



IGF-1-EASIA

KAP1581

Read entire protocol before use.

IGF1-EASIA

I. INTENDED USE

Immunoenzymetric assay for the *in vitro* quantitative measurement of human Insulin-like Growth Factor-I (IGF-I) in serum.

II. GENERAL INFORMATION

- A. **Proprietary name :** DIAsource IGF1-EASIA Kit
- B. **Catalogue number :** KAP1581 : 96 tests
- C. **Manufactured by :** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

For technical assistance or ordering information contact :
Tel : +32 (0)10 84.99.11 Fax : +32 (0)10 84.99.91

III. CLINICAL BACKGROUND

- A. **Biological activities**
Insulin-like growth factor I (IGF-I) 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-I). IGF-I 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-I 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-I, are regulated by growth hormone. IGF-I 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-I secretion and concentration, other factors are also determinant: the age (with a peak at adolescence), the sex, the nutritional status, and other hormones (oestrogen, thyroxine, prolactin, ...). Specific trophic stimuli mainly control IGF-I secretion in the local microenvironment of a particular organ (paracrine activities), while blood IGF-I 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-I 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-I 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-I 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-I values despite normal GH levels by conventional testing. The results of IGF-I assay must be interpreted cautiously by considering the normal variations of IGF-I during childhood and adolescence (see Rosenfeld et al).
 - **Acromegaly:** IGF-I 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-I measurements are also useful to monitor treatment.
 - **Research:** The IGF-I EASIA 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-I 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

The DIAsource IGF1-EASIA is a solid phase Enzyme Amplified Sensitivity Immunoassay performed on polystyrene microtiterplates.

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 EASIA assay for IGF1. The pre-treatment step used by DIAsource is the acid-ethanol procedure of Daughaday et al.(8)

A fixed amount of IGF1-labelled with horseradish peroxidase (HRP), compete with unlabelled IGF1 present in the calibrators, controls and samples for a limited number of binding sites on a specific antibody. After 1 hour incubation at room temperature, the microtiterplate is washed to stop the competition reaction. The Chromogenic solution (TMB) is added and incubated for 15 min. The reaction is stopped with the addition of Stop Solution and the microtiterplate is then read at the appropriate wavelength. The amount of substrate turnover is determined colourimetrically by measuring the absorbance, which is inversely proportional to the IGF1 concentration.

A calibration curve is plotted and IGF1 concentration in samples is determined by interpolation from the calibration curve.

V. REAGENTS PROVIDED

Reagents	96 tests Kit	Color Code	Reconstitution
 Microtiterplate with 96 anti IGF1 coated wells	96 wells	blue	Ready for use
Ag HRP CONC Conjugate: HRP labelled IGF1 in phosphate buffer with caseine and thymol	1 vial 0.2 ml	yellow	Dilute 100 x with conjugate buffer
CONJ BUF Conjugate buffer: Phosphate buffer with caseine and thymol	1 vial 11,5 ml	red	Ready for use
PRE SOLN Pre-treatment Solution containing ethanol	1 vial 20 ml	black	Ready for use
REC SOLN Reconstitution Solution containing ethanol	1 vial 10 ml	blue	Ready for use
NEUTR SOLN Neutralization Solution containing phosphate buffer with bovine casein and azide (<0.1%)	1 vial 30 ml	green	Ready for use
CAL 0 Zero calibrator in phosphate buffer with bovine casein	1 vial lyophilized	yellow	Add 1.0 ml reconstitution solution
CAL N Calibrators - N = 1 to 5 (see exact values on vial labels) in phosphate buffer with bovine casein.	5 vials lyophilized	yellow	Add 1.0 ml reconstitution solution
CONTROL N Controls - N = 1 or 2 in human serum with thymol	2 vials lyophilized	silver	Add 1.0 ml distilled water
WASH SOLN CONC Wash Solution (Tris-HCl)	1 vial 10 ml	brown	Dilute 200 x with distilled water (use a magnetic stirrer).
CHROM TMB Chromogenic TMB Solution (Tetramethylbenzidine)	1 vial 25 ml	brown	Ready for use
STOP SOLN Stop solution: HCl 1.0 N	1 vial 12 ml	white	Ready for use

Note: 1. Use the zero calibrator for sample dilutions.

2. 1 ng of the calibrator preparation is equivalent to 1 ng of the NIBSC 1st WHO IS 02/254.

VI. SUPPLIES NOT PROVIDED

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

- High quality distilled water
- Pipettes for delivery of: 50 µl, 100 µl, 400 µl, 500 µl, 600 µl and 1 ml (the use of accurate pipettes with disposable plastic tips is recommended)
- Optional: microcentrifuge tubes in polypropylene for pre-treatment of samples (for example:Eppendorf 3810)
- Polypropylene tubes for neutralization step (for example:Falcon 352063)
- Vortex mixer
- Magnetic stirrer
- Microcentrifuge or Centrifuge
- Washer for microtiterplates
- Horizontal microtiterplate shaker capable of 500 rpm
- Microtiterplate reader capable of reading at 450 nm and 650 nm (monochromatic reading)

VII. REAGENT PREPARATION

A. Calibrators: Reconstitute the zero calibrator and other calibrators with 1.0ml reconstitution solution.

B. Controls : Reconstitute the controls with 1.0 ml distilled water.

C Working IGF1-HRP conjugate : Prepare an adequate volume of conjugate solution by adding for example :20 µl of the 100 x concentrated IGF1-HRP conjugate to 2 ml of conjugate buffer. Use a vortex to homogenize. Extemporaneous preparation is recommended.

D. Working Wash solution : Prepare an adequate volume of Working Wash solution by adding 199 volumes of distilled water to 1 volume of Wash Solution (200x). 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 vial label, if kept at 2 to 8°C.
- Unused strips must be stored, at 2-8°C, in a sealed bag containing a desiccant until expiration date.
- 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
- The concentrated Wash Solution is stable at room temperature until expiration date.
- Freshly prepared Working Wash solution should be used on the same day..
- The Working IGF1-HRP conjugate is stable for 4 hours at room temperature, avoid direct sunlight.
- Alterations in physical appearance of kit reagents may indicate instability or deterioration.

IX. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

- Serum must be kept at 2 - 8°C.
- If the test is not run within 24 hours, storage in aliquots at -20°C is recommended. Avoid subsequent freeze thaw cycles.
- Prior to use, all samples should be at room temperature. It is recommended to vortex the samples before use.
- Do not use haemolysed samples.

X. PROCEDURE

A. Handling notes

Do not use the kit or components beyond expiry date.

Do not mix materials from different kit lots.

Bring all the reagents to room temperature prior to use.

Thoroughly mix all reagents and samples by gentle agitation or swirling.

Perform calibrators, controls and samples in duplicate. Vertical alignment is recommended.

Use a clean plastic container to prepare the Wash Solution.

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

For the dispensing of the Chromogenic Solution and the Stop Solution avoid pipettes with metal parts.

High precision pipettes or automated pipetting equipment will improve the precision.

Respect the incubation times.

To avoid drift, the time between pipetting of the first calibrator and the last sample must be limited to the time mentioned in section XIII paragraph E (Time delay).

Prepare a calibration curve for each run, do not use data from previous runs.

Dispense the Chromogenic Solution within 15 minutes following the washing of the microtiterplate.

During incubation with Chromogenic Solution, avoid direct sunlight on the microtiterplate.

B.1. Pre-treatment step for microfuge tubes**! Do not extract calibrators**

1. Label one microcentrifuge tube(for extraction) and one polypropylene tube (for neutralization) for each sample and control.
2. Dispense 100 µl of each sample and control into microfuge tube.
3. Add 400 µl of pre-treatment solution into this tube.
4. Close the tubes ,vortex and incubate 30 minutes at room temperature.
5. Centrifuge for 2 minutes at 10000 rpm.
6. Take 100 µl of the supernatant and transfer it into the polypropylene labelled tube.
7. Add 600 µl of the neutralisation solution to this tube.
8. Vortex each tube.

B.2. Pre-treatment step for other polypropylene tubes**! Do not extract calibrators**

1. Label two polypropylene tubes (one for extraction and the other for neutralization) for each sample and control.
2. Dispense 100 µl of each sample and control into extraction tube.
3. Add 400 µl of pre-treatment solution into this tube.
4. Close the tubes ,vortex and incubate 30 minutes at room temperature.
5. Centrifuge for 15 minutes at > or = 3000 rpm.
6. Take 100 µl of the supernatant and transfer it into the polypropylene labelled tube.
7. Add 600 µl of the neutralisation solution to this tube.
8. Vortex each tube.

C. Procedure

1. Select the required number of wells for the run. The unused wells should be resealed in the bag with a desiccant and stored at 2-8°C.
2. Secure the wells into the holding frame.
3. Pipette 50 µl of each Calibrator, extracted control and extracted sample into the appropriate wells.
4. Pipette 100 µl of IGF1-HRP conjugate solution into all the wells.
5. Incubate for 1 hour at room temperature on a shaker at 500 rpm.
6. Aspirate the liquid from each well.
7. Wash the plate 3 times by:
 - dispensing 0.4 ml of Wash Solution into each well
 - aspirating the content of each well
8. Pipette 200 µl of the Chromogenic solution into each well within 15 minutes following the washing step.
9. Incubate the microtiterplate for 15 minutes at room temperature on the shaker (500 rpm), avoid direct sunlight
10. Pipette 100 µl of Stop Solution into each well.
11. Read the absorbances at 450 nm (reference filter 630 nm or 650 nm) within 1 hour and calculate the results as described in section XI

XI. CALCULATION OF RESULTS

1. Read the plate at 450 nm against a reference filter set at 650 nm (or 630 nm).
2. Calculate the mean of duplicate determinations.
3. Calculate for each calibrator, control and sample:

$$B/B0(\%) = \frac{OD \text{ (Calibrator, Control or Sample)}}{OD \text{ (Zero Calibrator)}} \times 100$$

4. Using either linear-linear or semi-logarithmic graph paper, plot the (B/B0(%)) values for each calibrator point as a function of the IGF1 concentration of each calibrator point. Reject obvious outliers.
5. 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.

By interpolation of the sample (B/B0 (%)) values, determine the IGF1 concentrations of the samples from the calibration curve

XII. TYPICAL DATA

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

Calibrators	ng/ml	OD units
S0	0	2,400
S1	10	1,987
S2	25	1,567
S3	62	1,333
S4	226	0,838
S5	760	0,501

XIII. PERFORMANCE AND LIMITATIONS**A. Detection Limit**

Sixteen 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 OD at zero binding, was 7.8 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-I	100,0
IGF-II	0,7
Insuline	ND
GH	ND

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

C. Precision

Intra assay				Inter assay			
Sample	n	x +/- sd ng/ml	cv %	Sample	n	x +/- sd ng/ml	cv %
A	10	51,1 +/- 3,1	6,1	C	10	98,0 +/- 13,0	12,9
B	10	479,2 +/- 42,5	8,9	D	10	274,0 +/- 34,0	12,5

D. Accuracy**RECOVERY TEST**

Sample (ng)	Added IGF-1 (ng)	Expected (ng/ml)	Measured (ng/ml)	Recovery (%)
16	15	31	32	103,2
16	30	46	48	104,3
16	100	116	120	103,4
16	250	266	256	96,2
16	400	416	431	103,6
16	600	616	681	110,6

Sample (ng)	Added IGF-1 (ng)	Expected (ng/ml)	Measured (ng/ml)	Recovery (%)
17	15	32	32	100
17	30	47	45	95,7
17	100	117	128	109,4
17	250	267	288	107,9
17	400	417	508	121,8
17	600	617	785	127,2

DILUTION TEST

Sample A			Sample B		
Dil	Expected ng/ml	Measured ng/ml	Dil	Expected ng/ml	Measured ng/ml
1/1	540,0	540,0	1/1	875,0	875,0
1/2	270,0	266,0	1/2	438,0	440,0
1/4	135,0	115,0	1/4	219,0	183,0
1/8	68,0	62,0	1/8	109,0	79,0
1/16	34,0	37,0	1/16	55,0	46,1
1/32	17,0	25,3	1/32	27,0	31,1

Samples were diluted after extraction with zero calibrator

Conversion factor:

From ng/ml to nmol/L: x 0.13

From nmol/L to ng/ml: x 7.65

E. Time delay between last calibrator and sample dispensing

As shown hereafter, assay results remain accurate even when a sample is dispensed 30 minutes after the calibrators have been added to the coated wells.

Time delay	
0 minute	30 minutes
994,0 ng/ml	1057,0 ng/ml
458,0 ng/ml	476,0 ng/ml

XIV. INTERNAL QUALITY CONTROL

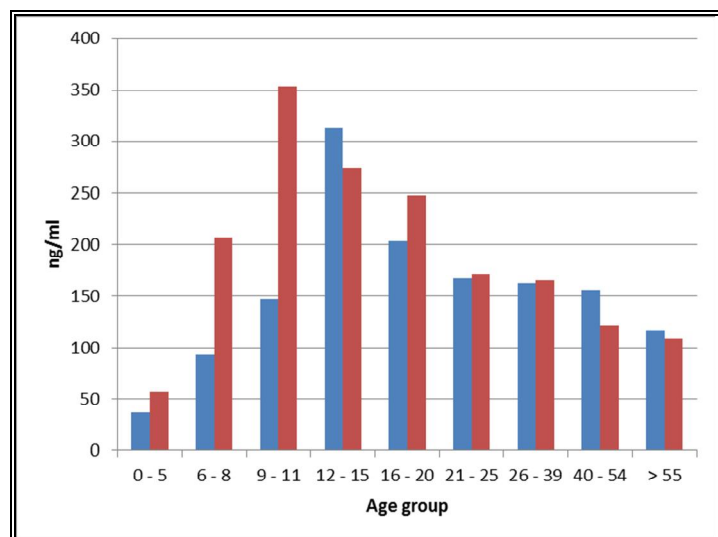
- If the results obtained for Control 1 and/or Control 2 are not within the range specified on the vial label, the results cannot be used unless a satisfactory explanation for the discrepancy has been given.
- If desirable, each laboratory can make its own pools of control samples, which should be kept frozen in aliquots. Controls which contain azide will interfere with the enzymatic reaction and cannot be used.
- Acceptance criteria for the difference between the duplicate results of the samples should rely on Good Laboratory Practices
- It is recommended that Controls be routinely assayed as unknown samples to measure assay variability. The performance of the assay should be monitored with quality control charts of the controls.
- It is good practise to check visually the curve fit selected by the computer.

XV. REFERENCE INTERVALS

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

Age group (years)	Males (ng/ml)			Females (ng/ml)		
	n	Median	Range	n	Median	Range
0 - 5	30	37	14 - 154	50	57	21 - 262
6 - 8	20	93	45 - 213	18	207	89 - 485
9 - 11	20	147	53 - 453	19	354	99 - 708
12 - 15	24	313	103 - 753	31	274	100 - 744
16 - 20	30	203	99 - 655	29	248	73 - 522
21 - 25	9	167	115 - 304	9	171	83 - 511
26 - 39	24	162	87 - 415	20	165	101 - 267
40 - 54	35	156	69 - 343	17	121	60 - 271
> 55	25	117	33 - 232	14	109	69 - 189

These ranges are expressed as 2.5% to 97.5% percentiles.



XVI. PRECAUTIONS AND WARNINGS

Safety

For *in vitro* diagnostic use only.

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 all reagents, Stop Solution contains HCl. In case of contact, wash thoroughly with water.

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 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.**SUMMARY OF THE PROTOCOL**

	CALIBRATORS µl	SAMPLE(S) CONTROLS µl
<u>PRE-TREATMENT</u>		
Samples, controls	-	100
Pre-treatment solution	-	400
Incubation Centrifugation	30 minutes RT 2 minutes at 10000 rpm (microfuge tubes) or 15 minutes at > or = 3000 rpm (polypropylene tubes)	
Supernatant	-	100
Neutralization Solution	-	600
Shaking	Vortex	
<i>INCUBATION</i> Calibrators (0 to 5)	50	-
Pre-treated Samples, controls	-	50
Diluted Conjugate	100	100
Incubate for 1 hour at room temperature on a shaker at 500 rpm Aspirate the contents of each well. Wash 3 times with 400 µl of Wash Solution and aspirate.		
Chromogenic Solution	200	200
Incubate for 15 min at room temperature on a shaker at 500 rpm		
Stop Solution	100	100
Read on a microtiterplate reader and record the absorbance of each well at 450 nm (versus 630 or 650 nm)		

DIAsource Catalogue Nr: KAP1581	P.I. Number : 1700772 / en	Revision nr : 120906/1
------------------------------------	-------------------------------	---------------------------

Revision date: 2012-09-06

Leer todo el protocolo antes de utilizar.

IGF1-EASIA

I. USO PREVISTO

Ensayo inmunoenzimático para la medición cuantitativa *in vitro* del factor de crecimiento insulínico tipo I (IGF-I) en suero.

II. INFORMACIÓN GENERAL

- A. **Nombre registrado:** DIAsource IGF1-EASIA Kit
- B. **Número de catálogo:** KAP1581 : 96 pruebas
- C. **Fabricado por :** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Bélgica.

Para obtener asistencia técnica o información sobre pedidos póngase en contacto con :

Teléfono : +32 (0)10 84.99.11 Fax : +32 (0)10 84.99.91

III. ANTECEDENTES CLÍNICOS

A. Actividad biológica

El factor de crecimiento insulínico tipo I (IGF-I) o Somatomedina-C (SM-C) es un polipéptido básico de una sola cadena de 70 amino ácidos (PM : 7649 Da) similar a la proinsulina (50% de secuencia homóloga), y al otro miembro de la familia de la somatomedina que ha sido bien caracterizado: IGF II (67AA, 70 % de secuencia homóloga con IGF-I). IGF-I es el factor más importante en la mediación de las acciones que promueven el crecimiento por la hormona del crecimiento, una hormona pituitaria con valores sanguíneos con grandes fluctuaciones debido a la liberación pulsátil. La concentración sanguínea de IGF-I es más estable debido a que se une a las proteínas transportadoras. La concentración de la proteína de unión predominante (PM 53000) así como la producción de IGF-I, son reguladas por la hormona del crecimiento (GH). IGF-I se produce en el hígado y otros tejidos y tiene actividad endocrina, paracrina y autocrina. Estimula el crecimiento y regula la diferenciación de varios tejidos, presenta actividades tipo insulina y estimula el crecimiento del cartilago. Aunque la hormona del crecimiento es el factor más importante en el control de la secreción y la concentración de IGF-I, otros factores también son determinantes: la edad (con un pico en la adolescencia), el sexo, el estado nutricional y otras hormonas (estrógeno, tiroxina, prolactina, ...). Los estímulos tróficos específicos principalmente controlan la secreción de IGF-I en el micro ambiente local de un órgano específico (actividades paracrinas), mientras que la concentración sanguínea de IGF-I es la variable más importante para el crecimiento sistémico equilibrado (actividades endocrinas).

B. Aplicaciones clínicas

· **Retardo del crecimiento:** El retardo del crecimiento puede deberse a varias causas, entre las cuales la producción deficiente de GH (hipopituitarismo), que está asociada con niveles sanguíneos bajos de IGF-I. Debido a las dificultades para obtener resultados que puedan interpretarse a partir de mediciones de GH (con pruebas dinámicas múltiples o de estimulación), la determinación de la concentración de IGF-I estable en plasma, a menudo se considera una prueba de detección simple para evaluar la "impregnación de la GH" en el paciente antes de decidir hacer investigaciones más exhaustivas. En varias situaciones clínicas con crecimiento retardado, se observan niveles bajos de IGF-I, no obstante la producción de GH es normal o elevada (p. ej. desnutrición, estados de enfermedades crónicas, algunos enanos por genética como los pigmeos, ...). Es interesante notar que menores con una disfunción neuro secretora individual de la GH, pueden presentar valores bajos de IGF-I a pesar de tener valores normales de GH en pruebas convencionales. Los resultados del ensayo IGF-I deben interpretarse con precaución tomando en cuenta las variaciones normales de IGF-I durante la niñez y la adolescencia (ver Rosenfeld et al).

· **Acromegalia:** Los niveles de IGF-I están aumentados en la acromegalia (producción excesiva de GH) y pueden servir como un indicador de la gravedad de la enfermedad. Los resultados son más fáciles de interpretar porque los valores normales están definidos con mayor facilidad en adultos. La medición de IGF-I también es útil para controlar tratamientos.

· **Investigación:** El kit IGF-I EASIA es una herramienta invaluable para estudiar las modificaciones de este factor del crecimiento durante situaciones fisiológicas (p. ej. embarazo) o patológicas (p. ej. diabetes) y la regulación local de la producción de IGF-I en relación a su actividad paracrina y autocrina (cicatrización de heridas, regeneración de órganos, crecimiento neoplásico, desarrollo fetal, regulación gonadal, etc.).

IV. PRINCIPIOS DEL MÉTODO

El DIASource IGF1-EASIA es un inmunoensayo enzimático de sensibilidad amplificada en fase sólida realizado en microplacas de poliestireno. En el kit actual, DIASource ha introducido un paso de tratamiento previo para mejorar el rendimiento clínico del ensayo. Se ha establecido con claridad que las proteínas de unión interfieren con el ensayo EASIA para IGF1. El tratamiento previo utilizado por DIASource es el procedimiento ácido-etanol de Daughaday et al.(8)

Una cantidad fija de IGF1 marcada con peroxidasa de rábano picante (HRP), compete, con IGF1 no marcada presente en los calibradores o las muestras, por un número limitado de sitios de unión de un anticuerpo específico. Después de una hora de incubación a temperatura ambiente, la placa se lava para detener la reacción competitiva. Se añade la solución cromogénica (TMB) y se incuba 15 min. La reacción se detiene añadiendo solución de parada y luego la microplaca se lee a la longitud de onda apropiada. La cantidad de sustrato utilizado se determina en forma colorimétrica midiendo la absorbancia, que es inversamente proporcional a la concentración de IGF1.

Se dibuja una curva de calibración y la concentración de IGF1 en las muestras se determina por interpolación a partir de la curva de calibración.

V. REACTIVOS SUMINISTRADOS

Reactivos			96 pruebas Kit	Código color	Reconstitución
 Microplaca con 96 pocillos recubiertos con anti IGF1			96 pocillos	azul	Listo para usar
Ag	HRP	CONC	1 vial 0,2 ml	amarillo	Diluir 100 x con tampón del conjugado
Conjugado: IGF1 marcada con HRP en tampón de fosfato con caseína y timol					
CONJ	BUF		1 vial 11,5 ml	rojo	Listo para usar
Tampón del conjugado: Tampón de fosfato con caseína y timol					
PRE		SOLN	1 vial 20 ml	negro	Listo para usar
Solución de tratamiento previo que contiene etanol					
REC		SOLN	1 vial 10 ml	azul	Listo para usar
Solución de reconstitución que contiene etanol					
NEUTR		SOLN	1 vial 30 ml	verde	Listo para usar
Solución neutralizante que contiene tampón de fosfato con caseína bovina y azida (<0,1%)					
CAL	0		1 vial liofilizado	amarillo	Añadir 1,0 ml de solución de reconstitución
Calibrador cero en tampón de fosfato con caseína bovina					
CAL	N		5 viales liofilizados	amarillo	Añadir 1,0 ml de solución de reconstitución
Calibradores - N = 1 al 5 (Ver valores exactos en las etiquetas de los viales) en tampón de fosfato con caseína bovina .					
CONTROL	N		2 viales liofilizados	plata	Añadir 1,0 ml de agua destilada
Controles - N = 1 o 2 en suero humano con timol					
WASH	SOLN	CONC	1 vial 10 ml	marrón	Diluir 200 x con agua destilada (utilizando un agitador magnético).
Solución de lavado (Tris-HCl)					
CHROM	TMB		1 vial 25 ml	marrón	Listo para usar
Solución cromogénica TMB (Tetrametilbencidina)					
STOP	SOLN		1 vial 12 ml	blanco	Listo para usar
Solución de parada: HCl 1,0 N					

Nota: 1. Utilizar el calibrador cero para diluir muestras.
2. 1 ng de la preparación del calibrador es equivalente a 1 ng del NIBSC 1st WHO IS 02/254.

VI. MATERIALES NO SUMINISTRADOS

- Los siguientes materiales son necesarios pero no son suministrados por el kit:
1. Agua destilada de alta calidad
 2. Pipetas para dispensar: 50 µl, 100 µl, 400 µl, 500 µl, 600 µl y 1 ml (se recomienda utilizar pipetas precisas con puntas plásticas desechables)
 3. Opcional: los microtubos para centrífuga en polipropileno para tratamiento previo de las muestras (p. ej.:Eppendorf 3810)
 4. Tubos de polipropileno para el paso de neutralización (p. ej.:Falcon 352063)
 5. Agitador Vortex
 6. Agitador magnético
 7. Micro centrífuga o centrífuga
 8. Lavadora de microplacas
 9. Agitador de microplacas horizontal a 500 rpm
 10. Lector de microplacas que pueda leer a 450 nm y 650 nm (lectura bi cromática)

VII. PREPARACIÓN DE REACTIVOS

- A. Calibradores:** Reconstituir el calibrador cero y los otros calibradores con 1,0 ml de solución de reconstitución.
- B. Controles :** Reconstituir los controles con 1,0 ml de agua destilada.
- C. Conjugado IGF1-HRP de trabajo :** Prepare un volumen adecuado de solución d conjugado añadiendo por ejemplo : 20 µl del conjugado IGF-HRP concentrado x 100 a 2 ml de tampón del conjugado. Utilizar un agitador Vortex para homogenizar. Se recomienda preparar inmediatamente antes de utilizar.
- D. Solución de lavado de trabajo:** Prepare un volumen adecuado de solución de lavado de trabajo añadiendo 199 volúmenes de agua destilada a 1 volumen de solución de lavado (200x). Utilice un agitador magnético para homogenizar. Elimine la solución de lavado de trabajo no utilizada al finalizar el día.

VIII. ALMACENAJE Y FECHA DE CADUCIDAD DE LOS REACTIVOS

- Antes de abrirlos o reconstituirlos todos los componentes de los kits son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del vial, si se mantienen a 2 a 8°C.
- Los pocillos no utilizados se deben almacenar a 2-8°C, en una bolsa sellada que contiene el desecante, hasta la fecha de caducidad.
- Después de reconstituir, los calibradores y controles son estables por una semana a 2 a 8°C. Para periodos de almacenaje prolongados, se deben preparar alícuotas almacenadas a -20°C por un máximo de 3 meses. Evitar ciclos de congelación y descongelación sucesivos.
- La solución de lavado concentrada es estable a temperatura ambiente hasta la fecha de caducidad.
- La solución de lavado recién preparada, se debe utilizar el mismo día..
- El conjugado IGF1-HRP de trabajo es estable por 4 horas a temperatura ambiente, evitar luz solar directa.
- Alteraciones de la apariencia física de los reactivos del kit pueden indicar inestabilidad o deterioro.

IX. TOMA DE LA MUESTRA Y PREPARACIÓN

- El suero debe mantenerse a 2 - 8°C.
- Si la prueba no se realiza dentro de las 24 horas, se recomienda almacenar en alícuotas a -20°C. Evitar ciclos de congelación y descongelación sucesivos.
- Ante de utilizarlas, todas las muestras deben estar a temperatura ambiente. Se recomienda agita las muestras en un Vortex antes del uso.
- No utilizar muestras hemolizadas.

X. PROCEDIMIENTO

- A. Notas sobre el manejo**
- No utilizar los componentes del kit después de la fecha de caducidad. No mezclar materiales de kits de diferentes lotes. Dejar que todos los reactivos alcancen temperatura ambiente antes de utilizar. Mezclar muy bien todos los reactivos y muestras agitando o girando suavemente. Analizar los calibradores, controles y muestras en duplicado. Se recomienda la alineación vertical. Utilizar un contenedor de plástico limpio para preparar la solución de lavado Para evitar contaminación cruzada utilizar una punta de pipeta desechable limpia para añadir cada reactivo y muestra. Para dispensar la solución cromogénica y la solución de parada, evitar utilizar pipetas con partes metálicas. Pipetas de alta precisión o equipo para dispensación automática mejorarán la precisión. Adherirse a los tiempos de incubación. Para evitar deriva, el periodo de transcurrido entre el pipeteo del primer calibrador y la última muestra se debe limitar al tiempo mencionado en la sección XIII párrafo E (Lapso de tiempo).

Preparar la curva de calibración para cada ensayo, no utilizar los datos de ensayos previos.
 Dispensar la Solución Cromogénica dentro de los 15 minutos posteriores al lavado de las microplacas.
 Durante la incubación con la solución cromogénica, evitar la luz solar directa sobre la microplaca.

B.1. Paso de tratamiento previo para tubos microfuge

! No extraer los calibradores

1. Etiquetar un tubo para micro centrífuga (para extracción) y un tubo de polipropileno (para neutralización) para cada muestra y control.
2. Dispensar 100 µl de cada muestra y control en el tubo microfuge.
3. Añadir 400 µl de solución de tratamiento previo en ese tubo.
4. Tapar los tubos, agitar en Vortex e incubar 30 minutos a temperatura ambiente.
5. Centrifugar 2 minutos a 10000 rpm.
6. Extraer 100 µl del sobrenadante y transferir al tubo de polipropileno etiquetado.
7. Añadir 600 µl de la solución neutralizante en este tubo.
8. Agitar cada tubo en un Vortex.

B.2. Paso de tratamiento previo para otros tubos de polipropileno

! No extraer los calibradores

1. Etiquetar dos tubos de polipropileno (uno para extracción y otro para neutralización) para cada muestra y control.
2. Dispensar 100 µl de cada muestra y control en el tubo de extracción.
3. Añadir 400 µl de solución de tratamiento previo en ese tubo.
4. Tapar los tubos, agitar en Vortex e incubar 30 minutos a temperatura ambiente.
5. Centrifugar 15 minutos a > o = 3000 rpm.
6. Extraer 100 µl del sobrenadante y transferir al tubo de polipropileno etiquetado.
7. Añadir 600 µl de la solución neutralizante en este tubo.
8. Agitar cada tubo en un Vortex.

C. Procedimiento

1. Seleccionar el número requerido de pocillos para el ensayo. Las tiras no utilizadas deben sellarse en la bolsa con un desecante y almacenadas a 2-8°C.
2. Fijar las tiras en el marco de sostén.
3. Pipetear 50 µl de cada calibrador, control extraído y muestra extraída en el pocillo correspondiente
4. Pipetear 100 µl de solución del conjugado IGF1-HRP en todos los pocillos.
5. Incubar 1 hora a temperatura ambiente en un agitador a 500 rpm.
6. Aspirar el líquido de cada pocillo.
7. Lavar la placa 3 veces:
 - dispensando 0,4 ml de solución de lavado en cada pocillo
 - aspirando el contenido de cada pocillo
8. Pipetear 200 µl de solución cromogénica en cada pocillo dentro de 15 minutos después del paso de lavado.
9. Incubar la microplaca durante 15 minutos a temperatura ambiente en el agitador (500 rpm), evitar la luz solar directa
10. Pipetear 100 µl de solución de parada en cada pocillo.
11. Leer las absorbancias a 450 nm (filtro de referencia 630 nm o 650 nm) en 1 hora y calcular los resultados como se ha descrito en la sección XI.

XI. CÁLCULO DE RESULTADOS

1. Leer la placa a 450 nm contra un filtro de referencia a 650 nm (o 630 nm).
2. Calcular la media de los duplicados.
3. Calcular para cada calibrador, control y muestra:

$$B/B0(\%) = \frac{DO(\text{Calibrador, Control o Muestra})}{DO(\text{Calibrador cero})} \times 100$$

4. Utilizando papel de gráfico semi logarítmico lineal-lineal dibujar los valores (B/B0(%)) para cada punto de los calibradores como función de la concentración de IGF1 de cada punto de calibración. Eliminar los valores extremos.
5. El análisis de datos asistido por un ordenador también puede utilizarse para construir una curva de calibración. Si se utiliza un sistema de procesamiento automático, se recomienda el ajuste de la curva dada por la función logística de 4 parámetros.

Interpolando los valores (B/B0 (%)) de la muestra, determinar la concentración IGF1 de las muestras de la curva de calibración

XII. DATOS TÍPICOS

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

Calibradores	ng/ml	Unidades DO
S0	0	2,400
S1	10	1,987
S2	25	1,567
S3	62	1,333
S4	226	0,838
S5	760	0,501

XIII. RENDIMIENTO Y LIMITACIONES

A. Límite de detección

Se analizaron 16 calibradores cero en conjunto von un grupo de otros calibradores. El límite de detección, definido como la concentración aparente de dos desviaciones estándar por debajo del promedio de la DO cuando la unión es cero fue de 7,8 ng/ml

B. Especificidad

Los porcentajes de reacción cruzada estimada en comparación con la concentración que produce un 50% de inhibición son respectivamente:

Compuesto	Reacción cruzada %
IGF-I	100,0
IGF-II	0,7
Insulina	ND
GH	ND

Nota: esta tabla muestra la reacción cruzada para el IGF-I.

C. Precisión

Intra ensayo				Entre ensayos			
Muestra	n	x +/- sd ng/ml	cv %	Muestra	n	x +/- sd ng/ml	cv %
A	10	51,1 +/- 3,1	6,1	C	10	98,0 +/- 13,0	12,9
B	10	479,2 +/- 42,5	8,9	D	10	274,0 +/- 34,0	12,5

D. Exactitud

PRUEBA DE RECUPERACIÓN

Muestra (ng)	IGF-1 añadido (ng)	Esperado (ng/ml)	Medido (ng/ml)	Recuperación (%)
16	15	31	32	103,2
16	30	46	48	104,3
16	100	116	120	103,4
16	250	266	256	96,2
16	400	416	431	103,6
16	600	616	681	110,6

Muestra (ng)	IGF-1 añadido (ng)	Esperado (ng/ml)	Medido (ng/ml)	Recuperado (%)
17	15	32	32	100
17	30	47	45	95,7
17	100	117	128	109,4
17	250	267	288	107,9
17	400	417	508	121,8
17	600	617	785	127,2

PRUEBA DE DILUCIÓN					
Muestra A			Muestra B		
Dil	Esperado ng/ml	Medido ng/ml	Dil	Esperado ng/ml	Medido ng/ml
1/1	540,0	540,0	1/1	875,0	875,0
1/2	270,0	266,0	1/2	438,0	440,0
1/4	135,0	115,0	1/4	219,0	183,0
1/8	68,0	62,0	1/8	109,0	79,0
1/16	34,0	37,0	1/16	55,0	46,1
1/32	17,0	25,3	1/32	27,0	31,1

Después de la extracción, las muestras se diluyeron con calibrador cero

Factor de conversión:
De ng/ml a nmol/l: x 0,13
De nmol/l a ng/ml: x 7,65

- E. **Lapso de tiempo entre la dispensación del último calibrador y la muestra**
Como se muestra más adelante, los resultados del ensayo continúan siendo precisos aun cuando la muestra se añade 30 minutos después que los calibradores han sido añadidos a los pocillos recubiertos

Lapso de tiempo	
minuto 0	30 minutos
994,0 ng/ml	1057,0 ng/ml
458,0 ng/ml	476,0 ng/ml

XIV. CONTROL DE CALIDAD INTERNO

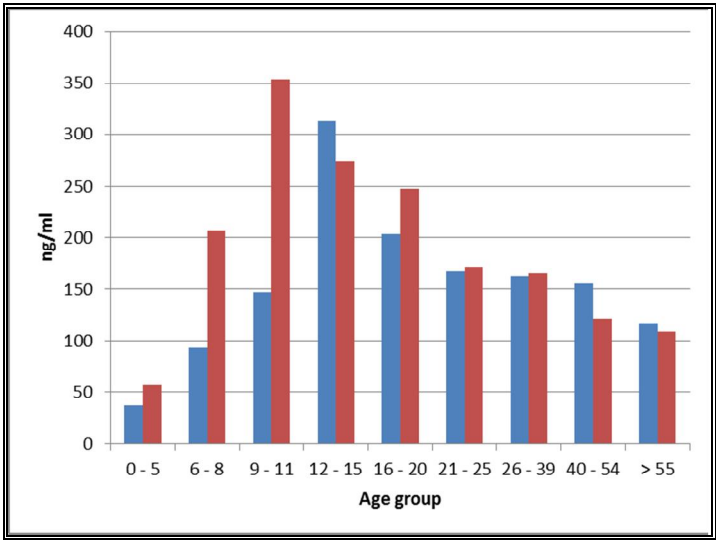
- Si los resultados obtenidos para el Control 1 y/o Control 2 no están dentro del rango especificado en la etiqueta del vial, los resultados obtenidos no podrán ser utilizados a no ser que se pueda dar una explicación convincente de dicha discrepancia
- Si es conveniente, cada laboratorio puede preparar sus propios grupos de muestras de control, las que deben almacenarse en alícuotas congeladas. Los controles que contienen azida interferirán con la reacción enzimática y no se deben utilizar.
- Los criterios de aceptación de las diferencias entre los resultados de los duplicados de las muestras deben depender de las Buenas Prácticas de Laboratorio
- Recomendamos que los controles sean incluidos rutinariamente en los ensayos como muestras desconocidas para medir la variabilidad del ensayo. El funcionamiento del ensayo debe ser controlado con gráficos de control de calidad de los controles
- Se considera como buena práctica controlar visualmente el ajuste de la curva seleccionada por el ordenador.

XV. INTERVALOS DE REFERENCIA

Estos valores son solo una guía, cada laboratorio debe establecer su propio rango de valores normales.

Grupo etario (años)	Hombres (ng/ml)			Mujeres (ng/ml)		
	n	Mediana	Rango	n	Mediana	Rango
0 - 5	30	37	14 - 154	50	57	21 - 262
6 - 8	20	93	45 - 213	18	207	89 - 485
9 - 11	20	147	53 - 453	19	354	99 - 708
12 - 15	24	313	103 - 753	31	274	100 - 744
16 - 20	30	203	99 - 655	29	248	73 - 522
21 - 25	9	167	115 - 304	9	171	83 - 511
26 - 39	24	162	87 - 415	20	165	101 - 267
40 - 54	35	156	69 - 343	17	121	60 - 271
> 55	25	117	33 - 232	14	109	69 - 189

Estos rangos están expresados como percentiles 2,5% a 97,5%.



XVI. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

Seguridad

Solo para uso de diagnóstico *in vitro*.
Los componentes de sangre humana utilizados en este kit han sido analizados con métodos aprobados en Europa y/o la FDA resultando negativos para HBsAg, anti-VHC, anti-VIH-I 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 de suero o plasma se hará de acuerdo con los procedimientos de seguridad locales.
Todos los productos animales y derivados de éstos, han sido obtenidos a partir de animales sanos. Componentes bovinos originales de países donde BSE no ha sido informado. Sin embargo, los componentes que contienen sustancias animales deberán ser considerados como potencialmente infecciosos.
Evitar contacto de la piel con todos los reactivos, la Solución de Parada contiene HCl. En caso de contacto, lavar con abundante agua.
No fumar, beber, comer o utilizar cosméticos en el área de trabajo. No pipetear con la boca. Utilizar ropa de protección y guantes.

XVII. BIBLIOGRAFÍA

- 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.
- FROESCH E.R. and ZAPF J. (1985)
Insulin-like growth factors and insulin : comparative aspects.
Diabetologia, 28 : 485-493.
- 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.
- 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.
- RUDMAN D., KUTNER M.H. and CHAWLA R.K. (1985)
The short child with subnormal plasma somatomedin-C.
Pediatric Res., 19(10) : 975-980.
- 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.
- 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

	CALIBRADORES μl	MUESTRA(S) CONTROLES μl
TRATAMIENTO PREVIO Muestras, controles Solución de tratamiento previo	- -	100 400
Incubación Centrifugación	30 minutos TA 2 minutos a 10000 rpm (tubos microfuge) o 15 minutos a > o = 3000 rpm (tubos de polipropileno)	
Sobrenadante Solución de neutralización	- -	100 600
Agitación	Vortex	
<i>INCUBACIÓN</i> Calibradores (0 a 5) Muestras con tratamiento previo, controles Conjugado diluido	50 - 100	- 50 100
Incubar 1 hora a temperatura ambiente en un agitador a 500 rpm Aspirar el contenido de cada pocillo. Lavar 3 veces con 400 μl de solución de lavado y aspirar.		
Solución cromogénica	200	200
Incubar 15 min a temperatura ambiente en un agitador a 500 rpm		
Solución de parada	100	100
Leer en un lector de microplaca y registrar la absorbancia de cada pocillo a 450 nm (versus 630 o 650 nm)		

DIAsource Catálogo Nr: KAP1581	P.I. Número : 1700772 / es	Revisión nr : 120906/1
-----------------------------------	-------------------------------	---------------------------

Fecha de revisión: 2012-09-06

Przed zastosowaniem należy przeczytać cały protokół.

IGF1-EASIA

I. PRZEZNACZENIE

Oznaczenie immunoenzymatyczne do ilościowego pomiaru *in vitro* ludzkiego insulinopochodnego czynnika wzrostu I (IGF-I) w surowicy.

II. INFORMACJE OGÓLNE

- A. Nazwa firmowa: DIAsource IGF1-EASIA
- B. Numer katalogowy: KAP1581 : 96 oznaczeń
- C. Wyprodukowano przez: DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgia.

Dział pomocy technicznej oraz informacje dotyczące zamówień:

Tel.: +32 (0)10 84.99.11

Fax: +32 (0)10 84.99.91

III. INFORMACJE KLINICZNE

A. Aktywność biologiczna

Insulinopochodny czynnik wzrostu I (IGF-I) lub somatomedyna C (SM-C) jest jednołańcuchowym 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-I). IGF-I 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-I we krwi jest bardziej stabilne ze względu na wiązanie się z nośnikami białkowymi. Stężenie dominującego białka wiążącego (masa cząsteczkowa 53000) podobnie jak produkcja IGF-I są regulowane przez hormon wzrostu. IGF-I 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-I, inne czynniki są również istotne: wiek (szczytowe wartości w czasie pokwitania), płeć, stan odżywienia i inne hormony (estrogeny, tyroksyna, prolaktyna,...). Wydzielanie IGF-I w lokalnym mikrośrodkowisku w określonej tkance jest kontrolowane przez swoiste stymuliny troficzne (działanie parakrynowe), podczas gdy na stężenie IGF-I 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-I 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-I 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-I 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-I u dzieci z niewielką dysfunkcją neuro-wydzielniczą GH pomimo prawidłowych poziomów GH wykrywanych w badaniach konwencjonalnych. Biorąc pod uwagę fizjologiczną zmienność IGF-I w dzieciństwie i okresie dojrzewania, wyniki oznaczenia IGF-I muszą być interpretowane z ostrożnością (szczegóły w opracowaniu Rosenfeld i wsp.).

Akromegalia : Poziomy IGF-I 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-I są również przydatne do monitorowania leczenia.

Badania naukowe: Zestaw do badania IGF-I 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-I 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

Test DAsource IGF1-EASIA jest przeprowadzanym w fazie stałej oznaczeniem immunoenzymatycznym z amplifikacją czułości, wykonywanym na mikropłytkach polistyrenowych.

W obecnym zestawie, DAsource wprowadził etap przygotowawczy, którego celem jest polepszenie charakterystyki klinicznej testu. Interferencja białek wiążących z testem EASIA do oznaczania IGF1 została dobrze udokumentowana. Etap przygotowawczy wykorzystywany w oznaczeniu DAsource jest procedurą etanolową w środowisku kwaśnym, opisaną przez Daughaday’a i wsp. (8).

Znana ilość IGF1 znakowanego peroksydazą chrzanową (HRP), współzawodniczy z nieznakowanym IGF1 obecnym w kalibratorach, kontrolach i próbkach o ograniczonej ilości miejsc wiążących swoistego przeciwciała. Po jednogodzinnej inkubacji w temperaturze pokojowej, mikropłytką jest przemycana w celu zatrzymania reakcji współzawodnictwa. Następnie dodawany jest roztwór chromogenny (TMB) i przeprowadzana 15-minutowa inkubacja. Reakcja jest zatrzymywana przez dodanie roztworu hamującego reakcję i następnie mikropłytką jest odczytywana przy odpowiedniej długości fali. Ilość związanego substratu jest oznaczana kolorymetrycznie, poprzez pomiar absorbancji, której wartość jest odwrotnie proporcjonalna do stężenia IGF1. Wykreślana jest krzywa kalibracyjna a stężenia IGF1 w próbkach są określane przez interpolację z krzywej kalibracyjnej.

V. ODCZYNNIKI DOSTARCZONE

Odczynniki	Zestaw 96 oznaczeń	Kolor	Rekonstytucja
 Mikropłytki z 96 studzienkami pokrytymi przeciwciałami anti-IGF1	96 studzienek	niebieski	Gotowy do zastosowania
Ag HRP CONC Koniugat: IGF1 znakowane HRP w buforze fosforanowym z kazeiną i tymolem	1 fiolka 0,2 ml	żółty	Rozcieńcz 100 x buforem koniugatu
CONJ BUF Bufor koniugatu: Bufor fosforanowy z kazeiną i tymolem	1 fiolka 11,5 ml	czerwony	Gotowy do zastosowania
PRE SOLN Roztwór przygotowawczy zawierający etanol	1 fiolka 20 ml	czarny	Gotowy do zastosowania
REC SOLN Roztwór do rekonstytucji zawierający etanol	1 fiolka 10 ml	niebieski	Gotowy do zastosowania
NEUTR SOLN Roztwór neutralizujący zawierający bufor fosforanowy z kazeiną bydlęcą i azydkiem (<0,1%)	1 fiolka 30 ml	zielony	Gotowy do zastosowania
CAL 0 Kalibrator zerowy w buforze fosforanowym z kazeiną bydlęcą	1 fiolka materiał liofilizowany	żółty	Dodaj 1,0 ml roztworu do rekonstytucji
CAL N Kalibratory - N = od 1 do 5 (dokładne wartości na etykietach fiolek) w buforze fosforanowym z kazeiną bydlęcą.	5 fiolek materiał liofilizowany	żółty	Dodaj 1,0 ml roztworu do rekonstytucji
CONTROL N Kontrola - N = od 1 do 2 w surowicy ludzkiej z tymolem	2 fiolek materiał liofilizowany	srebrny	Dodać 0,5 ml wody destylowanej
WASH SOLN CONC Roztwór płuczący (TRIS HCl)	1 fiolka 10 ml	brązowy	Rozcieńczyć 200x wodą destylowaną (wykorzystać mieszadło magnetyczne).
CHROM TMB Chromogeny roztwór TMB (tetrametylobenzyna)	1 fiolka 25 ml	brązowy	Gotowy do zastosowania

STOP SOLN	1 fiolka 12 ml	biały	Gotowy do zastosowania
Roztwór hamujący reakcję: HCl 1.0 N			

Uwaga: 1. Dla rozcieńczeń próbek należy stosować kalibrator zerowy.
2. 1 ng przygotowanego kalibratora jest równoważny 1 ng pierwszego wzorca WHO IS 02/254 - NIBSC.

VI. MATERIAŁY WYMAGANE, ALE NIEDOSTARCZONE

- Poniższe materiały są wymagane, ale nie są dostarczone w zestawie:
- Wysokiej jakości woda destylowana
 - Pipety do dozowania: 50 µl, 100 µl, 400 µl, 500 µl, 600 µl i 1 ml (zaleca się korzystanie z dokładnych pipet z jednorazowymi końcówkami plastikowymi)
 - Opcjonalnie: próbki do mikrowirowania w polipropylenie do przygotowywania próbek (przykładowo: Eppendorf 3810)
 - Próbki polipropylenowe dla etapu neutralizacji (przykładowo: Falcon 352063)
 - Mieszadło wirowe
 - Mieszadło magnetyczne
 - Mikrowirówka lub wirówka
 - Przemycarka dla mikropłyt
 - Pozioma wytrząsarka mikropłyt
 - Czytnik mikropłyt
 - możliwość odczytu w pasmach 450 nm i 650 nm (odczyt monochromatyczny)

VII. PRZYGOTOWANIE ODCZYNNIKÓW

- A. Kalibratory: Rekonstruować kalibratory przy pomocy 1 ml roztworu do rekonstytucji.
- B. Kontrole: Kontrole należy rekonstruować przy pomocy 1 ml wody destylowanej.
- C. Roboczy roztwór koniugatu IGF1-HRP: Przygotować właściwą objętość roztworu koniugatu poprzez dodanie, przykładowo: 20 µl rozcieńczonego 100 x stężonego koniugatu IGF1-HRP do 2 ml buforu koniugatu. Homogenizować roztwór wórksem. Zalecane jest doraźne przygotowanie roztworu.
- D. Roboczy roztwór płuczący: Właściwą objętość roboczego roztworu płuczającego należy przygotować dodając 199 objętości wody destylowanej do 1 objętości roztworu płuczającego (200x). Do homogenizacji należy wykorzystać mieszadło 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 etykietach, jeżeli są przechowywane w temperaturze od 2 do 8°C.
- Niezużyte paski muszą być przechowywane do momentu upływu daty ważności w temperaturze 2-8°C, w szczelnym woreczku z substancją osuszającą.
- Po rekonstytucji, kalibratory i kontrole zachowują trwałość przez 1 tydzień, pod warunkiem przechowywania w temperaturze od 2 do 8°C. W celu dłuższego przechowywania, należy zamrozić w małych objętościach. Możliwe jest wówczas przechowywanie przez maksymalnie 3 miesiące, w temperaturze -20°C. Unikać powtórnego zamrażania i rozmrażania.
- Stężony roztwór płuczający jest stabilny w temperaturze pokojowej do momentu upływu daty ważności.
- Świeżo przygotowany roboczy roztwór płuczający powinien być wykorzystany w tym samym dniu.
- Roboczy roztwór IGF1-HRP jest stabilny przez 4 godziny w temperaturze pokojowej; unikać bezpośredniego światła słonecznego.
- Zmiany w wyglądzie fizycznym odczynników w zestawie mogą wskazywać na ich niestabilność lub zużycie.

IX. POBIERANIE I PRZYGOTOWANIE MATERIAŁU DO BADANIA

- Próbki surowicy muszą być przechowywane w temperaturze 2-8°C.
- Jeżeli oznaczenie nie jest wykonywane w ciągu 24 godzin, niewielkie objętości należy przechowywać w temperaturze -20°C. Unikać powtarzanych cykli zamrażania-odmrażania.
- Przed użyciem, wszystkie próbki powinny osiągnąć temperaturę pokojową. Zaleca się wórkowanie próbek przed użyciem.
- Nie należy wykorzystywać próbek zhemolizowanych.

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.
Kalibratory, kontrole i próbki oznacz podwójnie. Zalecane jest ustawienie pionowe.
Do przygotowania roztworu płuczącego użyj czystego, plastikowego pojemnika.
Aby uniknąć zanieczyszczenia krzyżowego, do dodawania poszczególnych odczynników i próbek należy wykorzystywać czyste końcówki jednorazowe pipet.
Do odmierzania roztworu chromogenego i roztworu hamującego reakcję należy unikać stosowania pipet z metalowymi końcówkami.
Pipety wysokiej precyzji lub pipety automatyczne poprawiają precyzję wykonania oznaczenia.
Przestrzegać czasów inkubacji.
W celu uniknięcia płynięcia parametrów, czas pomiędzy odczytem pipetą pierwszego kalibratora i ostatniej próbki musi być ograniczony do czasu podanego w akapicie E sekcji XIII (Opóźnienie czasowe).
Przygotować krzywą kalibracyjną dla każdego cyklu pomiarowego, nie wolno wykorzystywać danych z poprzednich oznaczeń.
Odmierzyć roztwór chromogeny w czasie 15 minut od momentu przemycia mikropłytki.
Podczas inkubacji roztworu chromogenego należy unikać narażania mikropłytki na bezpośrednie działanie światła słonecznego.

B.1. Etapy przygotowania próbek do mikrowirowania

! Nie ekstrahować kalibratorów

- 1. Dla każdej próbki i kontroli, oznaczyć jedną próbkę do mikrowirowania (do ekstrakcji) i jedną próbkę polipropylenową (do neutralizacji).
- 2. Odmierzyć 100 µl każdej próbki i kontroli do próbki do mikrowirowania.
- 3. Do tej próbki dodać 400µl roztworu przygotowawczego.
- 4. Zamknąć próbkę, worteksować i inkubować 30 minut w temperaturze pokojowej.
- 5. Odwirować przez 2 minuty w 10000 rpm.
- 6. Odciągnąć 100 µl supernatantu i przenieść do oznaczonej próbki polipropylenowej.
- 7. Do próbki tej dodać 600 µl roztworu neutralizującego.
- 8. Każda próbka musi być wymieszana przez wirowanie.

B.2. Etapy przygotowania dla innych próbek polipropylenowych

! Nie ekstrahować kalibratorów

- 1. Dla każdej próbki i kontroli, oznaczyć dwie próbki polipropylenowe (jedną do ekstrakcji i jedną do neutralizacji).
- 2. Odmierzyć 100 µl każdej próbki i kontroli do próbki do ekstrakcji.
- 3. Do tej próbki dodać 400µl roztworu przygotowawczego.
- 4. Zamknąć próbki, worteksować i inkubować 30 minut w temperaturze pokojowej.
- 5. Odwirować przez 15 minut w > lub = 3000 rpm.
- 6. Odciągnąć 100 µl supernatantu i przenieść do oznaczonej próbki polipropylenowej.
- 7. Do próbki tej dodać 600 µl roztworu neutralizującego.
- 8. Każda próbka musi być wymieszana przez wirowanie.

C. Procedura

- 1. Wybrać żadaną liczbę studzienek do oznaczenia. Nieużyte studzienki powinny być ponownie zamknięte w szczelnym woreczku ze środkiem osuszającym i przechowywane w temperaturze 2-8°C.
- 2. Umieścić studzienki w oprawie.
- 3. Odmierzyć pipetą 50 µl każdego z kalibratorów, ekstrahowanej kontroli i ekstrahowanej próbki do odpowiednich studzienek.
- 4. Odmierzyć pipetą do wszystkich studzienek po 100 µl roztworu koniugatu IGF1-HRP.
- 5. Inkubować przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej na wytrząsarce z prędkością 500 rpm.
- 6. Zaaapirować płyn z każdej studzienki.
- 7. Trzykrotnie przepłukać płytkę:
 - odmierzyć do każdej studzienki po 0,4 ml roztworu płuczącego;
 - zaaapirować zawartość każdej studzienki.
- 8. W czasie 15 minut od momentu zakończenia przepłukiwania, odmierzyć do każdej studzienki po 200 µl roztworu chromogenego.
- 9. Inkubować mikropłytkę przez 15 minut w temperaturze pokojowej; na wytrząsarce z prędkością 500 rpm; unikać bezpośredniego światła słonecznego.
- 10. Odmierzyć pipetą do wszystkich studzienek po 100 µl roztworu hamującego reakcję.
- 11. W czasie 1 godziny odczytać absorbancje dla 450 nm (filtr referencyjny 630 nm lub 650 nm) i wyliczyć wyniki w sposób opisany w sekcji XI.

XI. OBLICZANIE WYNIKÓW

- 1. Odczytać płytkę dla 450 nm z użyciem filtra referencyjnego ustawionego na 650 nm (lub 630 nm).
- 2. Obliczyć średnią oznaczeń podwójnych.
- 3. Obliczyć wartości dla każdego kalibratora, kontroli i próbki:

$$B/B0(\%) = \frac{OD \text{ (Kalibrator, Kontrol lub próbki)}}{OD \text{ (Kalibrator zerowy)}} \times 100$$

- 4. Na papierze milimetrowym liniowo-liniowym lub półlogarytmicznym wykreślić wartości (B/B0(%)) dla każdego punktu kalibratora jako funkcję stężenia IGF-I każdego punktu kalibratora. Odrzucić oczywiste wartości graniczne.
- 5. Do opracowania krzywej kalibracyjnej mogą być wykorzystane również metody wspomagania komputerowego. Jeżeli ma być zastosowane automatyczne przetwarzanie wyników, zaleca się dopasowanie krzywej logistycznej 4 parametrowej.

Nakładając wartości (B/B0 (%)) próbki należy określić stężenia IGF-I w próbkach z krzywej kalibracyjnej.

XII. PRZYKŁAD DANYCH TYPOWYCH

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

Kalibratory	ng/ml	Jednostki OD
S0	0	2,400
S1	10	1,987
S2	25	1,567
S3	62	1,333
S4	226	0,838
S5	760	0,501

XIII. DZIAŁANIE I OGRANICZENIA

A. Granica wykrywania

Szesnaście kalibratorów zerowych oznaczano wraz z zestawem innych kalibratorów. Granica wykrywania, zdefiniowana jako odmierzone stężenie dwóch odchylen standardowych poniżej przeciętnej wartości OD przy wiązaniu zerowym, kształtowała się na poziomie 1,1 ng/ml.

B. Swoistość

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

Składnik	Reaktywność krzyżowa (%)
IGF-I	100,0
IGF-II	0,7
Insuline	Brak
GH	Brak

Uwaga: tabela przedstawia reaktywność krzyżową dla anti-IGF-I.

C. Precyzja

Wewnątrztestowa				Międzytestowa			
Surowica	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)	Surowica	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)
A	10	51,1 +/- 3,1	6,1	C	10	98,0 +/- 13,0	12,9
B	10	479,2 +/- 42,5	8,9	D	10	274,0 +/- 34,0	12,5

SD: Odchylenie standardowe; CV: Współczynnik zmienności

D. Dokładność

BADANIE ODZYSKU

Próbka (ng)	Dodana IGF-1 (ng)	Wartość oczekiwana (ng/ml)	Wartość zmierzona (ng/ml)	Odzysk (%)
16	15	31	32	103,2
16	30	46	48	104,3
16	100	116	120	103,4
16	250	266	256	96,2
16	400	416	431	103,6
16	600	616	681	110,6

Próbka (ng)	Dodana IGF-1 (ng)	Wartość oczekiwana (ng/ml)	Wartość zmierzona (ng/ml)	Odzysk (%)
17	15	32	32	100
17	30	47	45	95,7
17	100	117	128	109,4
17	250	267	288	107,9
17	400	417	508	121,8
17	600	617	785	127,2

BADANIE ROZCIEŃCZENIA

Próbka A			Próbka B		
Rozc .	Wartość oczekiwana ng/ml	Wartość zmierzona ng/ml	Rozc .	Wartość oczekiwana ng/ml	Wartość zmierzona ng/ml
1/1	540,0	540,0	1/1	875,0	875,0
1/2	270,0	266,0	1/2	438,0	440,0
1/4	135,0	115,0	1/4	219,0	183,0
1/8	68,0	62,0	1/8	109,0	79,0
1/16	34,0	37,0	1/16	55,0	46,1
1/32	17,0	25,3	1/32	27,0	31,1

Po ekstrakcji, próbki zostały rozcieńczone za pomocą kalibratora zerowego.

Współczynnik przeliczeniowy:

Z ng/ml na nmol/l: x 0,13

Z nmol/l na ng/ml: x 7,65

E. **Odstęp czasowy pomiędzy dozowaniem ostatniego kalibratora i próbki**

Jak tutaj wykazano, wyniki testu pozostają dokładne nawet wówczas, gdy próbka zostanie dozowana w 30 minut po dodaniu kalibratorów do opłaszczonych studzienek.

Opóźnienie	
0 minut	30 minut
994,0 ng/ml	1057,0 ng/ml
458,0 ng/ml	476,0 ng/ml

XIV. WEWNĘTRZNA KONTROLA JAKOŚCI

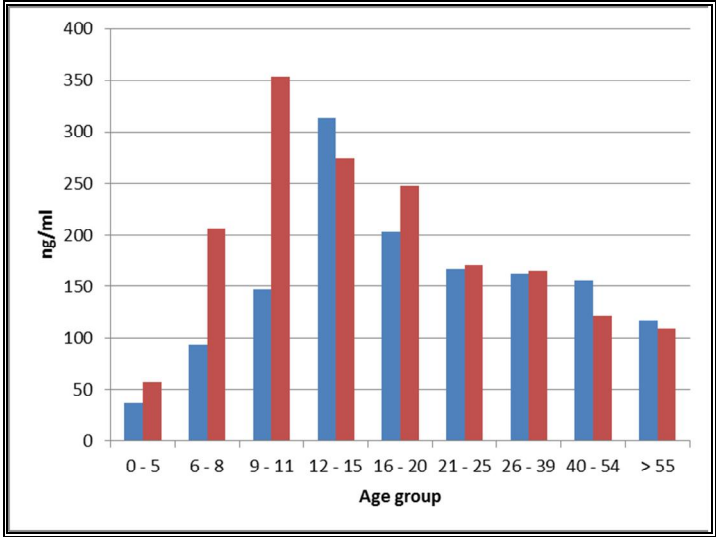
- Jeżeli wyniki uzyskane dla kontroli 1 i 2 nie znajdują się w zakresie określonym na etykiecie fiołki, wyniki nie mogą zostać wykorzystane dopóki nie uda się znaleźć właściwego wyjaśnienia tego odchylenia.
- Jeżeli to konieczne, każde laboratorium może wykonać własne próbki zbiorcze w celach kontrolnych, które powinny być zamrożone w małych objętościach. Kontrole zawierające azydek interferują z reakcją enzymatyczną i nie mogą być stosowane.
- Dopuszczalne kryteria dotyczące różnicy pomiędzy wynikami oznaczeń podwójnych próbek powinny być zgodne z zasadami prawidłowej pracy w laboratorium
- Zaleca się, aby w celu określenia zmienności oznaczenia rutynowo oznaczać kontrole jako nieznaną próbki. Charakterystyki kliniczne testu powinny być monitorowane z użyciem arkuszy kontroli jakości kontroli.
- Dobłą praktyką jest wzrokowe sprawdzanie dopasowania krzywej wybranej przez komputer.

XV. ZAKRESY REFERENCYJNE

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

		Mężczyźni (ng/ml)			Kobiety (ng/ml)		
Grupa wiekowa (lata)	n	Mediana	Zakres	n	Mediana	Zakres	
0 – 5	30	37	14 – 154	50	57	21 – 262	
6 – 8	20	93	45 – 213	18	207	89 – 485	
9 – 11	20	147	53 – 453	19	354	99 – 708	
12 – 15	24	313	103 – 753	31	274	100 – 744	
16 – 20	30	203	99 – 655	29	248	73 – 522	
21 – 25	9	167	115 – 304	9	171	83 – 511	
26 – 39	24	162	87 – 415	20	165	101 – 267	
40 – 54	35	156	69 – 343	17	121	60 – 271	
> 55	25	117	33 – 232	14	109	69 – 189	

Powyższe zakresy odpowiadają percentylom od 2,5% do 97,5%.



XVI. ŚRODKI OSTROŻNOŚCI I OSTRZEŻENIA

Bezpieczeństwo

Tylko do diagnostyki *in vitro*.

Składniki zawierające ludzką krew, dostarczone w zestawie, zostały przebadane metodami zaaprobowanymi przez instytucje europejskie i/lub FDA. Stwierdzono, że nie zawierają one HbsAg, przeciwciał anti-HCV, anti-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 bydłce 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. Roztwór hamujący reakcję zawiera HCl. W razie kontaktu, należy dokładnie przemyć miejsce wodą.

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 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.

PODSUMOWANIE PROTOKOŁU

	KALIBRATORY μl	PRÓBKİ KONTROLE μl
<u>PRZYGOTOWANIE</u> Próbki , kontrole Roztwór przygotowawczy	- -	100 400
Inkubacja Odwirowanie	30 minut RT 2 minuty przy 10000 rpm (próbówki do mikrowirowania) lub 15 minut przy > lub = 3000 rpm (próbówki polipropylenowe)	
Supernatant Roztwór neutralizujący	- -	100 600
Wytrząsanie	Mieszadło wirowe	
<u>INKUBACJA</u> Kalibratory (0 - 5) Próbki przygotowawcze, kontrole Rozcieńczony koniugat	50 - 100	- 50 100
Inkubować przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej na wytrząsarce z prędkością 500 rpm. Zaaspirować zawartość każdej studzienki. Przepłukać trzykrotnie z użyciem 400 μl roztworu płuczącego i zaaspirować.		
Roztwór chromogeny	200	200
Inkubować przez 15 minut w temperaturze pokojowej na wytrząsarce z prędkością 500 rpm.		
Roztwór hamujący reakcję	100	100
Odczytać na czytniku mikroplitek i zarejestrować absorbancję każdej studzienki przy 450 nm (względem 630 lub 650 nm).		

Nr katalogowy DIASource: KAP1581	Numer P.I. : 1700772 / pl	Nr aktualizacji: 120906/1
--	------------------------------	------------------------------

Data wydania: 2012-09-06

		Used symbols
		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 125I		Tracer
Ab 125I		Tracer
Ag 125I CONC		Tracer concentrated
Ab 125I 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
MT		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
TRAY		Incubation trays
PMSF		PMSF solution
		Protect from light
STRIP		Dot Strip
SUB		Substrate
EXTR SOLN CONC		Extraction Buffer Concentrate
CART		Cartridge
SAV HRP		Streptavidin HRP
PIPETTE		Pipette
WASH SOLN		Wash buffer

	<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
IV 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
ULI	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
DIST	Distribuidor
TRAY	Bandejas de incubación
PMSF	Solución de PMSF
	Proteger de la luz
STRIP	Tris Dot
SUB	Sustrato
EXTR SOLN CONC	Concentrado de tampón de extracción
CART	Cartucho
SAV HRP	Estreptavidina HRP
PIPETTE	Pipeta
WASH SOLN	Tampón de lavado

	Używane symbole
	Przed zastosowaniem zapoznać się z instrukcją
	Temperatura przechowywania
	Zużyć przed
LOT	Kod serii
REF	Numer katalogowy
CONTROL	Kontrola
IVD	Urządzenie medyczne do diagnostyki in vitro
	Producent
	Zawartość wystarczająca do <n> testów
WASH 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 próbki
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
	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
DIST	Dystrybutor
TRAY	Tacki do inkubacji
PMSF	Roztwór fluorku fenylometylosulfonilu (PMSF - z ang. phenylmethylsulfonyl fluoride)
	Chronić przed światłem
STRIP	Pasek testowy z antygenami - „Dot Strip”
SUB	Substrat
EXTR SOLN CONC	Stężony bufor do ekstrakcji
CART	Kaseta
SAV HRP	Streptawidyna sprzężona z peroksydazą chrzanową (HRP - z ang. horseradish peroxidase)
PIPETTE	Pipeta
WASH SOLN	Bufor do płukania