G.M. and VAN WYK J.J. (1982)
Changes in circulating somatomedin-C levels in bromocriptine treated acromegaly.
Clin. Endocrinol., 17 : 369-377.

8. DAUGHADAY W.H., MARIZ I.K. and BLETHEN S.L. (1980)
Inhibition of access of bound somatomedin to membrane receptor and immunobinding sites - a comparison of radioreceptor and radioimmunoassay of somatomedin in native and acid-ethanol extracted serum.
J. Clin. Endocrinol. Metab., 51 : 781.

9. BREIERB.H., GALLAHER B.W. and GLUCKMAN P.D. (1991)
Radioimmunoassay for insulin-like growth factor-I : solutions to some potential problems and pitfalls.
Journal of Endocrinology, 128 : 347-357.

10. SCHOUTEN J.S.A.G. and al. (1993)
IGF1 : a prognostic factor of knee osteoarthritis.
British J. Rheumatol., 32 : 274-280.

11. GRONBAEK H., SKJAERBAEK C., NIELSEN B., FRYSTYK J., FOGH M.L., FLYVBJERG A., ORSKOV H. (1995)
Growth hormone and insulin-like growth factor-I: a suggested role in renal transplantation and graft vessel disease.
Transplant. Proceed., 27/3 : 2133-2136.

12. TSITOURAS P.D., ZHONG Y.G., SPUNGEN A.M., BAUMAN W.A. (1995)
Serum testosterone and growth hormone insulin-like growth factor-I in adults with spinal cord injury.
Hormone and metabolic Research , 27/6 : 287-292.

13. KOCH A., DORR H.G., GERLING S., BEHRENS R., BOHLES H.J. (1995)
Effect of growth hormone on IDF-I levels in patients with growth hormone deficiency and Wilson disease.
Hormone Research, 44/1 : 40-44.

XVIII. SCHEMA DEL DOSAGGIO

	Attività totale ml	Calibratore ml	Campioni Controlli ml
<u>PRE-TRATTAMENTO</u>			
Campioni, Controlli	-	-	50
Soluzione di pre- trattamento	-	-	50
Incubazione	Agitare per 7 secondi e Incubare 30 minuti a temperatura ambiente		
Tampone diluizione	-	-	1000
Agitazione	Vortex		
<i>INCUBAZIONE</i>			
Calibratore (0 to 5)	-	100	-
Campioni pretrattati, controlli	-	-	100
Soluzione del Tracciante	200	200	200
Incubazione	Dopo 2 ore in agitazione a temperatura ambiente (400 rpm)		
Separazione		Aspirare (o decantare) 2 ml	
Soluzione di lavoro del tampone di lavaggio		Aspirare (o decantare)	
Separazione			
Conteggio	Contare le provette per 1 minuto		

Numero di catalogo di DIAsource : KIP1588	P.I. numero : 1700868/it	Revisione numero : 110204/1
--	-----------------------------	--------------------------------

Leer el protocolo completo antes de usar.

IGF-1-RIA-CT

I. INSTRUCCIONES DE USO

Radioinmunoensayo para la determinación cuantitativa in vitro del factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1) humano en suero.

II. INFORMACIÓN GENERAL

- A. **Nombre:** DIAsource IGF-1-RIA-CT Kit
- B. **Número de Catálogo:** KIP1588: 96 tests
- C. **Fabricado por:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue de l'Industrie, 8, B-1400 Nivelles, Bélgica.

Para cuestiones técnicas e información sobre pedidos contactar:

Tel.: +32 (0)67 88.99.99

Fax: +32 (0)67 88.99.96

III. INFORMACIÓN CLÍNICA

A. Actividades biológicas

El factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1) o somatomedina-C (SM-C) es un péptido básico con una sola cadena proteica de 70 aminoácidos (PM : 7649) similar a la proinsulina (50% de homología de secuencia), y al otro miembro bien caracterizado de la familia somatomedina: IGF II (67AA, 70 % de homología de secuencia con el IGF-1). El IGF-1 es el factor más importante que interviene en las acciones promotoras del crecimiento de la hormona de crecimiento, una hormona pituitaria con niveles de sangre muy fluctuantes debidos a la secreción pulsátil. La concentración en sangre del IGF-1 es más estable debido a la conjugación a proteínas transportadoras. La concentración de la proteína ligadora predominante (PM 53000) así como la producción del IGF-1, son reguladas por la hormona de crecimiento. El IGF-1 es producido por el hígado, y otros tejidos, y tiene actividades endocrinas, paracrinas y autocrinas. Estimula el crecimiento y regula la diferenciación de varios tejidos, cumple actividades similares a las de insulina y estimula el crecimiento del cartílago. Aunque GH es el factor más importante para el control de la secreción y la concentración del IGF-1, otros factores también son determinantes: la edad, (con un cumbre en la adolescencia), el sexo, el estatuto nutricional, y otras hormonas (estrógeno, tiroxina, prolactina,...). Estímulos tróficos específicos controlan principalmente la secreción del IGF-1 en el microcontexto local de un órgano particular (actividades paracrinas), y la concentración del IGF-1 en sangre es la variable más importante para el crecimiento sistémico equilibrado (actividades endocrinas).

B. Aplicaciones clínicas

Retraso de crecimiento: el retraso del crecimiento puede ser causado por causas diferentes, como la deficiencia de la producción de GH (hipopituitarismo), que se asocia a niveles bajos de IGF-1 en la sangre. Dado que obtener resultados interpretables de las mediciones de GH es difícil (por ensayos dinámicos múltiples o estimuladores), la determinación de la concentración de IGF-1 estable es frecuentemente considerada como un ensayo simple para la evaluación de la «impregnación de GH» del paciente antes de decidir investigaciones más extensivas. Pueden observarse niveles bajos de IGF-1 en la sangre en muchas situaciones clínicas con un crecimiento retrasado, a pesar de una producción normal o elevada de GH (malnutrición, estados de enfermedades crónicas, enanos genéticos como pigmeos, ...). Interesante: niños con una disfunción discreta neurosecretoria de GH pueden presentar niveles bajos de IGF-1 a pesar de niveles normales en ensayos convencionales. Los resultados del ensayo IGF-1 se deben interpretar con precaución, considerando las variaciones normales del IGF-1 en la infancia y la pubertad (ver Rosenfeld et al).

· **Acromegalia:** los niveles de IGF-1 son elevados en acromegalia (producción excesiva de GH) y pueden ser un indicador de la gravedad de la enfermedad. Los resultados se interpretan más fácilmente porque los valores normales se definen más fácilmente en adultos. Las mediciones de IGF-1 también son útiles para seguir el tratamiento.

· **Investigación:** El ensayo IGF-1 RIA es un instrumento inestimable para el estudio de las modificaciones de este factor de crecimiento en situaciones fisiológicas (embarazo) o patológicas (diabetes), y la regulación local de la producción de IGF-1 en relación con sus actividades paracrinas y autocrinas (curación de heridas, regeneración de órganos, crecimiento neoplástico, desarrollo fetal, regulación gonadal, etc.).

IV. PRINCIPIOS DEL MÉTODO

En este ensayo, DIASource ha introducido una fase de pretratamiento para mejorar el funcionamiento del ensayo. Es cierto que las proteínas ligadoras influyen en el radioinmunoensayo para IGF-1. Una cantidad fija de IGF-1 marcada con I¹²⁵ compete con el IGF-1 a medir, presente en la muestra o en el calibrador, por los puntos de unión del anticuerpo inmovilizado en las paredes de un tubo de poliestireno. Después de 2 horas de incubación a temperatura ambiente con agitación, una aspiración termina con la reacción de competición. Los tubos se lavan con 2 ml de Solución de lavado y se aspiran otra vez. Se dibuja la curva de calibración y las concentraciones de IGF-1 de las muestras se determinan por interpolación de la dosis en la curva de calibración.

V. REACTIVOS SUMINISTRADOS

Reactivos	Kit 96 tests	Código de color	Reconstitución
 Tubos recubiertos con anti IGF-1	2 x 48	verde	Listo para uso
Ag 125I CONC TRAZADOR:IGF-1 marcado con I125 (grado HPLC) en tampón fosfático con albúmina bovina y azida (<0,1%)	1 vial 0,4 ml 300 kBq	rojo	Diluir 101 x con tampón marcador (ver sección VII. C)
TRACER BUF Tampón Marcador en tampón fosfato con caseína bovina y azida (<0,1%)	1 vial 25 ml	negro	Listo para uso
CAL 0 Calibrador cero en tampón fosfato con ovalbúmina y gentamicina	1 vial liofilizado	amarillo	Añadir 1 ml de Tampón de dilución
CAL N Calibradores IGF-1 - N = 1 al 5 (mirar los valores exactos en las etiquetas) en tampón fosfático con ovalbúmina y gentamicina Los calibradores están prediluidos	5 viales lío­filizados	amarillo	Añadir 1 ml de Tampón de dilución
PRE SOLN Solución de Pretratamiento con HCl 0,1 N	1 vial 5 ml	negro	Listo para uso
DIL BUF Tampón de dilución: tampón Tris-HCl con caseína bovina y azida (<0,1%)	1 vial 50 ml	verde	Listo para uso
WASH SOLN CONC Solución de lavado (TRIS-HCl)	1 vial 10 ml	marrón	Diluir 70 x con agua destilada (utilizar agitador magnético)
CONTROL N Controles - N = 1 o 2 en suero humano y timol	2 viales lío­filizados	plateado	Añadir 0,5 ml de agua destilada

Nota: Use el tampón de dilución para las diluciones de muestra.
1 ng de la preparación del calibrador es equivalente a 1 ng NIBSC 1st IRR 87/518.

VI. MATERIAL NO SUMINISTRADO

- El material mencionado a continuación es necesario y no esta incluido en el kit
- Agua destilada
 - Pipetas de 50µl, 100µl, 200 µl, 500µl, 1 ml y 3 ml (Se recomienda el uso de pipetas precisas con puntas desechables de plástico)
 - Tubos plásticos para el pretratamiento de muestras
 - Vórtex
 - Agitador magnético
 - Jeringa automática 5 ml (tipo Cornwall) para el lavado
 - Sistema de aspiración (opcional)

- Agitador de tubos (400 rpm)
- Contador de radiaciones gamma para medir I125 (mínima eficiencia 70%)

VII. PREPARACIÓN REACTIVOS

- A. **Calibradores:** Reconstituir calibradores con 1 ml de Tampón de dilución.
B. **Controles:** Reconstituir los controles con 0,5 ml de agua destilada.
C. **Solución Marcadora:** Preparar un volumen adecuado de solución marcadora añadiendo 20 µl de Marcador a 2 ml de Tampón Marcador. Utilizar un vórtex para homogeneizar.

Ejemplo de dilución marcadora			
Número de tubos	Marcador (µl)	Tampón marcador (ml)	Volumen de solución marcadora (ml)
24	50	5,0	5,050
48	100	10,0	10,100
72	150	15,0	15,150
96	200	20,0	20,200

La dilución del trazador marcador se debe hacer en el momento de uso.

- 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 día.

VIII. ALMACENAJE Y CADUCIDADES DE LOS REACTIVOS

- Antes de abrir o 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.
- Después de su reconstitución los calibradores y controles son estables durante 7 días a 2-8°C. Para periodos más largos, alicotar 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.
- Después del primer uso, el trazador es estable hasta la fecha de caducidad, si se guarda en el vial original cerrado a 2-8°C.
- La Solución Marcadora recién preparada solo debe utilizarse en el mismo día..
- Las alteraciones de los reactivos en el aspecto físico pueden indicar inestabilidad odeterioro.

IX. RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

- Las muestras de suero deben ser guardadas a 2-8°C.
- Si el ensayo no se realiza en 48 hrs., almacenar las muestras a –20°.
- Evitar congelar y descongelar sucesivamente.

X. PROTOCOLO

- A. **Notas de manejo**
No utilizar el kit o componentes después de la fecha de caducidad. No mezclar reactivos de diferente número de lote. Llevar todos los reactivos a temperatura ambiente antes de su uso.
Agitar minuciosamente 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 o 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. **Fase de pretratamiento**
- Marcar un tubo de plástico para cada muestra y control.
 - Dispensar 50 µl de cada muestra y control en el tubo.
 - Añadir 50 µl de la solución de pretratamiento en este tubo.
 - Mezclar cada tubo con el mezclador vórtex durante 5 segundos.
 - Incubar 30 minutos a temperatura ambiente.
 - Dispensar 1 ml del Tampón de Dilución en cada tubo.
 - Mezclar cada tubo con el mezclador vórtex.
- C. **Protocolo**
- 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.
 - Agitar brevemente los calibradores, muestras y controles y dispensar 100 µl de cada uno en sus respectivos tubos.
 - Dispensar 200 µl de Solución Marcadora en cada tubo, incluyendo los tubos descubiertos a las Cuentas Totales.
 - Agitar suavemente la gradilla de tubos para soltar cualquier burbuja cautiva de las paredes de los tubos.
 - Incubar 2 horas a temperatura ambiente con agitación (400 rpm).

- 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.
- Lavar los tubos con 2 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
- Dejar los tubos en posición inversa durante 2 minutos y aspirar el líquido restante.
- Medir la actividad de cada tubo durante 60 segundos en un Contador Gamma.

XI. CALCULO DE RESULTADOS

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

$$B/B0(\%) = \frac{\text{Cuentas (Calibrador ó muestra)}}{\text{Cuentas (Calibrador Cero)}} \times 100$$

- Utilizando papel 3 ciclo semilogarítmico o logit-log, representar los valores de (B/B0%) de cada calibrador frente a las contracciones del IGF-1 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”.
- Por interpolación de los valores (B/B%) de las muestras, se determinan los valores de las concentraciones de las mismas desde la curva de calibración.
- El porcentaje total de enlace del trazador en ausencia de IGF-1 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.

IGF-1		cpm	B/Bo (%)
Cuentas Totales		71038	
Calibrador	0,0 ng/ml	38117	100,0
	33,0 ng/ml	35753	93,8
	81,4 ng/ml	30816	80,8
	228,8 ng/ml	19914	52,2
	640,2 ng/ml	10525	27,6
	1529,0 ng/ml	5331	14,0

XIII. REALIZACIÓN Y LIMITACIONES

A. Limite de detección

Veinte calibradores cero fueron medidos en una curva con otros calibradores. El limite de detección, definido como la concentración aparente resultante de dos desviaciones estándares debajo de la media de enlace del calibrador cero, fue de 3,4 ng/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 (%)
IGF-1	100,0
IGF-II	0,7
Insulina	ninguna
GH	ninguna

Nota: esta tabla presenta la reacción cruzada para el anti IGF-1

C. Precisión

PRECISION INTRA-ENSAYO				PRECISION INTER-ENSAYO			
Suero	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)	Suero	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)
A	20	36,1 ± 3,3	9,1	A	17	129,1 ± 11,6	9,0
B	20	81,4 ± 1,9	1,9	B	17	362,5 ± 14,9	4,1
C	20	402,8 ± 6,8	1,7				

SD: Desviación estándar; CV: Coeficiente de variación

D. Exactitud

TEST DILUCIÓN			
Muestra	Dilución	Concent. teórica (ng/ml)	Concent. medida (ng/ml)
Suero A	1/1	-	818
	1/2	409	418
	1/4	205	216
	1/8	102	110
	1/16	51	54
Suero B	1/1	-	501
	1/2	251	250
	1/4	125	130
	1/8	63	62
	1/16	31	26

Las muestras fueron diluidas con el Tampón de Dilución.

TEST DE RECUPERACIÓN			
Muestra	IGF-1 añadido (ng/ml)	IGF-1 Recuperado (ng/ml)	Recuperado (%)
C1	17	18	108
C2	53	55	104
C3	160	164	103
C4	382	411	107

Factor de conversión:

De ng/ml a nmol/L: x 0,1307

De nmol/L a ng/ml: x 7,649

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.

Sujetos normales

Edad	HOMBRES (ng/ml)			MUJERES (ng/ml)		
	Media	Alcance	N	Media	Alcance	N
0 - 2 años	102	73-184	14	98	59-143	3
3 - 5 años	124	103-189	7	159	84-447	9
6 - 8 años	177	115-249	9	276	79-432	10
9 - 11 años	362	181-656	9	272	175-445	8
12 - 14 años	315	168-557	10	418	202-1101	19
15 - 17 años	409	224-592	9	414	138-658	25
18 - 20 años	330	190-390	4	355	144-519	10
21 - 30 años	313	235-408	6	310	191-478	52
31 - 40 años	225	154-270	10	279	180-437	53
41 - 50 años	222	160-318	15	233	123-406	39
51 - 60 años	195	144-286	26	217	122-327	36
> 60 años	171	94-245	23	186	91-320	27

Observación: los intervalos están basados en los valores mín - máx.

XVI. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

Seguridad

Para uso solo en diagnóstico in vitro.

Este kit contiene I¹²⁵ (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 un 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 u 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 que contengan sustancias animales deberán ser considerados como potencialmente infecciosos.

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 o utilizar cosméticos en el área de trabajo. No pipetear con la boca. Utilizar ropa de protección y guantes.

XVII. BIBLIOGRAFIA

1. DAUGHADAY W.H. and ROTWEIN P. (1989)
Insulin-like growth factors I and II. peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum and tissue concentrations.
Endocrine Rev., 10(1) : 68-91.

2. FROESCH E.R. and ZAPF J. (1985)
Insulin-like growth factors and insulin : comparative aspects.
Diabetologia, 28 : 485-493.

3. FURLANETTO R.W., UNDERWOOD L., VAN WYK J.J., D'ERCOLE A.J. (1977)
Estimation of spmatomedin-C levels in normals and patients with pituitary disease by radioimmunoassay.
J. Clin. Invest. 60 : 648.

4. ROSENFELD R.G., WILSON D.M., LEE P.D.K. and HINTZ R.L. (1986)
Insulin-like growth factors I and II in evaluation of growth retardation.
J. Pediatr., 109 : 428.

5. RUDMAN D., KUTNER M.H. and CHAWLA R.K. (1985)
The short child with subnormal plasma somatomedin-C.
Pediatric Res., 19(10) : 975-980.

6. ALBERTSSON-WIKLAND K. and HALL K. (1987)
Growth hormone treatment in short children : relationship between growth and serum insulin-like growth factor I and II levels.
J. Clin. Endocrinol Metab., 65 : 671.

7. WASS J.A.H., CLEMMONS D.R., UNDERWOOD L.E., BARROW L., BESSER G.M. and VAN WYK J.J. (1982)
Changes in circulating somatomedin-C levels in bromocriptine treated acromegaly.
Clin. Endocrinol., 17 : 369-377.

8. DAUGHADAY W.H., MARIZ I.K. and BLETHEN S.L. (1980)
Inhibition of access of bound somatomedin to membrane receptor and immunobinding sites - a comparison of radioreceptor and radioimmunoassay of somatomedin in native and acid-ethanol extracted serum.
J. Clin. Endocrinol. Metab., 51 : 781.

9. BREIERB.H., GALLAHER B.W. and GLUCKMAN P.D. (1991)
Radioimmunoassay for insulin-like growth factor-I : solutions to some potential problems and pitfalls.
Journal of Endocrinology, 128 : 347-357.

10. SCHOUTEN J.S.A.G. and al. (1993)
IGF1 : a prognostic factor of knee osteoarthritis.
British J. Rheumatol., 32 : 274-280.

11. GRONBAEK H., SKJAERBAEK C., NIELSEN B., FRYSTYK J., FOEGH M.L., FLYVBJERG A., ORSKOV H. (1995)
Growth hormone and insulin-like growth factor-I: a suggested role in renal transplantation and graft vessel disease.
Transplant. Proceed., 27/3 : 2133-2136.

12. TSITOURAS P.D., ZHONG Y.G., SPUNGEN A.M., BAUMAN W.A. (1995)
Serum testosterone and growth hormone insulin-like growth factor-I in adults with spinal cord injury.
Hormone and metabolic Research , 27/6 : 287-292.

13. KOCH A., DORR H.G., GERLING S., BEHRENS R., BOHLES H.J. (1995)
Effect of growth hormone on IDF-I levels in patients with growth hormone deficiency and Wilson disease.
Hormone Research, 44/1 : 40-44.

XVIII. RESUMEN DEL PROTOCOLO

	CUENTAS TOTALES (µl)	CALIBRADOR ES (µl)	MUESTRA(S) CONTROL(S) (µl)
<u>PRE-TRATAMIENTO</u>			
Muestras, controles	-	-	50
Solución de pretratamiento	-	-	50
Incubación	Vórtex durante 7 segundos y 30 minutos de incubación a temperatura ambiente		
Tampón de dilución	-	-	1000
Agitar	Vórtex		
<i>INCUBACION</i>			
Calibradores (0 a 5)	-	100	-
Muestras pretratadas, Controles	-	-	100
Solución Marcadora	200	200	200
Incubación	2 horas a temperatura ambiente con agitación (400 rpm)		
Separación	-	Aspirar (o decantar)	
Solución de lavado de trabajo	-	2,0 ml	
Separación	-	Aspirar (o decantar)	
Contaje	Contar los tubos durante 60 segundos		

DIAsource Catalogo n.º: KIP1588	P.I. número: 1700868/es	Revisión n.º: 110204/1
------------------------------------	----------------------------	---------------------------

Fecha de la revisión : 2011-02-04

Διαβάστε ολόκληρο το πρωτόκολλο πριν από τη χρήση.

IGF-1-RIA-CT

I. ΧΡΗΣΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΟΠΟΙΑ ΠΡΟΟΡΙΖΕΤΑΙ

Ραδιοανοσοπροσδιορισμός για την in vitro ποσοτική μέτρηση του ανθρώπινου ινσουλινοειδούς αυξητικού παράγοντα-1 (IGF-1) στον ορό.

II. ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

- A. Εμπορική ονομασία:** Κιτ IGF-1-RIA-CT της DIAsource
- B. Αριθμός καταλόγου:** KIP1588: 96 προσδιορισμοί
- Γ. Κατασκευάζεται από την:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue de l'Industrie, 8, B-1400 Nivelles, Belgium.

Για τεχνική βοήθεια ή πληροφορίες σχετικά με παραγγελίες επικοινωνήστε στα:
Τηλ.: +32 (0)67 88.99.99 Φαξ: +32 (0)67 88.99.96

III. ΚΛΙΝΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ

- A. Βιολογική δράση**
Ο ινσουλινοειδής αυξητικός παράγοντας 1 (IGF-1) ή σωματομεδίνη-C (SM-C) είναι ένα βασικό πολυπεπτίδιο μονής αλυσίδας 70 αμινοξέων (MB: 7649) παρόμοιο με την προϊνσουλίνη (ομολογία αλληλουχίας 50%) και με το άλλο καλά χαρακτηρισμένο μέλος της οικογένειας των σωματομεδινών: IGF II (67AA, ομολογία αλληλουχίας 70% με τον IGF-1). Ο IGF-1 είναι ο πλέον σημαντικός παράγοντας, ο οποίος διαμεσολαβεί για τις δράσεις προαγωγής της ανάπτυξης της αυξητικής ορμόνης, μιας ορμόνης της υπόφυσης που παρουσιάζει υψηλή διακύμανση στα επίπεδα του αίματος λόγω παλμικής απελευθέρωσης. Η συγκέντρωση του IGF-1 στο αίμα είναι πιο σταθερή λόγω της δέσμευσης στις μεταφέρουσες πρωτεΐνες. Η συγκέντρωση της κυρίαρχης δεσμεύουσας πρωτεΐνης (MB 53.000) καθώς και η παραγωγή του IGF-1, ρυθμίζονται από την αυξητική ορμόνη. Ο IGF-1 παράγεται από το ήπαρ και άλλους ιστούς και έχει ενδοκρινείς, παρακρινείς και αυτοκρινείς δράσεις. Διεγείρει την ανάπτυξη και ρυθμίζει τη διαφοροποίηση διαφόρων ιστών, εμφανίζει ινσουλινοειδείς δράσεις και προάγει την ανάπτυξη του χόνδρου. Παρότι η αυξητική ορμόνη (GH) είναι ο πλέον σημαντικός παράγοντας που ελέγχει την έκκριση και τη συγκέντρωση του IGF-1, άλλοι παράγοντες είναι επίσης καθοριστικοί: η ηλικία (με κορύφωση στην εφηβεία), το φύλο, η κατάσταση θρέψης και άλλες ορμόνες (οιστρογόνο, θυροξίνη, προλακτίνη, ...). Ειδικά τροφικά ερεθίσματα ελέγχουν κυρίως την έκκριση του IGF-1 στο τοπικό μικροπεριβάλλον ενός συγκεκριμένου οργάνου (παρακρινείς δράσεις), ενώ η συγκέντρωση του IGF-1 στο αίμα είναι η πλέον σημαντική μεταβλητή για ισορροπημένη συστηματική ανάπτυξη (ενδοκρινείς δράσεις).
- B. Κλινικές εφαρμογές**
· **Καθυστέρηση της ανάπτυξης:** Η καθυστέρηση της ανάπτυξης ενδέχεται να οφείλεται σε αρκετές αιτίες, μεταξύ των οποίων είναι η ανεπαρκής παραγωγή GH (υποϋποφυσισμός), η οποία σχετίζεται με χαμηλά επίπεδα του IGF-1 στο αίμα. Λόγω των δυσκολιών στη λήψη ερμηνεύσιμων αποτελεσμάτων από μετρήσεις της GH (με δυναμικές πολλαπλές εξετάσεις ή εξετάσεις διέγερσης), ο προσδιορισμός της σταθερής συγκέντρωσης του IGF-1 στο πλάσμα θεωρείται συχνά ως απλή εξέταση ελέγχου για την αξιολόγηση του "διαποτισμού με GH" του ασθενούς πριν αποφασιστούν πιο εκτεταμένες έρευνες. Σε αρκετές κλινικές καταστάσεις με πρόβλημα ανάπτυξης, ενδέχεται να παρατηρηθούν χαμηλά επίπεδα IGF-1 παρά τη φυσιολογική ή υψηλή παραγωγή GH (δηλ. υποσιτισμός, χρόνιες νόσοι, ορισμένοι γενετικής αιτιολογίας νάνοι όπως οι Πυγμαίοι, ...). Είναι ενδιαφέρον ότι παιδιά με διακριτή νευρο-εκκριτική δυσλειτουργία της GH ενδέχεται να εμφανίζουν χαμηλές τιμές IGF-1 παρά τα φυσιολογικά επίπεδα GH που παρατηρούνται με συμβατικές εξετάσεις. Τα αποτελέσματα του προσδιορισμού IGF-1 πρέπει να ερμηνεύονται με προσοχή εξετάζοντας τις φυσιολογικές διακυμάνσεις του IGF-1 κατά τη διάρκεια της παιδικής ηλικίας και της εφηβείας (δείτε Rosenfeld et al).
· **Ακρομεγαλία:** Τα επίπεδα του IGF-1 είναι αυξημένα στην ακρομεγαλία (υπερβολική παραγωγή GH) και ενδέχεται να χρησιμεύουν ως δείκτης της βαρύτητας της νόσου. Τα αποτελέσματα ερμηνεύονται πιο εύκολα επειδή οι φυσιολογικές τιμές ορίζονται πιο εύκολα σε ενηλίκους. Οι μετρήσεις του IGF-1 είναι επίσης χρήσιμες για την παρακολούθηση της θεραπείας.
· **Έρευνα:** Το κιτ IGF-1 RIA είναι ένα πολύτιμο εργαλείο για τη μελέτη των τροποποιήσεων αυτού του αυξητικού παράγοντα κατά τη διάρκεια φυσιολογικών (δηλ. κύηση) ή παθολογικών (δηλ. διαβήτη) καταστάσεων και της τοπικής ρύθμισης της παραγωγής του IGF-1 σε σχέση με τις παρακρινείς και αυτοκρινείς δραστηριότητές του (επούλωση τραυμάτων, αναγέννηση οργάνων, νεοπλασματική ανάπτυξη, ανάπτυξη του εμβρύου, ρύθμιση γονάδων κ.λπ).

IV. ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Στο παρόν kit, η DIASource εισήγαγε ένα βήμα προ-εργασίας, ώστε να βελτιώσει την κλινική απόδοση της εξέτασης. Έχει αποδειχθεί το οι δεσμευτικές πρωτεΐνες παρεμβαίνουν στη ραδιοανοσοδοκιμασία για το IGF-1. Μια σταθερή ποσότητα IGF-1 σημασμένου με ¹²⁵I ανταγωνίζεται με τον IGF-1 που θα μετρηθεί, ο οποίος υπάρχει στο δείγμα ή στο βαθμονομητή, για σταθερή ποσότητα θέσεων αντισωμάτων που είναι ακινητοποιημένα στο τοίχωμα ενός σωληναρίου πολυστυρενίου. Μετά από 2 ώρες επώασης σε θερμοκρασία δωματίου με ανάδευση, η αντίδραση ανταγωνισμού τερματίζεται με ένα βήμα αναρρόφησης. Τα σωληνάρια κατόπιν πλένονται με 2 ml διαλύματος πλύσης και αναρροφούνται. Παριστάνεται γραφικά μια καμπύλη βαθμονόμησης και προσδιορίζονται οι συγκεντρώσεις IGF-1 των δειγμάτων με αναγωγή συγκεντρώσεων από την καμπύλη βαθμονόμησης.

V. ΠΑΡΕΧΟΜΕΝΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Αντιδραστήρια	Kit 96 εξετάσεων	Χρωματικό ς κωδικός	Ανασύσταση
Σωληνάρια επιστρωμένα με αντι-IGF-1	2 x 48	πράσινο	Έτοιμο για χρήση
Ag 125I CONC IXNHΘΕΤΗΣ: IGF-1 σημασμένος με ¹²⁵I (κατηγορίας HPLC) σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών με βόεια λευκοματίνη και αζίδιο (<0,1%)	1 φιαλίδιο 0,4 ml 300 kBq	κόκκινο	Αραιώστε 101x με Ρυθμιστικό Διάλυμα (βλ. ενότητα VII. C)
TRACER BUF Ρυθμιστικό Διάλυμα σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών με βόεια καζεΐνη και αζίδιο (<0,1%)	1 φιαλίδιο 25 ml	μαύρο	Έτοιμο για χρήση
CAL 0 Βαθμονομητές 0 σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών με ωαλβουμίνη και γενταμικίνη	1 φιαλίδιο λυοφιλοποιημέ νο	κίτρινο	Προσθέστε 1 ml Ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης
CAL N Βαθμονομητές - N = 1 έως 5 (δείτε τις ακριβείς τιμές στις ετικέτες των φιαλιδίων) σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών με ωαλβουμίνη και γενταμικίνη Οι βαθμονομητές είναι προ-αραιωμένοι	5 φιαλίδια λυοφιλοποιημέ νο	κίτρινο	Προσθέστε 1 ml Ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης
PRE SOLN Το διάλυμα προ-εργασίας περιέχει HCl 0.1N	1 φιαλίδιο 5 ml	μαύρο	Έτοιμο για χρήση
DIL BUF Ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης: Tris-HCl ρυθμιστικό διάλυμα με βόεια καζεΐνη και αζίδιο (<0,1%)	1 φιαλίδιο 50 ml	πράσινο	Έτοιμο για χρήση
WASH SOLN CONC Διάλυμα πλύσης (TRIS-HCl)	1 φιαλίδιο 10 ml	καφέ	Αραιώστε 70 x με απεσταγμένο νερό (χρησιμοποιήστε μαγνητικό αναδευτήρα).
CONTROL N Οροί ελέγχου - N = 1 ή 2 σε ανθρώπινο ορό με θυμόλη	2 φιαλίδια λυοφιλοποιημέ νο	ασημί	Προσθέστε 0,5 ml απεσταγμένου νερού

Σημείωση: Χρησιμοποιήστε το αραιωτικό ρυθμιστικό διάλυμα για την αραιώση των δειγμάτων.
1 ng του παρασκευάσματος βαθμονομητή είναι ισοδύναμο με 1 ng του NIBSC 1ου IRR 87/518.

VI. ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ ΠΟΥ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ

Τα ακόλουθα υλικά απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται στο kit:

- Απεσταγμένο νερό
- Πιπέτες για διανομή: 50 µl, 100 µl, 200 µl, 500 µl, 1 ml και 3 ml (συνιστάται η χρήση πιπετών ακριβείας με αναλώσιμα πλαστικά ρύγχη)
- Πλαστικά σωληνάρια για την προ-εργασία των δειγμάτων
- Αναμεικτής στροβιλισμού (τύπου vortex)
- Μαγνητικός αναδευτήρας
- Αυτόματη σύριγγα των 5 ml (τύπου Cornwall) για πλύση

- Σύστημα αναρρόφησης (προαιρετικό)
- Αναδευτήρας σωληναρίων (400 rpm)
- Μπορεί να χρησιμοποιηθεί οποιοσδήποτε μετρητής γ ακτινοβολίας με δυνατότητα μέτρησης του ¹²⁵I (ελάχιστη απόδοση 70%).

VII. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟΥ

- A. Βαθμονομητές:** Ανασυστήστε τους βαθμονομητές με 1 ml Ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης.
- B. Οροί ελέγχου:** Ανασυστήστε τους ορούς ελέγχου με 0,5 ml απεσταγμένου νερού.
- C. Διάλυμα ιχνηθέτη :** Προετοιμάστε επαρκή όγκο διαλύματος Ιχνηθέτη προσθέτοντας 20 µl Ιχνηθέτη σε 2 ml Ρυθμιστικού Διαλύματος. Ομοιογενοποιήστε με αναμεικτή στροβιλισμού (vortex).

Παράδειγμα διαλύματος Ιχνηθέτη			
Αριθμός σωληναρίων	Ιχνηθέτης (µl)	Ρυθμιστικό διάλυμα (ml)	Όγκος διαλύματος ιχνηθέτη (ml)
24	50	5.0	5.050
48	100	10.0	10.100
72	150	15.0	15.150
96	200	20.0	20.200

Η αραιώση του ιχνηθέτη πρέπει να γίνεται εκείνη τη στιγμή.

- D. 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 kit παραμένουν σταθερά έως την ημερομηνία λήξης, η οποία αναγράφεται στην ετικέτα, εφόσον διατηρούνται σε θερμοκρασία 2 έως 8° C.
- Μετά την ανασύσταση, οι βαθμονομητές και οι οροί ελέγχου παραμένουν σταθεροί για μία εβδομάδα σε θερμοκρασία 2 έως 8° C. Για μεγαλύτερες περιόδους φύλαξης, πρέπει να σχηματίζονται κλάσματα/δόσεις μιας χρήσης και να διατηρούνται στους -20° C για 3 μήνες. Αποφεύγετε τη διαδοχική κατάψυξη και απόψυξη.
- Φρέσκο, παρασκευασμένο διάλυμα πλύσης εργασίας θα πρέπει να χρησιμοποιείται την ίδια ημέρα.
- Μετά την πρώτη χρήση του, ο ιχνηθέτης παραμένει σταθερός έως την ημερομηνία λήξης, εφόσον διατηρείται στο αρχικό, ερμητικά κλειστό φιαλίδιο σε θερμοκρασία 2 έως 8° C.
- Φρέσκο, παρασκευασμένο Διάλυμα ιχνηθέτη θα πρέπει να χρησιμοποιείται την ίδια ημέρα.
- Τυχόν μεταβολές της φυσικής εμφάνισης των αντιδραστηρίων του kit 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 πραγματοποιηθεί εντός 48 ωρών, συνιστάται η φύλαξη στους -20° C.
- Αποφεύγετε τους επακόλουθους κύκλους κατάψυξης- απόψυξης.

X. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

- A. Σημειώσεις σχετικά με το χειρισμό**
Μη χρησιμοποιείτε το kit ή τα συστατικά μετά την ημερομηνία λήξης. Μην αναμειγνύετε υλικά από διαφορετικές παρτίδες kit. Φέρετε όλα τα αντιδραστήρια σε θερμοκρασία δωματίου πριν από τη χρήση. Αναμείξτε καλά όλα τα αντιδραστήρια και τα δείγματα με απαλή ανακίνηση ή ανάδευση. 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 επώασης. Προετοιμάστε μια καμπύλη βαθμονόμησης για κάθε ανάλυση και μη χρησιμοποιείτε δεδομένα από προηγούμενες αναλύσεις.

- B. Διαδικασία προ-εργασίας**
- Σημάνετε ένα πλαστικό σωληνάριο για κάθε δείγμα και μάρτυρα
 - Διανείμετε 50µl από κάθε δείγμα και μάρτυρα μέσα στο σωληνάριο
 - Προσθέστε 50µl από το διάλυμα προ-εργασίας μέσα στο σωληνάριο
 - Ανακινήστε (vortex) κάθε σωληνάριο για 5 δευτερόλεπτα
 - Επώαστε 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
 - Προσθέστε 1 ml από το αραιωτικό ρυθμιστικό διάλυμα στο σωληνάριο
 - Ανακινήστε (vortex) κάθε σωληνάκι

- C. Διαδικασία**

1. Σημάνετε επιστρωμένα σωληνάρια εις διπλούν για κάθε βαθμονομητή, δείγμα και ορό ελέγχου. Για τον προσδιορισμό των μετρήσεων του ιχνηθέντη ¹²⁵I ("total"), σημάνετε 2 κοινά (μη επιστρωμένα) σωληνάρια.
2. Αναμείξτε για λίγο (με αναμεικτή στροβιλισμού τύπου vortex) βαθμονομητές, ορούς ελέγχου και δείγματα και διανείμετε 100 μl από έκαστο σε αντίστοιχα σωληνάρια.
3. Διανείμετε 200 μl Διάλυμα ιχνηθέντη σε κάθε σωληνάριο, συμπεριλαμβάνοντας τα μη επιστρωμένα σωληνάρια που αφορούν τις μετρήσεις του ιχνηθέντη ¹²⁵I ("total").
4. Ανακινήστε απαλά με το χέρι τη βάση στήριξης των σωληναρίων για να απελευθερώσετε τυχόν παγιδευμένες φυσαλίδες αέρα.
5. Επωάστε για 120 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου με ανακίνηση (400 rpm)
6. Αναρροφήστε (ή μεταγγίστε) το περιεχόμενο κάθε σωληναρίου (με εξαίρεση εκείνα που αφορούν τις μετρήσεις του ιχνηθέντη ¹²⁵I ["total"]). Βεβαιωθείτε ότι το πλαστικό ρύγχος του αναρροφητή φθάνει στον πυθμένα του επιστρωμένου σωληναρίου προκειμένου να αφαιρεθεί όλη η ποσότητα του υγρού.
7. Πλύνετε τα σωληνάρια με 2 ml διαλύματος πλύσης εργασίας (με εξαίρεση εκείνα που αφορούν τις μετρήσεις του ιχνηθέντη ¹²⁵I ["total"]) και αναρροφήστε (ή μεταγγίστε). Αποφύγετε το σχηματισμό αφρού κατά τη διάρκεια της προσθήκης του διαλύματος πλύσης εργασίας.
8. Αφήστε τα σωληνάρια να σταθούν σε όρθια θέση για δύο λεπτά και αναρροφήστε τη σταγόνα υγρού που απομένει.
9. Μετρήστε τα σωληνάρια σε μετρητή γ ακτινοβολίας για 60 δευτερόλεπτα.

XI. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

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

$$B/B_0 (\%) = \frac{\text{Μετρήσεις (Βαθμονομητής ή δείγμα)}}{\text{Μετρήσεις (Μηδενικός βαθμονομητής)}} \times 100$$

3. 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 IGF-1 για κάθε σημείο βαθμονομητή. Απορρίψτε τις εμφανείς μη αποδεκτές τιμές.
4. 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.
5. Με αγωγή των τιμών των δειγμάτων (B/B₀ (%)), προσδιορίστε τις συγκεντρώσεις IGF-1 των δειγμάτων από την καμπύλη βαθμονόμησης.
6. Για κάθε προσδιορισμό, πρέπει να ελέγχεται το ποσοστό του συνολικού ιχνηθέντη που δεσμεύεται απουσία του μη σημασμένου IGF-1 (B₀/T).

XII. ΤΥΠΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

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

IGF-1		cpm	B/B ₀ (%)
Κρούσεις του ιχνηθέντη ¹²⁵ I ("total")		71038	
Βαθμονομητής	0,0 ng/ml	38117	100,0
	33,0 ng/ml	35753	93,8
	81,4 ng/ml	30816	80,8
	228,8 ng/ml	19914	52,2
	640,2 ng/ml	10525	27,6
	1529,0 ng/ml	5331	14,0

XIII. ΑΠΟΛΟΣΗ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

A. Όριο ανίχνευσης

Υποβλήθηκαν σε προσδιορισμό είκοσι μηδενικοί βαθμονομητές μαζί με ένα σύνολο άλλων βαθμονομητών. Το όριο ανίχνευσης, οριζόμενο ως η φαινομενική συγκέντρωση δύο τυπικών αποκλίσεων κάτω από τις μέσες καταμετρήσεις σε μηδενική δέσμευση, ήταν 3,4 ng/ml.

B. Ειδικότητα

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

Ένωση	Διασταυρούμενη αντίδραση (%)
IGF-1	100,0
IGF-II	0,7
Ινσουλίνη	καμία
GH	καμία

Σημείωση: στον πίνακα αυτό παρουσιάζεται η διασταυρούμενη αντίδραση για τον αντι-IGF-1

Γ. Ακρίβεια

ΑΚΡΙΒΕΙΑ ΓΙΑ ΤΟΝ ΙΔΙΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ				ΑΚΡΙΒΕΙΑ ΜΕΤΑΞΥ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΩΝ			
Ορός	N	<X> ± T.A. (ng/ml)	Σ.Δ. (%)	Ορός	N	<X> ± T.A. (ng/ml)	Σ.Δ. (%)
A	20	36,1 ± 3,3	9,1	A	17	129,1 ± 11,6	9,0
B	20	81,4 ± 1,9	1,9	B	17	362,5 ± 14,9	4,1
Γ	20	402,8 ± 6,8	1,7				

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

Δ. Ορθότητα

ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΡΑΙΩΣΗΣ			
Δείγμα	Αραίωση	Θεωρητική συγκέντρωση (ng/ml)	Μετρηθείσα συγκέντρωση (ng/ml)
Ορός A	1/1	-	818
	1/2	409	418
	1/4	205	216
	1/8	102	110
	1/16	51	54
Ορός B	1/1	-	501
	1/2	251	250
	1/4	125	130
	1/8	63	62
	1/16	31	26

Τα δείγματα αραιώθηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης.

ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΝΑΚΤΗΣΗΣ			
Δείγμα	Προσθεθείς IGF-1 (ng/ml)	Ανακτηθείς IGF-1 (ng/ml)	Ανακτηθείς (%)
C1	17	18	108
C2	53	55	104
C3	160	164	103
C4	382	411	107

Συντελεστής μετατροπής

Από ng/ml σε nmol/L: x 0,1307
Από nmol/L σε ng/ml: x 7,649

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 φιαλιδίου, τα αποτελέσματα δεν είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν, εκτός εάν έχει δοθεί ικανοποιητική εξήγηση για την 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. ΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

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

Φυσιολογικά άτομα

Ηλικιακή ομάδα	ΑΝΔΡΕΣ (ng/ml)			ΓΥΝΑΙΚΕΣ (ng/ml)		
	Μέση τιμή	Πεδίο τιμών	N	Μέση τιμή	Πεδίο τιμών	N
0 - 2 ετών	102	73-184	14	98	59-143	3
3 - 5 ετών	124	103-189	7	159	84-447	9
6 - 8 ετών	177	115-249	9	276	79-432	10
9 -11 ετών	362	181-656	9	272	175-445	8
12 - 14 ετών	315	168-557	10	418	202-1101	19
15 - 17 ετών	409	224-592	9	414	138-658	25
18 - 20 ετών	330	190-390	4	355	144-519	10
21 - 30 ετών	313	235-408	6	310	191-478	52
31 - 40 ετών	225	154-270	10	279	180-437	53
41 - 50 ετών	222	160-318	15	233	123-406	39
51 - 60 ετών	195	144-286	26	217	122-327	36
> 60 ετών	171	94-245	23	186	91-320	27

Σημείωση: το εύρος τιμών δίδεται σε ελάχιστες-μέγιστες τιμές

XVI. ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ

Ασφάλεια

Μόνο για διαγνωστική χρήση *in vitro*.
Το kit αυτό περιέχει το ¹²⁵I (Χρόνος ημιζωής: 60 ημέρες), μια ραδιενεργή ουσία η οποία εκπέμπει ιονίζουσα ακτινοβολία Χ (28 keV) και γ (35.5 keV). Αυτό 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.
Όλος 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 ραδιοϊσότοπων.
Τυχόν διαρροές 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 kit 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.
Αποφεύγετε οποιαδήποτε επαφή του δέρματος με αντιδραστήρια (χρησιμοποιείται αζίδιο του νατρίου ως συντηρητικό). Το αζίδιο στο kit αυτό ενδέχεται να αντιδράσει με μόλυβδο και χαλκό των υδραυλικών σωληνώσεων και να σχηματίζει με τον τρόπο αυτό ιδιαίτερα εκρηκτικά αζίδια μετάλλων. Κατά τη διάρκεια του βήματος πλύσης, εκπλύνετε την αποχέτευση με μεγάλη ποσότητα νερού, για την πρόληψη τυχόν συσσώρευσης αζιδίου.
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. DAUGHADAY W.H. and ROTWEIN P. (1989)
Insulin-like growth factors I and II. peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum and tissue concentrations.
Endocrine Rev., 10(1) : 68-91.
2. FROESCH E.R. and ZAPF J. (1985)
Insulin-like growth factors and insulin : comparative aspects.
Diabetologia, 28 : 485-493.
3. FURLANETTO R.W., UNDERWOOD L., VAN WYK J.J., D'ERCOLE A.J. (1977)
Estimation of somatomedin-C levels in normals and patients with pituitary disease by radioimmunoassay.
J. Clin. Invest. 60 : 648.
4. ROSENFELD R.G., WILSON D.M., LEE P.D.K. and HINTZ R.L. (1986)
Insulin-like growth factors I and II in evaluation of growth retardation.
J. Pediatr., 109 : 428.
5. RUDMAN D., KUTNER M.H. and CHAWLA R.K. (1985)
The short child with subnormal plasma somatomedin-C.
Pediatric Res., 19(10) : 975-980.
6. ALBERTSSON-WIKLAND K. and HALL K. (1987)
Growth hormone treatment in short children : relationship between growth and serum insulin-like growth factor I and II levels.
J. Clin. Endocrinol Metab., 65 : 671.
7. WASS J.A.H., CLEMMONS D.R., UNDERWOOD L.E., BARROW L., BESSER G.M. and VAN WYK J.J. (1982)
Changes in circulating somatomedin-C levels in bromocriptine treated acromegaly.
Clin. Endocrinol., 17 : 369-377.
8. DAUGHADAY W.H., MARIZ I.K. and BLETHEN S.L. (1980)
Inhibition of access of bound somatomedin to membrane receptor and immunobinding sites - a comparison of radioreceptor and

radioimmunoassay of somatomedin in native and acid-ethanol extracted serum.
J. Clin. Endocrinol. Metab., 51 : 781.

9. BREIERB.H., GALLAHER B.W. and GLUCKMAN P.D. (1991)
Radioimmunoassay for insulin-like growth factor-I : solutions to some potential problems and pitfalls.
Journal of Endocrinology, 128 : 347-357.
10. SCHOUTEN J.S.A.G. and al. (1993)
IGF1 : a prognostic factor of knee osteoarthritis.
British J. Rheumatol., 32 : 274-280.
11. GRONBAEK H., SKJAERBAEK C., NIELSEN B., FRYSTYK J., FOEGH M.L., FLYVBJERG A., ORSKOV H. (1995)
Growth hormone and insulin-like growth factor-I: a suggested role in renal transplantation and graft vessel disease.
Transplant. Proceed., 27/3 : 2133-2136.
12. TSITOURAS P.D., ZHONG Y.G., SPUNGEN A.M., BAUMAN W.A. (1995)
Serum testosterone and growth hormone insulin-like growth factor-I in adults with spinal cord injury.
Hormone and metabolic Research , 27/6 : 287-292.
13. KOCH A., DORR H.G., GERLING S., BEHRENS R., BOHLES H.J. (1995)
Effect of growth hormone on IGF-I levels in patients with growth hormone deficiency and Wilson disease.
Hormone Research, 44/1 : 40-44.

XVIII. ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΤΟΥ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟΥ

	ΣΥΝΟΛΙΚΕΣ ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ μl	ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΤΕΣ μl	ΔΕΙΓΜΑ(ΤΑ) ΥΛΙΚΑ ΕΛΕΓΧΟΥ μl
<u>ΠΡΟ-ΕΡΓΑΣΙΑ</u> Δείγματα/Υλικά ελέγχου Διάλυμα προ-εργασίας	- -	- -	50 50
Επώαση	Ανακινήστε (vortex) για 5 δευτερόλεπτα και επωάστε για 30 λεπτά σε θερμοκραία δωματίου		
Ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης	-	-	1000
Ανάδευση	Ανακίνηση (Vortex)		
<u>ΕΠΩΑΣΗ</u> Βαθμονομητές (0 - 5) Δείγματα προ- εργασίας, Υλικά ελέγχου Διάλυμα ιχνηθέτη	- - 200	100 - 200	- 100 200
Επώαση	120 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου με ανάδευση σε 400 rpm		
Διαχωρισμός Διάλυμα πλύσης Διαχωρισμός	-	αναρρόφηση (ή μετάγγιση) 2,0 ml αναρρόφηση (ή μετάγγιση)	
Μέτρηση	Μετρήστε τα σωληνάρια για 60 δευτερόλεπτα		

Αρ. καταλόγου DIASource: KIP1588	Αριθμός P.I.: 1700868/el	Αρ. αναθεώρησης: 110204/1
-------------------------------------	-----------------------------	------------------------------

ημερομηνία αναθεώρησης : 2011-02-04

Przed zastosowaniem należy przeczytać cały protokół.

IGF-1-RIA-CT

I. PRZEZNACZENIE

Oznaczenie radioimmunologiczne do ilościowego pomiaru in vitro ludzkiego insulinopochodnego czynnika wzrostu 1 (IGF-1) w surowicy.

II. INFORMACJE OGÓLNE

- A. **Nazwa firmowa:** DIASource IGF-1-RIA-CT
- B. **Numer katalogowy:** KIP1588 : 96 oznaczeń
- C. **Wyprodukowano przez:** DIASource ImmunoAssays S.A.
Rue de l'Industrie, 8, B-1400 Nivelles, Belgia.

Dział pomocy technicznej oraz informacje dotyczące zamówień:

Tel: +32 (0)67 88.99.99

Fax: +32 (0)67 88.99.96

III. INFORMACJE KLINICZNE

A. Aktywność biologiczna

Insulinopochodny czynnik wzrostu 1 (IGF-1) lub somatomedyna C (SM-C) jest jednolącuchowym polipeptydem składającym się z 70 aminokwasów (masa cząsteczkowa: 7649) i przypomina proinsulinę (50% homologia sekwencji) oraz inną dobrze znaną somatomedynę: IGF-II (67 aminokwasów, 70% homologia sekwencji z IGF-1). IGF-1 jest najważniejszym czynnikiem, który promuje działanie hormonu wzrostu, hormonu przysadkowego, który w związku z okresowym wydzielaniem charakteryzuje się dużymi wahaniami poziomów we krwi obwodowej. Stężenie IGF-1 we krwi jest bardziej stabilne ze względu na wiązanie się z nośnikami białkowymi. Stężenie dominującego białka wiążącego (masa cząsteczkowa 53000) podobnie jak produkcja IGF-1 są regulowane przez hormon wzrostu. IGF-1 jest wytwarzany przez wątrobę i inne tkanki i ma właściwości endokrynowe, parakrynowe i autokrynowe. Stymuluje wzrost i ma wpływ na różnicowanie różnych tkanek, przejawia aktywność przypominającą insulinę i ułatwia wzrost chrząstki. Chociaż GH jest najważniejszym czynnikiem mającym wpływ na wydzielanie i stężenie IGF-1, inne czynniki są również istotne: wiek (szczytowe wartości w czasie pokwitania), płeć, stan odżywienia i inne hormony (estrogeny, tyroksyna, prolaktyna,...). Wydzielanie IGF-1 w lokalnym mikrośrodkowisku w określonej tkance jest kontrolowane przez swoiste stymuliny troficzne (działanie parakrynowe), podczas gdy na stężenie IGF-1 we krwi największy wpływ ma zbilansowany proces wzrostu całego ustroju (działanie endokrynowe).

B. Zastosowanie kliniczne

Upośledzenie wzrostu: Upośledzenie wzrostu może wynikać z wielu przyczyn, między innymi z powodu niedoboru wytwarzania GH (niewydolność przysadkowa), który związany jest z niskimi poziomami IGF-1 we krwi. Ze względu na trudności związane z uzyskaniem właściwych do interpretacji wyników pomiarów GH (konieczność wykonywania badań dynamicznych lub testów stymulacji), określenie stabilnego stężenia IGF-1 w osoczu jest często brane pod uwagę jako proste badanie przesiewowe w celu określenia "nasycenia GH" u pacjenta przez rozpoczęciem bardziej szczegółowej diagnostyki. W niektórych stanach klinicznych związanych z zaburzeniami wzrostu, niskie poziomy IGF-1 mogą być obserwowane pomimo prawidłowej lub wysokiej produkcji GH (np.: w niedożywieniu, przewlekłych stanach chorobowych, w niektórych rodzajach karłowatości wrodzonej np.: u Pigmejów,...). Ciekawym zjawiskiem jest występowanie niskich poziomów IGF-1 u dzieci z niewielką dysfunkcją neuro-wydzielniczą GH pomimo prawidłowych poziomów GH wykrywanych w badaniach konwencjonalnych. Biorąc pod uwagę fizjologiczną zmienność IGF-1 w dzieciństwie i okresie dojrzewania, wyniki oznaczenia IGF-1 muszą być interpretowane z ostrożnością (szczegóły w opracowaniu Rosenfeld i wsp.).

Akromegalia : Poziomy IGF-1 są podwyższone w akromegalii (nadmierna produkcja GH) i mogą służyć jako wskaźnik stopnia ciężkości choroby. Wyniki mogą być łatwiej interpretowane z uwagi na to, że u dorosłych wartości referencyjne mogą być łatwiej określone. Pomiary IGF-1 są również przydatne do monitorowania leczenia.

Badania naukowe: Zestaw do badania IGF-1 RIA jest dostępnym narzędziem do badania modyfikacji tego czynnika wzrostu w warunkach fizjologicznych (np.: ciąży) lub patologicznych (np.: cukrzyca), oraz do oceny miejscowej regulacji wytwarzania IGF-1 w odniesieniu do działania parakrynowego i autokrynowego (leczenie ran, regeneracja narządów, wzrost nowotworowy, rozwój płodu, regulacje związane z narządami płciowymi itp.)

IV. ZAGADNIENIA DOTYCZĄCE METODY

W tym zestawie, DIASource wprowadził etap przygotowawczy, którego celem jest polepszenie charakterystyki klinicznej testu. Zostało dowiedzione, że białka wiążące interferują z testem radioimmunologicznym do oznaczania IGF-1. W celu pomiaru substancji obecnej w próbce lub w kalibratorze, odpowiednia ilość cząsteczek IGF-1 oznakowanych ¹²⁵I współzawodniczy z IGF-1 o określonej ilości miejsc na przeciwciałach unieruchomionych na ściance próbówki polistyrenowej. Po trwającej 2 godziny inkubacji połączonej z wytrząsaniem, przebiegającej w temperaturze pokojowej reakcja współzawodnictwa jest przerywana przez aspirację. Następnie próbówki są płukane przy pomocy 2 ml roztworu płuczącego i aspirowane. Wykreślana jest krzywa kalibracyjna a stężenia IGF-1 w próbkach są określane na podstawie nałożenia dawki na krzywą kalibracyjną.

V. ODCZYNNIKI DOSTARCZONE

Odczynniki	Zestaw 96 oznaczeń	Kolor	Rekonstytucja
Próbówki opłaskzone anty-IGF-1	2 x 48	zielony	Gotowe do zastosowania.
Ag 125I CONC ZNACZNIK IZOTOPOWY: IGF-1 oznakowany jodem¹²⁵ (poziom HPLC) w buforze fosforanowym z albuminą bydlęcą i azydkiem (<0,1%)	1 fiolka 0,4 ml 300 kBq	czerwony	Rozcieńczyć 101x z buforem do znacznika izotopowego (Tracera) (patrz rozdział VII.C)
TRACER BUF Bufor do znacznika izotopowego (tracera) w buforze fosforanowym z kazeiną bydlęcą i azydkiem (<0,1%)	1 fiolka 25 ml	czarny	Gotowy do zastosowania
CAL 0 Kalibrator zerowy w buforze fosforanowym z albuminą jaja kurzego i gentamycyną	1 fiolka materiał liofilizowany	żółty	Dodać 1 ml buforu do rozcieńczenia
CAL N Kalibratory - N = od 1 do 5 (dokładne wartości na etykietach fiolek) w buforze fosforanowym z albuminą jaja kurzego i gentamycyną Kalibratory są wstępnie rozcieńczone	5 fiolek materiał liofilizowany	żółty	Dodać 1 ml buforu do rozcieńczenia
PRE SOLN Roztwór przygotowawczy zawierający 0,1N HCl	1 fiolka 5 ml	czarny	Gotowy do zastosowania.
DIL BUF Bufor do rozcieńczenia: bufor Tris HCl z kazeiną bydlęcą i azydkiem (<0,1%)	1 fiolka 50 ml	zielony	Gotowy do zastosowania.
WASH SOLN CONC Roztwór płuczący (TRIS HCl)	1 fiolka 10 ml	brązowy	Rozcieńczyć 70x wodą destylowaną (wykorzystać mieszkło magnetyczne).
CONTROL N Kontrola - N = od 1 do 2 w surowicy ludzkiej z tymolem	2 fiołki materiał liofilizowany	srebrny	Dodać 0,5 ml wody destylowanej

Uwaga: Do rozcieńczenia próbek używać buforu do rozcieńczenia. 1 ng przygotowanego kalibratora jest równoważny 1 ng pierwszego IRR 87/518 - NIBSC.

VI. MATERIAŁY WYMAGANE, ALE NIEDOSTARCZONE

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

1. Woda destylowana

2. Pipety do dozowania: 50 µl, 100 µl, 200 µl, 500 µl, 1 ml i 3 ml (zaleca się korzystanie z dokładnych pipet z jednorazowymi końcówkami plastikowymi)

3. Probówki plastikowe lub dodanie do próbek roztworu przygotowawczego

4. Mieszkło wirowe

5. Mieszkło magnetyczne

6. Strzykawka automatyczna o objętości 5 ml (rodzaj Cornwall) do płukania

7. Układ do aspiracji (opcjonalnie)

8. Wytrząsarka do próbek (400 rpm)

9. Może być wykorzystywany jakikolwiek licznik gamma odpowiedni do pomiaru ¹²⁵I (minimalny uzysk 70%)

VII. PRZYGOTOWANIE ODCZYNNIKÓW

- A. **Kalibratory:** Rekonstruować kalibratory przy pomocy 1 ml buforu do rozcieńczenia.

B. **Kontrola:** Kontrola należy rekonstruować przy pomocy 0,5 ml wody destylowanej.

C. **Roztwór znacznika izotopowego (Tracera) :** Odpowiednią objętość roztworu znacznika izotopowego (tracera) należy przygotować dodając 20 µl znacznika izotopowego (tracer) do 2 ml buforu do znacznika izotopowego (tracera). Do homogenizacji należy wykorzystać mieszkło magnetyczne.

Przykład rozcieńczeń znacznika izotopowego			
Ilość próbek	Znacznik izotopowy (µl)	Bufor do znacznika izotopowego (ml)	Objętość roztworu znacznika izotopowego(ml)
24	50	5,0	5,050
48	100	10,0	10,100
72	150	15,0	15,150
96	200	20,0	20,200

Wymagany jest roztwór znacznika przygotowany na poczekaniu.

- D. **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 mieszkło magnetyczne. Niewykorzystany roboczy roztwór płuczający 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, kalibratory i kontrole zachowują trwałość przez 1 tydzień, pod warunkiem przechowywania w temperaturze od 2 do 8°C.

- Świeżo przygotowany roboczy roztwór płuczający powinien być wykorzystany w tym samym dniu.

- Po jego pierwszym zastosowaniu, znacznik izotopowy zachowuje trwałość do podanej daty ważności jeżeli jest przechowywany w oryginalnej, dobrze zamkniętej fiołce w temperaturze od 2 do 8°C.

- Świeżo przygotowany roztwór znacznika izotopowego 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

- Próbkę surowicy muszą być przechowywane w temperaturze 2-8°C.

- Jeżeli oznaczenie nie jest wykonywane w ciągu 48 godzin, zaleca się przechowywanie w temperaturze -20°C.

- Unikać powtarzanych cykli zamrażania-odmrażania.

X. PROCEDURA

- A. **Uwagi dotyczące obsługi**

Nie wolno wykorzystywać składników zestawu po upływie 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 poprawiają precyzję wykonania oznaczenia. Przestrzegać czasów inkubacji. Przygotować krzywą kalibracyjną dla każdego cyklu pomiarowego, nie wolno wykorzystywać danych z poprzednich oznaczeń.

B. Etapy przygotowania

1. Oznaczyć po jednej standardowej próbce plastikowej dla każdej próbki i kontroli.

2. Dodać 50 µl próbki i kontrolni do tych próbek.

3. Do tej próbki dodać 50µl roztworu przygotowawczego.

4. Mieszać próbkę wirując przez 5 sekund.

5. Inkubować przez 30 minut w temperaturze pokojowej.

6. Dozować po 1 ml buforu do rozcieńczenia do każdej próbki.

7. Każda próbka musi być wymieszana przez wirowanie.

C. Procedura

- 1. Dla każdego kalibratora, próbki i kontroli należy oznaczyć opłaszczone próbówki w badaniach podwójnych. W celu określenia całkowitych zliczeń należy oznaczyć 2 standardowe próbówki.
- 2. Szybko wymieszać wirując: kalibratory, próbki i kontrole, i dozować po 100µl każdej substancji do odpowiednich probówek.
- 3. Odmierzyć 200 µl roztworu znacznika izotopowego (roztworu tracera) do każdej próbówki łącznie z nieopłaszczonymi probówkami do zliczeń całkowitych.
- 4. Delikatnie potrząsnąć statywem w celu uwolnienia uwieczonych pęcherzyków powietrza.
- 5. Inkubować przez 120 minut w temperaturze pokojowej w wstrząsarce do probówek (400 rpm).
- 6. Aspirować (lub odlać) zawartość każdej próbówki (z wyjątkiem probówek do całkowitego zliczania). Aby usunąć cały płyn należy upewnić się, że plastikowa końcówka aspiratora osiągnęła dno opłaszczonej próbówki.
- 7. Przepłukać próbówki przy pomocy 2 ml roboczego roztworu płuczącego (z wyjątkiem probówek do całkowitego zliczania) i aspirować zawartość (lub odlać ją). W trakcie dodawania roboczego roztworu płuczącego należy unikać wytwarzania piany.
- 8. Pozostawić próbówki w pozycji stojącej do góry na dwie minuty i aspirować pozostałe krople płynu.
- 9. Zliczać próbówki w liczniku gamma przez 60 sekund.

XI. OBLICZANIE WYNIKÓW

- 1. Obliczyć średnią oznaczeń podwójnych.
- 2. Obliczyć związaną radioaktywność jako odsetek wiązania określonego w zerowym punkcie kalibracji (0) zgodnie z poniższym wzorem:

B/B0(%) = $\frac{\text{Liczba zliczeń(dla kalibratora lub próbki)}}{\text{Liczba zliczeń(dla kalibratora a zerowego)}} \times 100$

- 3. Na 3 arkuszach półlogarytmicznych lub papierze milimetrowym wykreślić wartości (B/B0(%)) dla każdego punktu kalibratora jako funkcję stężenia IGF-1 każdego punktu kalibratora. Odrzucić oczywiste wartości graniczne.
- 4. 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.
- 5. Nakładając wartości (B/B0 (%)) próbki należy określić stężenia IGF-1 w próbkach z krzywej kalibracyjnej.
- 6. Dla każdego oznaczenia należy sprawdzić odsetek całkowitego związanego znacznika izotopowego przy braku nieoznakowanego IGF-1 (B0/T).

XII. PRZYKŁAD DANYCH TYPOWYCH

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

IGF-1		cpm	B/Bo (%)
Zliczanie całkowite		71038	
Kalibrator	0,0 ng/ml	38117	100,0
	33,0 ng/ml	35753	93,8
	81,4 ng/ml	30816	80,8
	228,8 ng/ml	19914	52,2
	640,2 ng/ml	10525	27,6
	1529,0 ng/ml	5331	14,0

XIII. DZIAŁANIE I OGRANICZENIA

A. Granica wykrywania

Dwadzieścia kalibratorów zerowych oznaczano wraz z zestawem innych kalibratorów. Granica wykrywania, zdefiniowana jako odmienne stężenie dwóch odchyłeń standardowych poniżej przeciętnej wartości zliczania przy wiązaniu zerowym kształtowała się na poziomie 3,4 ng/ml.

B. Swoistość

Odsetki reaktywności krzyżowej uzyskane przez porównanie stężenia uzyskującego 50% hamowanie są następujące:

Składnik	Reaktywność krzyżowa (%)
IGF-1	100,0
IGF-II	0,7
Insulina	brak
GH	brak

Uwaga: tabela przedstawia reaktywność krzyżową dla anty-IGF-1

C. Precyzja

PRECYZJA W SERII

PRECYZJA MIĘDZY SERIAMI

Surowi ca	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)	Surowi ca	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)
A	20	36,1 ± 3,3	9,1	A	17	129,1 ± 11,6	9,0
B	20	81,4 ± 1,9	1,9	B	17	362,5 ± 14,9	4,1
C	20	402,8 ± 6,8	1,7				

SD: Odchylenie standardowe; CV: Współczynnik zmienności

D. Dokładność

BADANIE ROZCIEŃCZENIA

Próbka	Rozcieńczenie	Stęż. teoretyczne (ng/ml)	Stęż. zmierzone (ng/ml)
Surowica A	1/1	-	818
	1/2	409	418
	1/4	205	216
	1/8	102	110
	1/16	51	54
Surowica B	1/1	-	501
	1/2	251	250
	1/4	125	130
	1/8	63	62
	1/16	31	26

Próbki zostały rozcieńczone przy pomocy buforu do rozcieńczania.

BADANIE ODZYSKU

Próbka	dodano IGF-1 (ng/ml)	Odzyskany IGF-1 (ng/ml)	Odzysk (%)
C1	17	18	108
C2	53	55	104
C3	160	164	103
C4	382	411	107

Współczynnik przeliczeniowy:

Z ng/ml na nmol/l: x 0.1307

Z nmol/l na ng/ml: x 7.649

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.

Zdrowi osobnicy

Grupa wiekowa	MĘŻCZYŹNI (ng/ml)			KOBIETY (ng/ml)		
	Średnia	Zakres	N	Średnia	Zakres	N
0 - 2 lata	102	73-184	14	98	59-143	3
3 - 5 lat	124	103-189	7	159	84-447	9
6 - 8 lat	177	115-249	9	276	79-432	10
9 - 11 lat	362	181-656	9	272	175-445	8
12 -14 lat	315	168-557	10	418	202-1101	19
15 -17 lat	409	224-592	9	414	138-658	25
18 -20 lat	330	190-390	4	355	144-519	10
21 -30 lat	313	235-408	6	310	191-478	52
31 -40 lat	225	154-270	10	279	180-437	53
41 -50 lat	222	160-318	15	233	123-406	39
51 -60 lat	195	144-286	26	217	122-327	36
> 60 lat	171	94-245	23	186	91-320	27

Uwaga: zakresy podano na podstawie wartości minimalnych - maksymalnych.

XVI. ŚRODKI OSTROŻNOŚCI I OSTRZEŻENIA

Bezpieczeństwo

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 powinno 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 oczyszczone 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, przeciwciał 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 próbkami 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.
Unikać kontaktu skóry z odczynnikami (zawierają azydek sodowy jako środek konserwujący). Azydek znajdujący się w zestawie może reagować z miedzią 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. DAUGHADAY W.H. and ROTWEIN P. (1989)
Insulin-like growth factors I and II. peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum and tissue concentrations.
Endocrine Rev., 10(1) : 68-91.

2. FROESCH E.R. and ZAPF J. (1985)
Insulin-like growth factors and insulin : comparative aspects.
Diabetologia, 28 : 485-493.

3. FURLANETTO R.W., UNDERWOOD L., VAN WYK J.J., D'ERCOLE A.J. (1977)
Estimation of somatomedin-C levels in normals and patients with pituitary disease by radioimmunoassay.
J. Clin. Invest. 60 : 648.

4. ROSENFELD R.G., WILSON D.M., LEE P.D.K. and HINTZ R.L. (1986)
Insulin-like growth factors I and II in evaluation of growth retardation.
J. Pediatr., 109 : 428.

5. RUDMAN D., KUTNER M.H. and CHAWLA R.K. (1985)
The short child with subnormal plasma somatomedin-C.
Pediatric Res., 19(10) : 975-980.

6. ALBERTSSON-WIKLAND K. and HALL K. (1987)
Growth hormone treatment in short children : relationship between growth and serum insulin-like growth factor I and II levels.
J. Clin. Endocrinol Metab., 65 : 671.

7. WASS J.A.H., CLEMMONS D.R., UNDERWOOD L.E., BARROW L., BESSER G.M. and VAN WYK J.J. (1982)
Changes in circulating somatomedin-C levels in bromocriptine treated acromegaly.
Clin. Endocrinol., 17 : 369-377.

8. DAUGHADAY W.H., MARIZ I.K. and BLETHEN S.L. (1980)
Inhibition of access of bound somatomedin to membrane receptor and immunobinding sites - a comparison of radioreceptor and radioimmunoassay of somatomedin in native and acid-ethanol extracted serum.
J. Clin. Endocrinol. Metab., 51 : 781.

9. BREIERB.H., GALLAHER B.W. and GLUCKMAN P.D. (1991)
Radioimmunoassay for insulin-like growth factor-I : solutions to some potential problems and pitfalls.
Journal of Endocrinology, 128 : 347-357.

10. SCHOUTEN J.S.A.G. and al. (1993)
IGF1 : a prognostic factor of knee osteoarthritis.
British J. Rheumatol., 32 : 274-280.

11. GRONBAEK H., SKJAERBAEK C., NIELSEN B., FRYSTYK J., FOEGH M.L., FLYVBJERG A., ORSKOV H. (1995)
Growth hormone and insulin-like growth factor-I: a suggested role in renal transplantation and graft vessel disease.
Transplant. Proceed., 27/3 : 2133-2136.

12. TSITOURAS P.D., ZHONG Y.G., SPUNGEN A.M., BAUMAN W.A. (1995)
Serum testosterone and growth hormone insulin-like growth factor-I in adults with spinal cord injury.
Hormone and metabolic Research , 27/6 : 287-292.

13. KOCH A., DORR H.G., GERLING S., BEHRENS R., BOHLES H.J. (1995)
Effect of growth hormone on IGF-I levels in patients with growth hormone deficiency and Wilson disease.
Hormone Research, 44/1 : 40-44.

XVIII. PODSUMOWANIE PROTOKOŁU

	CAŁKOWIT A LICZBA ZLICZEŃ µl	KALIBRATORY µl	PRÓBK I KONTROLE µl
<u>PRZYGOTOWANIE</u> Próbki , kontrole Roztwór przygotowawczy	- -	- -	50 50
Inkubacja	Wymieszać mieszadłem wirowym przez 5 sekund i inkubować przez 30 minut w temperaturze pokojowej		
Bufor do rozcieńczania	-	-	1000
Wyttrzanie	Mieszadło wirowe		
<u>INKUBACJA</u> Kalibratory (0 - 5) Próbki przygotowawcze, kontrole Roztwór znacznika izotopowego (Tracera)	- - 200	100 - 200	- 100 200
Inkubacja	120 minut w temperaturze pokojowej z wyttrzaniem 400 rpm		
Rozdzielenie Roboczy roztwór płuczacy Rozdzielenie	-	Aspiracja (lub odlewanie) 2,0 ml Aspiracja (lub odlewanie)	
Zliczanie	Zliczanie próbek przez 60 sekund		

Nr katalogowy DIAsource KIP1588	Numer P.I. 1700868/pl	Nr aktualizacji : 110204/1
------------------------------------	--------------------------	-------------------------------

Használat előtt olvassa el a teljes használati utasítást.

IGF-1-RIA-CT

I. VIZSGÁLAT CÉLJA

Radioimmunoassay az inzulinszerű növekedési faktor-1 (Insulin-like Growth Factor, IGF-1) mennyiségi meghatározására humán szérumból

II. ÁLTALÁNOS INFORMÁCIÓK

- A. **Bejegyzett név:** DIAsource IGF-1-RIA-CT Reagenskészlet
- B. **Katalógusszám:** KIP1588 : 96 vizsgálat
- C. **Gyártó :** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue de l'Industrie 8, B-1400 Nivelles, Belgium.

Gyakorlati jellegű vagy rendeléssel kapcsolatos kérdésekkel hívja a következő számot:

Tel : +32 (0)67 88.99.99

Fax : +32 (0)67 88.99.96

III. KLINIKAI HÁTTÉR

A. Élettani szerep

Az inzulinszerű növekedési faktor 1 (IGF-1) vagy somatomedin-C (SM-C) bázikus, 70 aminosavból álló egyszálú polipeptid (molekulatömege: 7649). Hasonló a proinzulinhoz (50%-os szekvenciahomológia) és a somatomedin család másik jól jellemzett tagjához, az IGF II-höz (67AA, 70%-os szekvencia homológia). Az IGF-1 a legfontosabb mediátora az agyalapi mirigy által pulzálnya kibocsátott és ennek következtében a vérben nagymértékben változó szintet mutató növekedési hormon (growth hormon, GH) növekedést befolyásoló hatásának. Az IGF-1 vérszintje a molekula hordozófehérjéhez történő kötődése miatt stabilabb. A növekedési hormon szabályozza mind a legnagyobb mennyiségben jelen lévő kötőfehérje (móltómege: 53,000) koncentrációját, mind az IGF1 termelését. Az IGF-1-t a máj és egyéb szövetek termelik, endokrin, parakrin és autokrin hatást egyaránt kifejt. Serkenti különböző szövetek növekedését, szabályozza differenciálódásukat, inzulinszerű hatást fejt ki és elősegíti a porc szövet növekedését. Bár az IGF-1 kiválasztódását és koncentrációját leginkább a GH szabályozza, ezekben több más faktornak, így az életkornak (csúcs a serdülőkorban), a nemnek, a tápláltsági állapotnak, továbbá egyéb hormonok (ösztrogén, thyroxine, prolactin...) szintjének is meghatározó szerepe van. Legfőképpen egy adott szerv helyi mikrokörnyezetében létrejövő specifikus trofikus stimulusok szabályozzák az IGF-1 kiválasztását (parakrin aktivitások), míg a molekula vérszintje a kiegyensúlyozott szisztémás növekedés legfontosabb befolyásoló tényezője (endokrin aktivitások).

B. Klinikai felhasználás

Növekedés retardáció: Visszamaradott növekedést számos tényező okozhat. Ezek egyike a GH termelés zavara (hypopituitarismus), melynek következtében az IGF-1 vérszintje alacsony. Mivel GH szintek megbízható eredményeket szolgáltatató lemerése (dinamikus multiplikált, vagy stimulációs tesztekkel) problematikus, a stabil IGF-1 koncentráció plazmában történő meghatározását gyakran tekintik a beteg „GH impregnációjára” szolgáló egyszerű szűrőtesztnek, mielőtt kiterjedtebb kivizsgálást végeznének. Számos, a kóros növekedéssel kapcsolatos klinikai esetben alacsony IGF-1 szintek mérhetők, noha a GH termelés normális, vagy magas (pl. alultápláltság, krónikus betegségek, bizonyos típusú genetikai törpék (pl. pigmeusok)). Érdekes, hogy a GH jól meghatározott neuro-szekréciós zavarában szenvedő gyermekekben alacsony IGF-1 értékek mérhetők, noha a szokásos mérőmódszerekkel meghatározott GH szint normális. Az IGF-1 vizsgálat eredményeit kellő óvatossággal, az IGF-1 gyermek- és serdülőkorban tapasztalható normális változásainak figyelembevételével kell értékelni (ld. Rosenfeld et. al.).

Akromegália: Akromegáliában (a GH túlermelődése) az IGF-1 szint emelkedett és ez a betegség súlyosságának indikátoraként szolgálhat. Az eredményeket könnyebb értékelni, mivel felnőttekben a normál értékek jobban definiálhatók. Az IGF-1 mérések a kezelés hatékonyságának ellenőrzésére is szolgálhatnak.

Kutatás: Az IGF-1 RIA kit nélkülözhetetlen eszköz e növekedési faktor változásainak tanulmányozásában mind fiziológiás (pl. terhesség), mind patológiás (pl. diabetes) állapotokban, továbbá az IGF-1 termelés helyi szabályozásának vizsgálatában a faktor parakrin és autokrin funkciójával kapcsolatosan (sebggyógyulás, szervregenerálódás, neoplazma növekedés, magzatfejlődés, nemi jelleg szabályozása, stb.).

IV. A MÓDSZER ELVE

A módszer klinikai elvégzésének fejlesztése érdekében a jelenlegi kitbe a DIASource egy előkezelési lépést vezetett be. Ez jól mutatja, hogy a kötőfehérjék gátolják az IGF-1. radioimmunoessay kimutatását.

Ismert mennyiségű ¹²⁵I izotóppal jelölt IGF-1 molekula versenyez a polisztirol cső falára kötött, meghatározott mennyiségű antitest kötőhelyért a mintában vagy a kalibrátorban található, mérendő IGF-1 molekulákkal. 2 óra szobahőmérsékleten történő rázás után egy aspirációs lépés szakítja meg a versengő reakciót. A csöveket 2 ml mosófolyadékkal mossuk, majd a mosóoldatot leszívátjuk. A kalibrátorok IGF-1 koncentrációja alapján állítjuk fel a kalibrációs görbét, a minták esetében kapott eredményeket erre a görbére rávetítve interpolációval kapjuk meg a minta IGF-1 koncentrációját.

V. A REAGENSKÉSZLET TARTALMA

Reagens	Mennyiség 96 mintához	Szín	Feloldás
Anti- IGF-1-el borított csövek	2 x 48	Zöld	Használatra kész
Ag 125I CONC Tracer: I¹²⁵jelölt IGF-1 (HPLC tisztaságú), foszfát pufferben, marha szérumalbuminnal és aziddal (<0.1%)	1 cső (0,4 ml, 300 kBq)	Vörös	Hígítsuk 101x-re Tracer Pufferrel (lsd .VII. C)
TRACER BUF Tracer Puffer foszfátpufferben marha kazeinnel és aziddal (<0,1%)	1 cső 25 ml	Fekete	Használatra kész
CAL 0 Zero Calibrator: foszfát puffer ovalbuminnal és gentamicin	1 cső liofilizátum	sárga	Adjon hozzá 1 ml hígító puffert.
CAL N Kalibrátorok: N=1-től N=5 foszfát puffer ovalbuminnal és gentamicin; pontos mennyiségek az üvegeken A kalibrálók előhígítva.	5 cső liofilizátum	sárga	Adjon hozzá 1 ml hígító puffert.
PRE SOLN Előkezelő oldat 0,1 N HCL tartalommal.	1 cső 5 ml	Fekete	Használatra kész
DIL BUF Hígító oldat Trisz-HCl pufferrel, szarvasmarha kazeinnel és aziddal (<0,1%)	1 cső 50 ml	Zöld	Használatra kész
WASH SOLN CONC Mosóoldat (TRIS-HCl)	1 ampulla 10 ml	barna	Hígítsa 70 x desztillált vízzel (használon mágneses keverőt).
CONTROL N Kontrollok-N= 1 vagy 2 humán szérumban timollal.	2 ampulla liofilizált	ezüst	Adjon hozzá 0,5 ml desztillált vizet

Megjegyzés : A hígító puffert a minták hígítására használja.

1 ng kalibrátor preparátum ekvivalens 1 ng NIBSC 1st IRR 87/518 jelű standarddal.

VI. A FELHASZNÁLÓ ÁLTAL BIZTOSÍTOTT ESZKÖZÖK

Az alábbi anyagok szükségesek, de a kitben nem találhatók:

- Desztillált víz
- 50 µl, 100 µl, 200 µl, 500 µl, 1 ml és 3 ml térfogatú pipetták (pontos pipettákat használjunk eldobható műanyag pipettahegyekkel)
- Műanyag csövek a minták előkezeléséhez.
- vortex keverő
- mágneses keverő
- Cornwall típusú 5 ml-es automata fecskendő a mosásra
- Leszívó berendezés (szükséges szerint)
- Rázótermosztát (400 rpm)
- Bármilyen gamma számláló használható, mely képes a ¹²⁵I mérésére (minimális mérési hatások: 70%).

VII. REAGENSEK ELŐKÉSZÍTÉSE

- A. Kalibrátorok :** Oldja fel a kalibrátorokat 1 ml hígító pufferben.
- B. Kontrollok:** Oldja fel a kontrollokat 0.5 ml desztillált vízben.
- C. Tracer oldat:** Készítsünk elegendő mennyiségű Nyomjelző oldatot úgy, hogy 20 µl Tracer-t 2 ml Tracer pufferrel elegyítsünk és Vortex-el homogenizáljuk.

Tracer hígítás - példa			
Csővek száma	Tracer (µl)	Tracer puffer (ml)	Tracer oldat térfogata (ml)
24	50	5,0	5,050
48	100	10,0	10,100
72	150	15,0	15,150
96	200	20,0	20,200

Felhasználás előtt a tracer alkalmi hígítására van szükség.

- D. Hígított mosóoldat:** Készítsen megfelelő mennyiségű hígított mosóoldatot úgy, hogy 69 rész desztillált vízhez 1 rész mosóoldatot (70x) kever. Homogenizálja mágneses keverő segítségével. A napi vizsgálatok végeztével öntse ki a megmaradt hígított mosóoldatot.

VIII. A REAGENSEK TÁROLÁSA ÉS ELTARTHATÓSÁGA

- Felnyitás és feloldás nélkül a reagens 2-8°C-on tárolva a címkén feltüntetett időpontig eltarthatók.
- A kalibrátorok és a kontrollok elkészítés után egy hétig 2-8°C -on stabilak maradnak. Hosszabb tárolás esetén a hígító oldatok elkészítve -20 °C -on maximum 3 hónapig tárolhatók.
Kerülje az egymást követő fagyasztást és felolvasztást.
- A frissen készült hígított mosóoldatot még aznap fel kell használni.
- Amennyiben felnyitás után a tracert az eredeti, jól lezárt ampullában 2-8°C-on tárolja, akkor a címkén feltüntetett időpontig eltartható.
- A kísérlet napján frissen készített Tracer oldatot használjunk.
- A reagens fizikai tulajdonságainak megváltozása valószínűleg azt jelzi, hogy megromlottak.

IX. MINTAVÉTEL ÉS ELŐKÉSZÍTÉS

- A szérumot 2-8°C-on kell tárolni.
- Ha a mintavétel után 48 órán belül nem történik meg a meghatározás, ajánlatos a mintát a meghatározásig –20 °C-on tárolni
- Kerüljük a többszöri felolvasztást és lefagyasztást

X. ELJÁRÁS

- A. Tudnivalók**
Ne használja a reagenset a lejáratí idejükön túl. Ne keverjen össze eltérő gyártási számú reagenskészletekből származó anyagokat. Használat előtt várja meg, amíg a reagens szobahőmérsékletre melegednek. Óvatos mozgattással vagy keveréssel alaposan homogenizálja a reagenset. Minden reagens és minta beméréséhez használjon tiszta eldobható pipettahegyet, hogy elkerülje az anyagok beszennyeződését. Nagypontosságú pipetták, vagy automata pipettázó készülék használata javítja a vizsgálat pontosságát. Tartsa be a megadott inkubációs időket. Minden vizsgálathoz készítsen új kalibrációs görbét, ne használja korábbi mérések adatait.

- B. Előkezelő lépés**

- 1. Címkézzen fel egy műanyag csövet ugyanazon mintához és kontrollhoz.
- 2. Készítsen mindegyik mintából és kontrollból 50 ul-t egy csőhöz.
- 3. Adjon 50 ul-t az előkezelt oldatból ebbe a csőbe.
- 4. Vortexelje mindegyik csövet 5 másodpercig.
- 5. Inkubálja őket 30 percig szobahőmérsékleten.
- 6. Adjon 1 ml hígító puffert a csőhöz.
- 7. Vortexelje mindegyik csövet.

- C. A vizsgálat menete**

- 1. Duplikátumban címkézzünk meg bevonatos csöveket minden kalibrátor, kontroll és minta számára. 2 normál csövet számozzunk meg az összes beütésszám meghatározására.
- 2. Rövid vortexelés után a kalibrátorokból, a kihígított mintákból és kontrollokból 100 µl-t mérünk be a megfelelő csövekbe.
- 3. Adjunk minden csőbe - az össz-beütésszám mérésére szolgáló csőhöz is - 200-200 µl Tracer oldatot.
- 4. A kémcsoállványt kézzel óvatosan rázzuk össze, hogy a csövekben maradt buborékokat eltávolítsuk.
- 5. Inkubálja rázótermosztáton (400rpm) 120 percig szobahőmérsékleten.

6. Szívjuk, (vagy öntsük le) minden cső tartalmát (kivéve a teljes beütésszám meghatározására szánt csöveket). Győződjünk meg arról, hogy a leszívó berendezés műanyag csövének vége leér a bevonatos cső fenekére, hogy az összes folyadékot el tudjuk távolítani.
7. A csöveket 2 ml mosófolyadékkal mossuk (kivéve az összes beütésszám meghatározására szolgáló csöveket) és a mosófolyadékot szívjuk, vagy öntsük le. A mosófolyadék bemérése során kerüljük a felhabzást.
8. A csöveket helyezzük 2 percre függőlegesen fejjel lefelé és távolítsuk el a maradék folyadékcseppeket.
9. Gamma számláló segítségével 60 mp-ig mérjük a beütésszámot.

XI. EREDMÉNYEK KISZÁMÍTÁSA

1. Számoljuk ki a párhuzamos meghatározások (duplikátumok) átlagát
2. Számítsuk ki a megkötött radioaktivitást a zero(0) kalibrátor pontban mért kötés százalékában a következő képlet alapján:

$$\frac{B/B_0}{x} \times 100 = (\text{kalibrátor vagy minta beütésszáma} / \text{a zero kalibrátor beütésszáma}) \times 100$$

3. Szemi-logaritmikus, vagy logit-log milliméterpapíron tüntessük fel minden egyes kalibrátor pontra a $B/B_0 \times 100$ (%) értékeket az IGF-1 koncentráció függvényében. Az egyértelműen „kilógó” értékeket vessük el.
4. A kalibrációs görbét számítógép segítségével is felvehetjük. Amennyiben automatizált kiértékelést végzünk, 4 paraméteres logisztikai függvény illesztési módszert válasszunk.
5. A minta (B/B_0 (%)) értékeinek interpolációjával a kalibrációs görbéből határozzuk meg a minták IGF-1 koncentrációit.
6. Az összes radioaktivitás jelöletlen IGF-1 jelenlétében megkötött százalékos arányát (B_0/T) minden vizsgálat esetén ellenőrizni kell.

XII. JELLEMZŐ MÉRÉSI EREDMÉNYEK

A következő adatok csak példaként szolgálnak, soha ne használja őket a valós idejű kalibráció helyett.

IGF-1-RIA-CT	cpm	B/Bo (%)
Teljes radioaktivitás	71038	
Kalibrátor		
0,0 ng/ml	38117	100,0
33,0 ng/ml	35753	93,8
81,4 ng/ml	30816	80,8
228,8 ng/ml	19914	52,2
640,2 ng/ml	10525	27,6
1529,0 ng/ml	5331	14,0

XIII. A VIZSGÁLAT JELLEMZŐI ÉS KORLÁTAI

A. A kimutathatóság alsó határa
20 különböző zero kalibrátort vizsgáltak több más kalibrátorral szemben. A kimutathatósági határ, mely definíció szerint az átlagos beütésszám alatt 2 standard deviációnál (2SD) mért látszólagos koncentráció zero (0) bekötés esetén, 3,4 ng/ml értéknek adódott.

B. Specifititás

A keresztreakciók százalékos mértéke az 50%-os gátlást eredményező koncentrációértékeknél az alábbi eredményeket adta:

Vegyület	Keresztreaktivitás (%)
IGF-1	100,0
IGF-II	0,7
Inzulin	Nem mérhető
GH	Nem mérhető

Megjegyzés A táblázat értékeit anti-IGF-1-el határoztuk meg.

C. Reprodukálhatóság

VIZSGÁLATON BELÜLI				VIZSGÁLATOK KÖZÖTTI			
Savó	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)	Savó	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)
A	20	36,1 ± 3,3	9,1	A	17	129,1 ± 11,6	9,0
B	20	81,4 ± 1,9	1,9	B	17	362,5 ± 14,9	4,1
C	20	402,8 ± 6,8	1,7				

SD: standard deviáció; CV: variációs koefficiens

D. Pontosság

HÍGÍTÁSI VIZSGÁLAT			
Minta	Hígítás	Elméleti koncentráció (ng/ml)	Mért koncentráció (ng/ml)
Savó A	1/1	-	818
	1/2	409	418
	1/4	205	216
	1/8	102	110
	1/16	51	54
Savó B	1/1	-	501
	1/2	251	250
	1/4	125	130
	1/8	63	62
	1/16	31	26

A mintákat hígító pufferrel hígítottuk.

VISSZANYERÉS			
Minta	Hozzáadott IGF-1 (ng/ml)	Visszanyert IGF-1 (ng/ml)	Visszanyerés (%)
C1	17	18	108
C2	53	55	104
C3	160	164	103
C4	382	411	107

Átváltási együttható:

ng/ml-től nmol/L-ig: x 0.1307

nmol/L-től ng/ml-ig: x 7.649

XIV. BELSŐ MINŐSÉGELLENŐRZÉS

- Ha a kontroll 1-re és 2-re kapott eredmények kívül esnek az ampullák címkéin feltüntetett tartományon, a vizsgálat eredményei nem használhatók fel, kivéve, ha ismert az eltérés pontos oka.
- Igény esetén bármely laboratórium készíthet egy saját, kontrollként szolgáló savó-poolt, amit azután szétosztva, lefagyasztva kell tárolni.
- A párhuzamos vizsgálatok eredményei közötti eltérés elfogadható mértékét a GLP (Good Laboratory Practises) alapján kell meghatározni.

XV. REFERENCIATARTOMÁNY

Ezek az értékek tájékoztató jellegűek, minden laboratóriumnak magának kell megállapítania a saját normál értékeit.

Normál esetek:

Korcsoport	Férfiak (ng/ml)			Nők (ng/ml)		
	Átlag	Tartomány	N	Átlag	Tartomány	N
0 - 2 éves	102	73-184	14	98	59-143	3
3 - 5 éves	124	103-189	7	159	84-447	9
6 - 8 éves	177	115-249	9	276	79-432	10
9 - 11 éves	362	181-656	9	272	175-445	8
12 - 14 éves	315	168-557	10	418	202-1101	19
15 - 17 éves	409	224-592	9	414	138-658	25
18 - 20 éves	330	190-390	4	355	144-519	10
21 - 30 éves	313	235-408	6	310	191-478	52
31 - 40 éves	225	154-270	10	279	180-437	53
41 - 50 éves	222	160-318	15	233	123-406	39
51 - 60 éves	195	144-286	26	217	122-327	36
> 60 éves	171	94-245	23	186	91-320	27

Megjegyzés: a tartományok min-max értékek.

XVI. MUNKAVÉDELEM

Biztonsági előírások

Csak in vitro diagnosztikai felhasználásra.
A kit röntgen (28 keV) és gamma (35.5 keV) sugárzó ¹²⁵I izotópot (felezési idő: 60 nap) tartalmaz.
A reagenskészletben található radioaktív anyagot csak arra jogosult személyek vehetik át és használhatják fel. Radioaktív termékek beszerzésére, tárolására, használatára, és cseréjére az adott ország törvényei érvényesek. A reagensek alkalmazása embereken és állatokon is minden körülmények között tilos.
Minden, radioaktív reagenssel végzett műveletet egy arra kijelölt, elkülönített helyen kell elvégezni. A laboratóriumba érkezett radioaktív anyagok átvételéről és tárolásáról vezetett jegyzőkönyvet a laboratórium területén kell tartani. Azokat a laboratóriumi eszközöket és üvegedényeket, amelyek radioaktív anyaggal szennyeződhetnek, különítse el, hogy elkerülje a különböző radioizotópokkal történő keresztzennyeződést.

Amennyiben bármilyen radioaktív anyag kiömlik, azonnal takarítsa fel az erre vonatkozó előírásoknak megfelelő módon. A keletkező radioaktív hulladékot a helyi szabályoknak és az illetékes hatóságok erre vonatkozó útmutatásának megfelelően kell kidobni. Ha betartja a radioaktív anyagok kezelésére vonatkozó alapvető szabályokat, megfelelően védett lesz a sugárfertőzéstől.

A készlet emberi vérből készült reagensait európai szabványok szerinti és/vagy az FDA által minősített módszerrel HBsAg-tól, valamint anti-HCV, és anti-HIV-1 és 2 ellenanyagoktól mentesnek találták. Azonban egyetlen ma ismert módszer alapján sem állítható biztosan, hogy az emberi vérből készült anyagok nem okozhatnak hepatitist, AIDS-et vagy más fertőző betegséget. Ezért minden ilyen reagenst és minden savó-, illetve plazmamintát a fertőző anyagokra vonatkozó helyi biztonsági előírásoknak megfelelően kell kezelni.

Minden állati eredetű reagens és termék egészséges állatokból származik. A szarvasmarha eredetű reagensok olyan országokból származnak, ahonnan eddig nem jelentettek BSE esetet. Ennek ellenére minden állati eredetű anyagot tartalmazó reagenst potenciálisan fertőzésveszélyesként kell kezelni.

Vigyázzon, hogy a reagensok bőrrre ne kerüljenek (tartósítószer: nátrium-azid). A reagensekben található nátrium-azid robbanásveszélyes fém-azidokat képezhet ólom és réz csővezetékek anyagával. A csövek mosásakor nagy mennyiségű vízzel együtt öntse ki ezeket az anyagokat, hogy megelőzze az azid felgyülemlését.

Ne dohányozzon, ne fogyasszon ételt vagy italt, illetve ne használjon kozmetikumokat a laboratóriumban. Ne pipettázzon szájjal. Munka közben viseljen laborköpenyt és egyszer használatos kesztyűt.

XVII. IRODALOM

1. DAUGHADAY W.H. and ROTWEIN P. (1989)
Insulin-like growth factors I and II. peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum and tissue concentrations.
Endocrine Rev., 10(1) : 68-91.

2. FROESCH E.R. and ZAPF J. (1985)
Insulin-like growth factors and insulin : comparative aspects.
Diabetologia, 28 : 485-493.

3. FURLANETTO R.W., UNDERWOOD L., VAN WYK J.J., D'ERCOLE A.J. (1977)
Estimation of spmatomedin-C levels in normals and patients with pituitary disease by radioimmunoassay.
J. Clin. Invest. 60 : 648.

4. ROSENFELD R.G., WILSON D.M., LEE P.D.K. and HINTZ R.L. (1986)
Insulin-like growth factors I and II in evaluation of growth retardation.
J. Pediatr., 109 : 428.

5. RUDMAN D., KUTNER M.H. and CHAWLA R.K. (1985)
The short child with subnormal plasma somatomedin-C.
Pediatric Res., 19(10) : 975-980.

6. ALBERTSSON-WIKLAND K. and HALL K. (1987)
Growth hormone treatment in short children : relationship between growth and serum insulin-like growth factor I and II levels.
J. Clin. Endocrinol Metab., 65 : 671.

7. WASS J.A.H., CLEMMONS D.R., UNDERWOOD L.E., BARROW L., BESSER G.M. and VAN WYK J.J. (1982)
Changes in circulating somatomedin-C levels in bromocriptine treated acromegaly.
Clin. Endocrinol., 17 : 369-377.

8. DAUGHADAY W.H., MARIZ I.K. and BLETHEN S.L. (1980)
Inhibition of access of bound somatomedin to membrane receptor and immunobinding sites - a comparison of radioreceptor and radioimmunoassay of somatomedin in native and acid-ethanol extracted serum.
J. Clin. Endocrinol. Metab., 51 : 781.

9. BREIERB.H., GALLAHER B.W. and GLUCKMAN P.D. (1991)
Radioimmunoassay for insulin-like growth factor-I : solutions to some potential problems and pitfalls.
Journal of Endocrinology, 128 : 347-357.

10. SCHOUTEN J.S.A.G. and al. (1993)
IGF1 : a prognostic factor of knee osteoarthritis.
British J. Rheumatol., 32 : 274-280.

11. GRONBAEK H., SKJAERBAEK C., NIELSEN B., FRYSTYK J., FOEGH M.L., FLYVBJERG A., ORSKOV H. (1995)
Growth hormone and insulin-like growth factor-I: a suggested role in renal transplantation and graft vessel disease.
Transplant. Proceed., 27/3 : 2133-2136.

12. TSITOURAS P.D., ZHONG Y.G., SPUNGEN A.M., BAUMAN W.A. (1995)
Serum testosterone and growth hormone insulin-like growth factor-I in adults with spinal cord injury.
Hormone and metabolic Research , 27/6 : 287-292.

13. KOCH A., DORR H.G., GERLING S., BEHRENS R., BOHLES H.J. (1995)
Effect of growth hormone on IDF-I levels in patients with growth hormone deficiency and Wilson disease.
Hormone Research, 44/1 : 40-44.

XVIII. AZ ELJÁRÁS ÖSSZEFOGLALÁSA

	Összes beütésszám µl	Kalibrátorok µl	MINTÁ(K) KONTROLLOK µl
<u>ELŐKEZELÉS</u> Minták, kontrolllok Előkezelő oldat	- -	- -	50 50
Inkubálás	Vortexeld 5 másodrepcig, majd inkubáld 30 percig szobahőmérsékleten		
Hígító puffer	-	-	1000
Rázás	Vortex		
<u>INKUBÁLÁS</u> Kalibrátorok (0 - 5) Előkezelt minta, Kontorollok Tracer oldat	- - 200	100 - 200	- 100 200
Inkubálás	Rázótermosztáton (400 rpm) 120 percig szobahőmérsékleten		
Elválasztás Mosófolyadék (hígított) Elválasztás	-	Leszívás (vagy leöntés) 2,0 ml Leszívás (vagy leöntés)	
Számlálás	A csöveket 60 mp-ig számláljuk		

DIAsource Katalógusszám : KIP1588	P.I. Szám : 1700868/hu	Verziószám : 110204/1
--------------------------------------	---------------------------	--------------------------

Frissítés időpontja: 2011-02-04

	<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 SOLN CONC	Wash solution concentrated
CAL 0	Zero calibrator
CAL N	Calibrator #
CONTROL N	Control #
Ag 1251	Tracer
Ab 1251	Tracer
Ag 1251 CONC	Tracer concentrated
Ab 1251 CONC	Tracer concentrated
	Tubes
INC BUF	Incubation buffer
ACETONITRILE	Acetonitrile
SERUM	Serum
DIL SPE	Specimen diluent
DIL BUF	Dilution buffer
ANTISERUM	Antiserum
IMMUNOADSORBENT	Immunoabsorbent
DIL CAL	Calibrator diluent
REC SOLN	Reconstitution solution
PEG	Polyethylene glycol
EXTR SOLN	Extraction solution
ELU SOLN	Elution solution
GEL	Bond Elut Silica cartridges
PRE SOLN	Pre-treatment solution
NEUTR SOLN	Neutralization solution
TRACEUR BUF	Tracer buffer
	Microtiterplate
Ab HRP	HRP Conjugate
Ag HRP	HRP Conjugate
Ab HRP CONC	HRP Conjugate concentrate
Ag HRP CONC	HRP Conjugate concentrate
CONJ BUF	Conjugate buffer
CHROM TMB CONC	Chromogenic TMB concentrate
CHROM TMB	Chromogenic TMB solution
SUB BUF	Substrate buffer
STOP SOLN	Stop solution
INC SER	Incubation serum
BUF	Buffer
Ab AP	AP Conjugate
SUB PNPP	Substrate PNPP
BIOT CONJ CONC	Biotin conjugate concentrate
AVID HRP CONC	Avidine HRP concentrate
ASS BUF	Assay buffer
Ab BIOT	Biotin conjugate
Ab	Specific Antibody
SAV HRP CONC	Streptavidin HRP concentrate
NSB	Non-specific binding
2nd Ab	2nd Antibody
ACID BUF	Acidification Buffer
DIST	Distributor

	<u>Symboles utilisés</u>
	Consulter les instructions d'utilisation
	Température de conservation
	Utiliser jusqu'à
LOT	Numéro de lot
REF	Référence de catalogue
CONTROL	Contrôle
I V D	Dispositif médical de diagnostic in vitro
	Fabricant
	Contenu suffisant pour <n> tests
WASH SOLN CONC	Solution de lavage concentrée
CAL 0	Calibrateur zéro
CAL N	Calibrateur #
CONTROL N	Contrôle #
Ag 125I	Traceur
Ab 125I	Traceur
Ag 125I CONC	Traceur concentré
Ab 125I CONC	Traceur concentré
	Tubes
INC BUF	Tampon d'incubation
ACETONITRILE	Acétonitrile
SERUM	Sérum
DIL SPE	Diluant du spécimen
DIL BUF	Tampon de dilution
ANTISERUM	Antisérum
IMMUNOADSORBENT	Immunoabsorbant
DIL CAL	Diluant de calibrateur
REC SOLN	Solution de reconstitution
PEG	Glycol Polyéthylène
EXTR SOLN	Solution d'extraction
ELU SOLN	Solution d'élution
GEL	Cartouches Bond Elut Silica
PRE SOLN	Solution de pré-traitement
NEUTR SOLN	Solution de neutralisation
TRACEUR BUF	Tampon traceur
TIT	Microplaque de titration
Ab HRP	HRP Conjugué
Ag HRP	HRP Conjugué
Ab HRP CONC	HRP Conjugué concentré
Ag HRP CONC	HRP Conjugué concentré
CONJ BUF	Tampon conjugué
CHROM TMB CONC	Chromogène TMB concentré
CHROM TMB	Solution chromogène TMB
SUB BUF	Tampon substrat
STOP SOLN	Solution d'arrêt
INC SER	Sérum d'incubation
BUF	Tampon
Ab AP	AP Conjugué
SUB PNPP	Tampon PNPP
BIOT CONJ CONC	Biotine conjugué concentré
AVID HRP CONC	Avidine HRP concentré
ASS BUF	Tampon de test
Ab BIOT	Biotine conjugué
Ab	Anticorps spécifique
SAV HRP CONC	Concentré streptavidine HRP
NSB	Liant non spécifique
2nd Ab	Second anticorps
ACID BUF	Tampon d'acidification

	<u>Gebruikte symbolen</u>
	Raadpleeg de gebruiksaanwijzing
	Bewaartemperatuur
	Houdbaar tot
LOT	Lotnummer
REF	Catalogusnummer
CONTROL	Controle
IVD	Medisch hulpmiddel voor in-vitro diagnostiek
	Fabrikant
	Inhoud voldoende voor <n> testen
WASH SOLN CONC	Wasoplossing, geconcentreerd
CAL 0	Nulkalibrator
CAL N	Kalibrator #
CONTROL N	Controle #
Ag 125I	Tracer
Ab 125I	Tracer
Ag 125I CONC	Tracer geconcentreerd
Ab 125I CONC	Tracer geconcentreerd
	Buisjes
INC BUF	Incubatiebuffer
ACETONITRILE	Acetonitrile
SERUM	Serum
DIL SPE	Specimen diluent
DIL BUF	Verdunningsbuffer
ANTISERUM	Antiserum
IMMUNOADSORBENT	Immunoabsorbent
DIL CAL	Kalibratorverdunner
REC SOLN	Reconstitutieoplossing
PEG	Polyethyleen glycol
EXTR SOLN	Extractieoplossing
ELU SOLN	Elutieoplossing
GEL	Bond Elut Silica kolom
PRE SOLN	Pre-behandelingsoplossing
NEUTR SOLN	Neutralisatieoplossing
TRACEUR BUF	Tracerbuffer
U	Microtiterplaat
Ab HRP	HRP Conjugaat
Ag HRP	HRP Conjugaat
Ab HRP CONC	HRP Conjugaat geconcentreerd
Ag HRP CONC	HRP Conjugaat geconcentreerd
CONJ BUF	Conjugaat buffer
CHROM TMB CONC	Chromogene TMB geconcentreerd
CHROM TMB	Chromogene Oplossing TMB
SUB BUF	Substraatbuffer
STOP SOLN	Stopoplossing
INC SER	Incubatieserum
BUF	Buffer
Ab AP	AP Conjugaat
SUB PNPP	Substraat PNPP
BIOT CONJ CONC	Geconcentreerd Biotine conjugaat
AVID HRP CONC	Geconcentreerd Avidine-HRP conjugaat
ASS BUF	Assay buffer
Ab BIOT	Biotine conjugaat
Ab	Specifiek antilichaam
SAV HRP CONC	Streptavidine-HRP concentraat
NSB	Aspecifieke binding
2nd Ab	2de antilichaam
ACID BUF	Verzurringsbuffer

	<u>Gebrauchte Symbolen</u>
	Gebrauchsanweisung beachten
	Lagern bei
	Verwendbar bis
LOT	Chargenbezeichnung
REF	Bestellnummer
CONTROL	Kontrolle
I V D	In Vitro Diagnostikum
	Hersteller
	Ausreichend für <n> Ansätze
WASH SOLN CONC	Waschlösung-Konzentrat
CAL 0	Null kalibrator
CAL N	Kalibrator #
CONTROL N	Kontrolle #
Ag 125I	Tracer
Ab 125I	Tracer
Ag 125I CONC	Tracer Konzentrat
Ab 125I CONC	Tracer Konzentrat
	Röhrchen
INC BUF	Inkubationspuffer
ACETONITRILE	Azetonitril
SERUM	Humanserum
DIL SPE	Probenverdünner
DIL BUF	Verdünnungspuffer
ANTISERUM	Antiserum
IMMUNOADSORBENT	Immunadsorbens
DIL CAL	Kalibratorverdünnung
REC SOLN	Rekonstitutionslösung
PEG	Polyethylenglykol
EXTR SOLN	Extraktionslösung
ELU SOLN	Eluierungslösung
GEL	Bond Elut Silikakartuschen
PRE SOLN	Vorbehandlungslösung
NEUTR SOLN	Neutralisierungslösung
TRACEUR BUF	Tracer-Puffer
U	Mikrotiterplatte
Ab HRP	HRP Konjugat
Ag HRP	HRP Konjugat
Ab HRP CONC	HRP Konjugat Konzentrat
Ag HRP CONC	HRP Konjugat Konzentrat
CONJ BUF	Konjugatpuffer
CHROM TMB CONC	Chromogenes TMB Konzentrat
CHROM TMB	Farblösung TMB
SUB BUF	Substratpuffer
STOP SOLN	Stopplösung
INC SER	Inkubationsserum
BUF	Puffer
Ab AP	AP Konjugat
SUB PNPP	Substrat PNPP
BIOT CONJ CONC	Biotin-Konjugat-Konzentrat
AVID HRP CONC	Avidin-HRP-Konzentrat
ASS BUF	Assaypuffer
Ab BIOT	Biotin-Konjugat
Ab	Spezifischer Antikörper
SAV HRP CONC	HRP Streptavidinkonzentrat
NSB	Unspezifische Bindung
2nd Ab	Sekundärer Antikörper
ACID BUF	Ansäuerungspuffer

	<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
I V D	Dispositivo medico-diagnostico in vitro
	Fabbricante
	Contenuto sufficiente per <n> saggi
WASH SOLN CONC	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	Acetonitrile
SERUM	Siero
DIL SPE	Diluente campione
DIL BUF	Tampone diluizione
ANTISERUM	Antisiero
IMMUNOADSORBENT	Immunoassorbente
DIL CAL	Diluente calibratore
REC SOLN	Soluzione di ricostituzione
PEG	Polietilenglicole
EXTR SOLN	Soluzione di estrazione
ELU SOLN	Soluzione di eluizione
GEL	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
BUF	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>Símbolos utilizados</u>
	Consultar las instrucciones de uso
	Limitación de temperatura
	Fecha de caducidad
LOT	Código de lote
REF	Número de catálogo
CONTROL	Control
I V D	Producto sanitario para diagnóstico in vitro
	Fabricante
	Contenido suficiente para <n> ensayos
WASH SOLN CONC	Solución de lavado concentrada
CAL 0	Calibrador cero
CAL N	Calibrador #
CONTROL N	Control #
Ag 125I	Trazador
Ab 125I	Trazador
Ag 125I CONC	Trazador concentrada
Ab 125I CONC	Trazador concentrada
	Tubos
INC BUF	Tampón de incubación
ACETONITRILE	Acetonitrilo
SERUM	Suero
DIL SPE	Diluyente de Muestra
DIL BUF	Tampón de dilución
ANTISERUM	Antisuero
IMMUNOADSORBENT	Inmunoadsorbente
DIL CAL	Diluyente de calibrador
REC SOLN	Solución de Reconstitución
PEG	Glicol Polietileno
EXTR SOLN	Solución de extracción
ELU SOLN	Solución de elución
GEL	Cartuchos Bond Elut Silica
PRE SOLN	Solución de Pre-tratamiento
NEUTR SOLN	Solución de Neutralización
TRACEUR BUF	Tampón de trazador
UJ	Placa de microvaloración
Ab HRP	HRP Conjugado
Ag HRP	HRP Conjugado
Ab HRP CONC	HRP Conjugado concentrada
Ag HRP CONC	HRP Conjugado concentrada
CONJ BUF	Tampón de Conjugado
CHROM TMB CONC	Cromógena TMB concentrada
CHROM TMB	Solución Cromógena TMB
SUB BUF	Tampón de sustrato
STOP SOLN	Solución de Parada
INC SER	Suero de Incubación
BUF	Tampón
Ab AP	AP Conjugado
SUB PNPP	Sustrato PNPP
BIOT CONJ CONC	Concentrado de conjugado de biotina
AVID HRP CONC	Concentrado avidina-HRP
ASS BUF	Tampón de ensayo
Ab BIOT	Conjugado de biotina
Ab	Anticuerpo específico
SAV HRP CONC	Estreptavidina-HRP Concentrado
NSB	Unión no específica
2nd Ab	Segundo anticuerpo
ACID BUF	Tampón de Acidificación

	<u>Επεξήγηση συμβόλων</u>
	Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης
	Θερμοκρασία αποθήκευσης
	Ημερομηνία λήξης
LOT	Αριθμός παρτίδας
REF	Αριθμός καταλόγου
CONTROL	Πρότυπο ελέγχου
I V D	In Vitro Διαγνωστικό Ιατροτεχνολογικό προϊόν
	Κατασκευαστής
	Περιεχόμενο επαρκές για «n» εξετάσεις
WASH 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
	Σώληνάρια
INC BUF	Ρυθμιστικό διάλυμα επώασης
ACETONITRILE	Ακετονιτρίλιο
SERUM	Ορός
DIL SPE	Διάλυμα αραίωσης δειγμάτων
DIL BUF	Ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης
ANTISERUM	Αντιορός
IMMUNOADSORBENT	Ανοσοπροσροφητικό
DIL CAL	Αραιωτικό βαθμονομητών
REC SOLN	Διάλυμα ανασύστασης
PEG	Πολυαιθυλενογλυκόλη
EXTR SOLN	Διάλυμα εκχύλισης
ELU SOLN	Διάλυμα έκλυσης
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 συζευγμένο με βιοτίνη
AVID HRP CONC	Συμπυκνωμένο διάλυμα αβιδίνης-HRP
ASS BUF	Ρυθμιστικό διάλυμα προσδιορισμού
Ab BIOT	αντιδραστήριο συζευγμένο με βιοτίνη
Ab	Ειδικό Αντίσωμα
SAV HRP CONC	Συμπυκνωμένη στρεπταβιδίνη συνεξευγμένη με HRP
NSB	μη-ειδική δέσμευση
2nd Ab	2ο Αντίσωμα
ACID BUF	Ρυθμιστικό Διάλυμα όξινο

		<u>Stosowane symbole</u>
		Przed zastosowaniem zapoznać się z instrukcją
		Temperatura przechowywania
		Zużyć przed
LOT		Kod serii
REF		Numer katalogowy
CONTROL		Kontrola
I V D		Urządzenie medyczne do diagnostyki in vitro
		Producent
		Zawartość wystarczająca do <n> testów
WASH SOLN CONC		Roztwór płuczący stężony
CAL 0		Kalibrator zerowy
CAL N		Kalibrator nr
CONTROL N		Kontrola nr
Ag 125I		Znacznik izotopowy
Ab 125I		Znacznik izotopowy
Ag 125I CONC		Znacznik izotopowy stężony
Ab 125I CONC		Znacznik izotopowy stężony
		Probówki
INC BUF		Wymagana inkubacja buforu
ACETONITRILE		Acetonitryl
SERUM		Surowica
DIL SPE		Rozcieńczalnik próbek
DIL BUF		Bufor do rozcieńczania
ANTISERUM		Antysurowica
IMMUNOADSORBENT		Immunoabsorbent
DIL CAL		Rozcieńczalnik kalibratora
REC SOLN		Roztwór do rozcieńczania
PEG		Glikol poli(oksy)etylenowy
EXTR SOLN		Roztwór ekstrakcyjny
ELU SOLN		Roztwór elucyjny
GEL		Kolumny krzemionkowe Bond Elut
PRE SOLN		Roztwór do przygotowania wstępnego
NEUTR SOLN		Roztwór neutralizujący
TRACEUR BUF		Bufor znacznika
ULF		mikropłytki
Ab HRP		Koniugat peroksydazy chrzanowej
Ag HRP		Koniugat peroksydazy chrzanowej
Ab HRP CONC		Koncentrat koniugatu peroksydazy chrzanowej
Ag HRP CONC		Koncentrat koniugatu peroksydazy chrzanowej
CONJ BUF		Bufor do koniugacji
CHROM TMB CONC		Koncentrat chromogenu TMB (czterometylobenzydyny)
CHROM TMB		Roztwór chromogenu TMB (czterometylobenzydyny)
SUB BUF		Bufor substratu
STOP SOLN		Roztwór zatrzymujący reakcję
INC SER		Wymagana inkubacja surowicy
BUF		Bufor
Ab AP		Koniugat AP (fosfatazy alkalicznej)
SUB PNPP		p-nitrofenylofosforan substratowy
BIOT CONJ CONC		Koncentrat koniugatu biotyny
AVID HRP CONC		Koncentrat peroksydazy chrzanowej z awidyną
ASS BUF		Bufor do oznaczania
Ab BIOT		Koniugatu biotyny
Ab		Przeciwciało swoiste
SAV HRP CONC		Koncentrat streptawidyny HRP
NSB		Wiązanie nieswoiste
2nd Ab		Drugie przeciwciało
ACID BUF		Bufor zakwaszający

	<u>Használt szimbólumok</u>		
	Olvassa el a használati útmutatót		
	Tárolási hőmérséklet		
	Lejárat idő		
LOT	Gyártási kód		
REF	Katalógus szám		
CONTROL	Kontrol		
I V D	In vitro diagnosztikai eszköz		
	Gyártó		
	Tartalma <n> teszt elvégzésére elegendő		
WASH SOLN CONC	Mosó folyadék koncentrátum		
CAL 0	Zero kalibrátor		
CAL N	Kalibrátor #		
CONTROL N	Kontrol #		
Ag 125I	Nyomjelző izotóp		
Ab 125I	Nyomjelző izotóp		
Ag 125I CONC	Nyomjelző izotóp koncentrátum		
Ab 125I CONC	Nyomjelző izotóp koncentrátum		
	Csövek		
INC BUF	Inkubáló puffer		
ACETONITRILE	Acetonitril		
SERUM	Szérum		
DIL SPE	Mintahígító		
DIL BUF	Hígító puffer		
ANTISERUM	Antiszérum		
IMMUNOADSORBENT	Immunadszorbens		
DIL CAL	Kalibrátor hígító		
REC SOLN	Mintaelőkészítő oldat		
PEG	Polietilén glikol		
EXTR SOLN	Extrakciós oldat		
ELU SOLN	Eluáló oldat		
GEL	Bond Elut Silica szilikagél patronok		
PRE SOLN	Előkezelő oldat		
NEUTR SOLN	Semlegesítő oldat		
TRACEUR BUF	Nyomjelző izotóp hígító puffer		
U	Mikrotiter lemez		
Ab HRP	HRP konjugátum		
Ag HRP	HRP konjugátum		
Ab HRP CONC	HRP konjugátum koncentrátum		
Ag HRP CONC	HRP konjugátum koncentrátum		
CONJ BUF	Konjugátum puffer		
CHROM TMB CONC	Kromogén TMB koncentrátum		
CHROM TMB	Kromogén TMB oldat		
SUB BUF	Szubsztrát puffer		
STOP SOLN	Stop oldat		
INC SER	Inkubációs szérum		
BUF	Puffer		
Ab AP	AP konjugátum		
SUB PNPP	Szubsztrát PNPP		
BIOT CONJ CONC	Biotin konjugátum koncentrátum		
AVID HRP CONC	Avidin HRP koncentrátum		
ASS BUF	Vizsgálati puffer		
Ab BIOT	Biotin konjugátum		
Ab	Specifikus ellenanyag		
SAV HRP CONC	Sztreptavidin HRP koncentrátum		
NSB	Nem-specifikus kötődés		
2nd Ab	Másodlagos ellenanyag		
ACID BUF	Savas puffer		