

**IGF-I (Insulin-Like Growth Factor I)**  
**<sup>125</sup>I RIA Kit**

For the quantitative determination of IGF-I  
(Somatomedin C) in human serum

**Instruction Manual**

Manuel d'Instructions  
Testanleitung  
Manual de instruções  
Bruksanvisning

**Catalog No./REF./KAT.-NR./ N° de Catálogo/  
Katalognummer: 53065**

**DiaSorin**

**Stillwater, Minnesota 55082-0285, U.S.A.**

**TABLE OF CONTENTS**

English .....	Page 1
Français .....	13
Deutsch.....	26
Português.....	39
Svenska .....	52

## INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR I RIA KIT

### 1. INTENDED USE

FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE.

This kit contains instructions and materials for the quantitative determination of IGF-I in human serum by radioimmunoassay (RIA). The procedure is to be used as an adjunct procedure to hGH determination in the diagnosis of hypopituitarism and acromegaly.

### 2. SUMMARY AND EXPLANATION

Somatomedin C is a 70 amino acid peptide which is part of a family of growth factors which includes insulin-like growth factors I and II, somatomedins A and B, and MSA. Somatomedin C was recently found to be identical in structure to IGF-I<sup>4</sup> whose sequence was published in 1978 by Rinderknecht and Humbel.<sup>6</sup> There are similarities between proinsulin and somatomedin in that both contain A and B peptides with a C-peptide linked and both have internal disulfides. IGF-I is highly basic in nature due to its amino acid composition and circulates bound to high molecular weight proteins of approximately 140,000 daltons.

IGF-I mediates the growth promoting actions of growth hormone. It is released from a variety of tissues in the body in response to growth hormone and is under the control of a feedback mechanism forming a tightly controlled loop between the hypothalamus and the pituitary gland.<sup>8</sup>

Other than growth hormone, two of the most important factors influencing IGF-I concentration in the serum are age and sex. IGF-I levels are lowest at birth and rise throughout infancy and childhood. The highest levels are attained during adolescence and decline slowly during adulthood. Females exhibit slightly higher IGF-I levels than males during adolescence and adult years.<sup>1,10</sup>

IGF-I measurement has been advocated as a screening and management tool in growth hormone deficient children.<sup>10</sup> Its use in diagnosis along with growth hormone measurements<sup>9</sup> or as a tool to assess a child's response to administered growth hormone<sup>4</sup> has led it to a prominent place in the endocrine laboratory, particularly when dealing with growth disorders.<sup>2,7</sup>

A second major use of IGF-I measurement is in the diagnosis and treatment of acromegaly.<sup>5</sup> IGF-I levels may be helpful to assess the results of bromocryptine treatment of acromegaly.<sup>9</sup>

### 3. PRINCIPLE OF THE ASSAY

The DiaSorin IGF-I RIA is a double antibody disequilibrium assay which includes an ODS-silica extraction procedure for serum samples. After the extraction procedure, the RIA is performed employing addition of sample and rabbit anti-IGF-I, followed by a 2 hour incubation at 2-8°C. Iodine-125 IGF-I is then added followed by a second incubation for 20 hours at 2-8°C. Pre-precipitated carrier, second antibody and polyethylene glycol are added in a single step. The assay can be centrifuged and decanted after the 2 hour second antibody incubation at 2-8°C. IGF-I from many other mammalian sources can also be measured with this procedure.

### 4. REAGENTS PROVIDED IN THE KIT

IgF-1 Calibrator 0	1 vial/20 mL
IgF-1 Calibrators 1-5	5 vials/0.5 mL
IgF-1 Antiserum	1 vial/14 mL
<sup>125</sup> I IgF-1 Tracer	1 vial/14 mL
IgF-1 Controls	2 vials/ 1.0 mL
IgF-1 Precipitating Complex	1 vial/ 35 mL
ODS-Silica	1 pkg./25 columns
Number of tests	65

STORAGE: Upon receipt, the kit should be stored at -15°C or lower. After reconstitution store each reagent at -15°C or lower until the expiration date on the label. Reagents should not be used past the expiration date.

When reconstituting the contents of the vials, mix gently to avoid foaming. Reagents from different batches must not be mixed.

**4.1 IGF-I calibrator 0:** lyophilized reagent

BSA-borate buffer contains 0.25% sodium azide as a preservative. Reconstitute the vial with 20 mL of purified water and allow it to stand for 15 -20 minutes until the contents are completely dissolved; mix thoroughly before using.

**4.2 IGF-I Calibrators (1-5):** lyophilized reagent

Five human intact IGF-I calibrators at nominal concentrations of 3.0-75 nmol/L (0.12-3.0 units/mL) are prediluted in BSA-borate buffer containing 0.1% sodium azide as a preservative. Exact values are assigned with each lot. Reconstitute each vial with 0.5 mL of purified water and allow the vials to stand for 15 - 20 minutes until the contents are completely dissolved; mix thoroughly before using. The DiaSorin IGF-I calibrators have been calibrated against the World Health Organization (W.H.O.) standard NBSB 87/518. Any comparisons with other products or procedures should be done with this reference preparation. To approximate the units used by many commercial laboratories, a value of 25 nmol/L equal to 1 unit/mL has been assigned. Nanomoles/liter of IGF-I is converted to ng/mL by the multiplier 7.7. The kit calibrators demonstrate commutability with patient samples when used with reagents and operating procedure of this in vitro diagnostic test as recommended.

**4.3 IGF-I Antiserum:** lyophilized reagent

Rabbit anti-IGF-I serum is diluted in BSA-borate buffer with heparin containing 0.002% thimerosal. Reconstitute the vial with 14 mL of purified water and allow it to stand for 15 - 20 minutes until the contents are completely dissolved; mix thoroughly before using.

**4.4 <sup>125</sup>I IGF-I:** lyophilized reagent

Human synthetic IGF-I (53-70) is labeled with iodine-125 and is diluted in BSA-borate-EDTA buffer which contains 0.008% thimerosal as a preservative. Reconstitute the vial with 14 mL of purified water and allow it to stand for 15 - 20 minutes until the contents are completely dissolved; mix thoroughly before using.

**4.5 IGF-I Controls (Level 1 and 2):** lyophilized reagent

Human serum is spiked, if necessary, with the appropriate amount of intact human IGF-I to obtain a concentration within a specified range. 0.02% sodium azide is added as a preservative. Reconstitute the vials with 1.0 mL of purified water and allow it to stand for 15 - 20 minutes until the contents are completely dissolved; mix thoroughly and treat the quality control serum as an unknown sample. Ranges are printed on the control vials.

**4.6 IGF-I Precipitating Complex:** lyophilized reagent

Normal rabbit serum pre-precipitated with goat anti-rabbit serum and polyethylene glycol (PEG), is diluted in BSA-borate buffer with 0.03% thimerosal added. Reconstitute the vial with 35 mL of purified water; mix THOROUGHLY until the suspension appears homogeneous and then allow the vial to stand for a minimum of 30 minutes at room temperature with occasional mixing.

**4.7 ODS-Silica:** ready to use reagent

Plastic columns contain octadecasilyl-silica (Sep-Paks). Columns must be "primed" before applying sample (see Extraction Procedure section). The ODS-silica columns may be stored at room temperature. Columns are stable for 3 years after package is opened and indefinitely if unopened.

**5. WARNINGS AND PRECAUTIONS**

**FOR *IN VITRO* DIAGNOSTIC USE.**

Not for internal or external use in humans or animals. The procedure is to be used as an adjunct procedure to hGH determination in the diagnosis of hypopituitarism and acromegaly.

**REAGENTS CONTAINING HUMAN SOURCE MATERIAL**

**Treat as potentially infectious.**

Each serum/plasma donor unit used in the preparation of this product has been tested by a U.S. FDA approved method and found non-reactive for the presence of HBsAg, antibody to HCV, and antibody to HIV 1/2. While these methods are highly accurate, they do not guarantee that all infected units will be detected. This product may also contain other human source material for which there is no approved test. Because no known test method can offer complete assurance that hepatitis B virus (HBV), hepatitis C virus (HCV), Human Immunodeficiency Virus (HIV) or other infectious agents are absent, all products containing

human source material should be handled in accordance with good laboratory practices using appropriate precautions as described in the Centers for Disease Control and Prevention/National Institutes of Health Manual, "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories," 4<sup>th</sup> ed., May 1999 or current edition.

#### **REAGENTS CONTAINING SODIUM AZIDE**

**CAUTION:** Some reagents in this kit contain sodium azide. Sodium azide may react with lead or copper plumbing to form highly explosive metal azides. On disposal, flush with a large volume of water to prevent azide build-up. For further information, refer to "Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts," in the Manual Guide-Safety Management No. CDC-22 issued by the Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, U.S. 1976.

#### **European Communities Hazardous Substance Risk Phrases (Council Directive 1999/45/EC)**

R20/21/22 - Harmful by inhalation, in contact with skin and if swallowed.

R32 - Contact with acids liberates very toxic gas.

S28 - After contact with skin, wash immediately with plenty of water.

#### **REAGENTS CONTAINING THIMEROSAL**

Some reagents in this kit contain thimerosal which contains a mercury compound. Disposal of elemental mercury, inorganic mercury, mercury oxides and mercury compounds should be done in strict compliance with all local, state, and federal regulations.

**WARNING:** This product contains a chemical known to the State of California to cause birth defects or other reproductive harm.

#### **REAGENTS CONTAINING IODINE-125**

This kit contains radioactive material which does not exceed 2  $\mu$ Ci (74 kBq) of iodine-125. Appropriate precautions and good laboratory practices should be used in the storage, handling and disposal of this material.

For practitioners or institutions receiving radioisotopes under a general license:

This radioactive material may be received, acquired, possessed and used only by physicians, veterinarians in the practice of veterinary medicine, clinical laboratories or hospitals, and only for in vitro clinical or laboratory tests not involving internal or external administration of the material, or the radiation therefrom, to human beings or animals. Its receipt, acquisition, possession, use and transfer are subject to the regulations and the general license of the U.S. Nuclear Regulatory Commission or of the state with which the Commission has entered into an agreement for the exercise of regulatory authority.

1. Storage of radioactive material should be limited to a specifically designated area.
2. Access to radioactive materials must be limited to authorized personnel only.
3. Do not pipette radioactive material by mouth.
4. Do not eat or drink within designated radioactive work areas.
5. Areas where spills may occur should be wiped up, then washed with an alkali detergent or radiological decontamination solution. Any glassware used must be rinsed completely with water before washing with other laboratory glassware.

For practitioners or institutions receiving radioisotopes under a specific license:

The receipt, use, transfer and disposal of radioactive materials are subject to the regulations and conditions of your specific license.

**WARNING:** This product contains a chemical known to the State of California to cause cancer.

**ATTENTION:** Radioactivity printed in the package insert may be slightly different from the radioactivity printed on the box label and on the tracer vial label. The box label and the tracer vial label indicate the actual amount of radioactivity at the calibration date where the package insert indicates the theoretical radioactivity of the kit.

#### **6. INDICATIONS OF POSSIBLE DETERIORATION OF KIT REAGENTS**

- 6.1 The presence of abnormal particulate matter in any of the reagents.
- 6.2 A shift in the slope or position of the calibrator curve from what is normally obtained.
- 6.3 A decrease in maximum binding.
- 6.4 A high nonspecific binding.

## 7. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Two hundred and fifty microliters of serum are required for the assay.

Collect blood by venipuncture in 5 or 10 mL evacuated glass tube. Allow the blood to clot at room temperature. Centrifuge for 15 minutes using  $760 \times g^*$  to obtain hemolysis free serum. No additives or preservatives are required to maintain the integrity of the sample. All plastics, glassware or other material coming into contact with the specimen should be entirely free of any contamination.

EDTA or heparinized plasma may cause slightly lower results.

The serum should be promptly separated from the cells and stored at  $-15^{\circ}\text{C}$  or lower. For long term storage, samples should be frozen at  $-15^{\circ}\text{C}$  or lower. Specimens can be frozen and thawed several times.

## 8. EQUIPMENT AND MATERIALS REQUIRED, BUT NOT SUPPLIED

- 8.1 Disposable borosilicate glass tubes, 12 x 75 mm.
- 8.2 Temperature controlled centrifuge to accommodate 12 x 75 mm tubes.
- 8.3 Gamma scintillation counter capable of counting iodine-125.
- 8.4 Vortex.
- 8.5 Pipetting devices:
  - a. Micropipettors calibrated to deliver 50  $\mu\text{L}$ , 250  $\mu\text{L}$  and 500  $\mu\text{L}$ .
  - b. Repeating dispensers, calibrated to deliver 200  $\mu\text{L}$  and 500  $\mu\text{L}$ .

### Materials and Reagents Required for ODS-silica

#### Column Extraction

- 8.6 12 mL disposable syringes.
- 8.7 Isopropyl alcohol.
- 8.8 Methanol, HPLC grade or better.
- 8.9 4% acetic acid.
- 8.10 0.5 N hydrochloric acid.
- 8.11 Compressed air supply.
- 8.12  $37^{\circ}\text{C}$  water bath.
- 8.13 16 x 100 mm glass tubes.

## 9. EXTRACTION OF SERUM WITH ODS-SILICA COLUMNS

- 9.1 Pipette 250  $\mu\text{L}$  of controls and unknown samples into a 12 x 75 mm glass test tube and add 1 mL of 0.5 N HCl. Vortex gently until well mixed.
- 9.2 Attach each ODS-silica column to a syringe hub.
- 9.3 Add 5 mL of reagent grade isopropyl alcohol to each syringe.
- 9.4 Press through the syringe using the syringe plunger.
- 9.5 Remove the ODS-silica column. (Remove the ODS-silica column from the end of the syringe before removing the plunger to avoid contaminating the syringe contents with the fluid in the ODS-silica column.)
- 9.6 Remove the syringe plunger from the syringes.
- 9.7 Replace the ODS-silica column on the syringes.
- 9.8 Add 5 mL of HPLC grade methanol.
- 9.9 Repeat steps 4 through 7.
- 9.10 Add 5 mL of 4% acetic acid.
- 9.11 Repeat steps 4 through 7.
- 9.12 Repeat steps 10 and 11.
- 9.13 Apply the sample from step 1. Push slowly through the cartridge at a flow rate of 1 mL per 2-3 minutes.
- 9.14 Repeat steps 5 through 7.
- 9.15 Wash the ODS-silica column 2 times with 10 mL of 4% acetic acid repeating steps 5 through 7 in between washes.

$$*g = (1118 \times 10^{-6}) (\text{radius in cm}) (\text{rpm})^2$$

- 9.16 Collect the eluate in 16 x 100 mm glass tubes by eluting the peptide with 4 mL of HPLC grade methanol. Push slowly so that the methanol remains in contact with the ODS-silica column for a minimum of 3 minutes.
- 9.17 Evaporate the methanol to dryness in a 37°C water bath using compressed air or nitrogen.
- 9.18 Reconstitute the dried samples with 500 µL of calibrator 0 and incubate at 37°C for 10 minutes to ensure complete reconstitution (vortex intermittently during incubation). A sample that is expected to be elevated should be reconstituted with 1.0 mL of calibrator 0 at this time. The final result should be corrected by the appropriate dilution factor (see Results section for calculation).
- 9.19 Assay 50 µL of the serum extracts in duplicate in the radioimmunoassay.

## 10. ASSAY PROCEDURE

- 10.1 Reconstitute the lyophilized reagents and allow any frozen reagents to thaw completely. Do not allow reagents to reach temperatures above 20-25°C. Mix all reagents gently before using.
- 10.2 Set up labeled 12 x 75 mm tubes in duplicate according to the Scheme of the Assay, on the last page. All volumes are in microliters.
- 10.3 Add reagents to the tubes as follows:
- Total count tubes**  
Set aside until step 5
  - Nonspecific binding (NSB)**  
50 µL of calibrator 0
  - IGF-I calibrator 0**  
50 µL of calibrator 0  
200 µL of IGF-I Antiserum
  - IGF-I calibrators (1-5)**  
50 µL of IGF-I calibrator  
200 µL of IGF-I Antiserum
  - Controls and unknown samples**  
50 µL of serum extracts  
200 µL of IGF-I Antiserum
- 10.4 Incubate for 2 hours ( $\pm$ 15 minutes) at 2-8°C.
- 10.5 Add 200 µL of 125I IGF-I to all tubes.
- 10.6 Vortex the tubes gently without foaming and incubate for 20 hours ( $\pm$ 1 hour) at 2-8°C.
- 10.7 Vigorously mix the precipitating complex; add 500 µL to all tubes except the total count tubes.
- 10.8 Vortex the tubes gently without foaming and incubate for 2 hours ( $\pm$ 15 minutes) at 2-8°C.
- 10.9 Centrifuge the tubes for 20 minutes using a minimum of 760 x g\* at 20-25°C.
- 10.10 Immediately decant the supernatant from all the tubes except the total count tubes by inverting them for a minimum of 2 minutes. Blot the tubes with absorbent paper to remove any drops of supernatant that may be remaining on the rims before turning the tubes upright.
- 10.11 Using a gamma scintillation counter, count the precipitate of each tube and the total count tubes for a sufficient time to achieve statistical accuracy (see Limitations of the Procedure section).

## 11. PROCEDURAL COMMENTS

- 11.1 Add each aliquot of reagent to the lower third of the assay tube to ensure complete mixture of reagents.
- 11.2 Some manufacturer's disposable tubes yield elevated nonspecific bindings.
- 11.3 If you choose to aspirate the supernatant from the precipitate, be careful not to disturb the precipitate.
- 11.4 To completely monitor the consistent performance of an RIA there are additional factors which may be checked. DiaSorin suggests a check of the following

parameters to assure consistent kit performance.

**a. Total Counts**

**b. Maximum Binding**

Average counts per minute (CPM) of calibrator 0 Tube / Average CPM of Total Count Tubes.

**c. Nonspecific Binding**

Average CPM of NSB Tube / Average CPM of Total Count Tubes.

**d. Slope of Calibrator Curve**

For example, monitor the 80, 50 and 20% suppression points of the calibrator line.

**12. QUALITY CONTROL**

Each laboratory should include at least two control samples in every assay to ensure the validity of each assay's results. A mean and standard deviation should then be determined for each control using a minimum of ten (10) assays. An acceptable range of values may then be obtained for these controls using  $\pm 2$  standard deviations of the values previously determined. The DiaSorin Quality Control Laboratory has determined a range for the controls included in this kit.

**13. CALCULATION OF RESULTS**

There are many methods in existence for calculating results of RIAs. Each is based on obtaining a calibration curve by plotting the extent of binding against stated concentrations of the calibration calibrators. This graph may be either linear or logarithmic scale.

Each of these methods gives essentially the same values for controls and samples, although certain assays may "fit" better into one particular method versus another. The calculation method for the DiaSorin Quality Control Laboratory is % B/B<sub>0</sub> versus log concentration.

**13.1** Calculate the average CPM for each calibrator, control and unknown sample.

**13.2** Subtract the average CPM of the NSB tubes from all counts.

**13.3** Divide the corrected CPM of each calibrator, control or unknown sample by the corrected CPM of the calibrator 0.

$$B/B_0 (\%) = \frac{\text{CPM of Calibrator or Unknown Sample} - \text{CPM of NSB}}{\text{CPM of calibrator 0} - \text{CPM of NSB}} \times 100$$

**13.4** Using 2 cycle semi-log or log-logit graph paper, plot percent B/B<sub>0</sub> for the IGF-I calibrators (vertical axis) versus the concentration (horizontal axis).

**13.5** Draw a best-fit line through the points.

**13.6** Interpolate the levels of IGF-I in the unknown samples from the plot.

**13.7** Correct for appropriate reconstitution volume. For example: If 250  $\mu$ L of serum was extracted and reconstituted with 500  $\mu$ L of calibrator 0, multiply the value interpolated from the curve by 2. If 250  $\mu$ L of serum was extracted and reconstituted with 1.0 mL of calibrator 0, multiply the value interpolated from the curve by 4.

**13.8** Calculate maximum binding by dividing CPM of calibrator 0 by the average total counts obtained in the total count tubes.

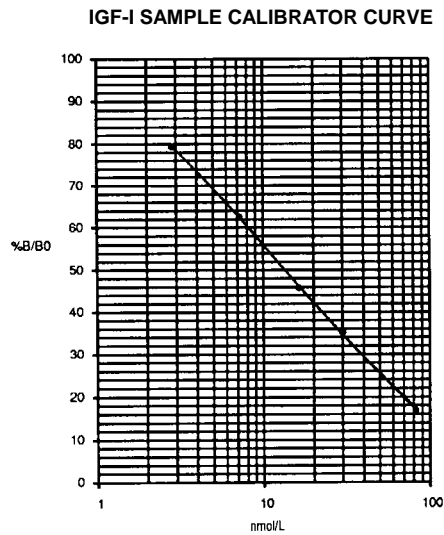
\*g = (1118 x 10<sup>-6</sup>) (radius in cm) (rpm)<sup>2</sup>



**TABLE II**  
DiaSorin IGF-I Sample Data

Tube	Duplicate CPM	Average CPM	Corrected CPM	% Bound (B/T)	% (B/B <sub>0</sub> )	Graph Conc. (nmol/L)	Final Conc. (nmol/L)
Total	10,830 10,991	10,991					
NSB	351 338	345		3.2			
Calibrator 0	4,060 4,055	4,058	3,713	37.2			
Calibrators (nmol/L)							
1 (2.9)	3,332 3,264	3,298	2,953		79.5		
2 (7.3)	2,852 2,683	2,673	2,328		62.7		
3 (16.4)	2,032 2,059	2,046	1,701		45.8		
4 (29.9)	1,685 1,634	1,660	1,315		35.4		
5 (82.5)	991 964	978	633		17.0		
Patient Unknowns							
1	2,564 2,590	2,577	2,232		60.1	8.3	16.6
2	1,701 1,723	1,712	1,367		36.8	27.6	55.2

Typical sample data and a calibrator curve are shown in TABLE II and FIGURE 1; this curve is for reference only and should not be used for the calculation of any value.



**FIGURE 1**

## REDUCTION DATA

The DiaSorin QC lab uses a smoothed spline curve fit.

### 14. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

- 14.1** Any unknown sample whose value reads greater than the highest kit calibrator must be appropriately diluted from the ODS-silica column extract with calibrator 0 and assayed again. Correct result using the appropriate dilution factor.
- 14.2** Counting times should be sufficient to prevent the introduction of error due to statistical error in counting (for example, accumulation of 2,000 CPM will yield 5% error; 10,000 CPM will yield 1% error).
- 14.3** IGF-I is elevated in pregnancy and the values were found to rise with gestation age. Other conditions are known to reduce levels of IGF-I, including poor nutritional status, fasting or hypothyroidism. Hepatitis can also influence the levels of IGF-I. In the diagnosis of hypopituitarism, provocative tests for human growth hormone should also be used when IGF-I results are low. A normal IGF-I result is very unlikely in the diagnosis of hypopituitarism except in the case of hyperprolactinemia or craniopharyngioma. No drugs at this time are found to interfere with the IGF-I assay.<sup>9</sup>

### 15. EXPECTED VALUES

#### Normal Range

Normal ranges should be verified by each laboratory. A large number of normal samples (geographic origin: Minnesota, Israel, Maryland and Australia), were studied in the development of our IGF-I assay and we have found that IGF-I values vary with age and in some age groups with sex; therefore, age and sex match controls should be used where appropriate. TABLE III and FIGURES 2 and 3 show the results of normal values assembled from several laboratories and collated by DiaSorin. Because there is pronounced skewing of the distribution during puberty, it is necessary to use a log transformation statistical model to develop 95% confidence limits in setting children's ranges. This is not necessary for treatment of adult values.

**TABLE III**  
Normal Range Study According to Age and Sex  
**Nanomoles/L**

(years) Age Group	Male			Female		
	Mean	(n)	Range*	Mean	(n)	Range*
1 mo.-1.99	7.55	(16)	4.32-13.18	7.35	(12)	3.42-15.79
2.00-5.99	12.27	(17)	5.70-26.40	11.10	(12)	4.43-27.85
6.00-8.00	15.56	(15)	6.39-36.13	11.89	(13)	6.01-23.51
8.01-10.00	15.34	(13)	5.92-39.75	17.29	(11)	9.16-32.64
10.01-13.99	21.90	(24)	8.65-55.46	32.15	(14)	9.30-111.10
14.00-18.00	42.84	(15)	17.33-105.83	42.68	(15)	12.94-140.80
Adult —	27.55	(36)	9.09-46.01	30.03	(41)	11.63-48.43

\*95% confidence limits log transformation model except for adult.

#### Units/mL

(years) Age Group	Male			Female		
	Mean	(n)	Range*	Mean	(n)	Range*
1 mo.-1.99	0.30	(16)	0.17-0.53	0.29	(12)	0.14-0.63
2.00-5.99	0.49	(17)	0.23-1.06	0.44	(12)	0.17-1.11
6.00-8.00	0.62	(15)	0.26-1.44	0.48	(13)	0.24-0.94
8.01-10.00	0.61	(13)	0.24-1.59	0.69	(11)	0.37-1.31
10.01-13.99	0.88	(24)	0.35-2.22	1.28	(14)	0.37-4.44
14.00-18.00	1.71	(15)	0.69-4.23	1.71	(15)	0.52-5.63
Adult —	1.10	(36)	0.36-1.84	1.20	(41)	0.47-1.94

\* 95% confidence limits log transformation model except for adult.

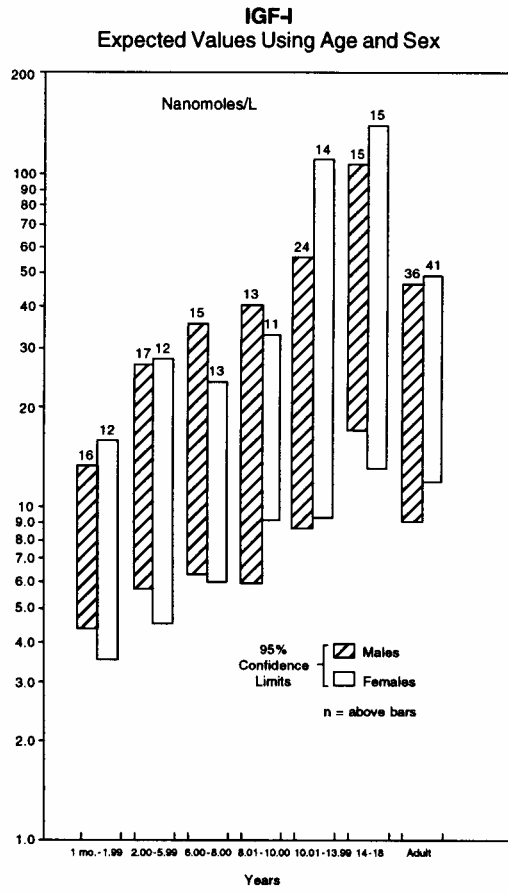


FIGURE 2

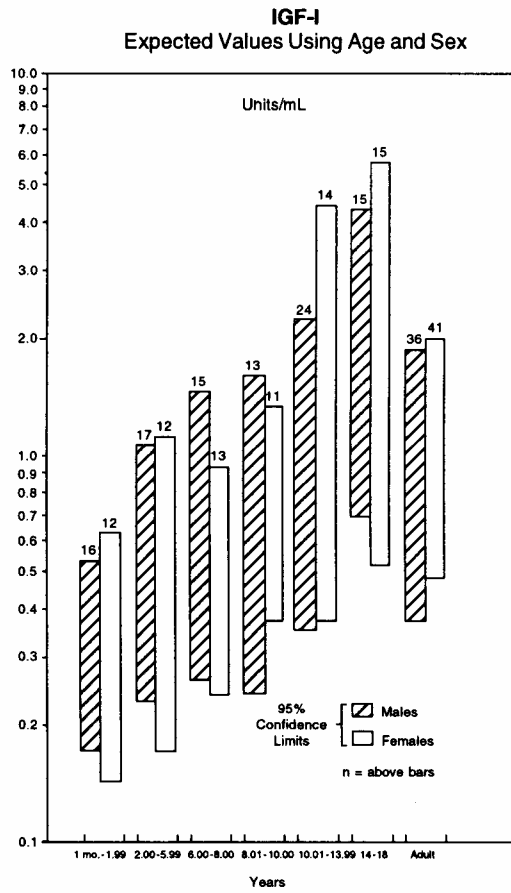


FIGURE 3

**16. SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS**

**16.1 Precision**

Within Assay Variation (values = nmol/L)

	Mean Value	S.D.	% C.V.	n
Low	7.1	0.6	8.4	15
Medium	13.4	1.3	10.1	15
High	24.8	2.2	9.1	15

Between Assay Variation (values = nmol/L)

	Mean Value	S.D.	% C.V.	n
Low	8.9	1.1	12.5	15
Medium	17.4	1.8	10.3	15
High	32.7	5.0	15.2	15

**16.2 TRUENESS: THE ASSAY TRUENESS HAS BEEN CHECKED BY THE LINEARITY TEST AND THE RECOVERY TEST.**

**Linearity (Parallelism)**

Serial Dilution Study of 3 Unknown Samples (values = nmol/L)

Sample Number	Undiluted	1/2	1/4
1	21.8	26.5	29.6
2	29.2	28.2	26.4
3	37.5	34.3	37.0

**Recovery**

Recovery Study (values = nmol/L). Percent recovery is calculated as measured value ÷ expected value x 100.

Background	Calibrator Added	Expected Value	Measured Value	Percent Recovery
Set No. 1				
15.7	1.2	16.9	16.9	100
15.7	3.4	19.1	18.3	96
15.7	7.7	23.4	24.6	106
Set No. 2				
20.7	1.2	21.9	17.7	81
20.7	3.4	24.1	21.3	88
20.7	7.7	28.4	28.5	101

**16.3 Analytical Sensitivity**

When defined as the apparent concentration at 3 standard deviations from the counts at maximum binding, the minimum detectable amount is <2.0 nmol/L.

**16.4 Analytical Specificity**

Comparison of the reactivity of IGF-I antibody at the 50% suppression B/B<sub>0</sub> was made with the following peptides:

Peptide	%Cross-Reactivity
IGF-II	<1.0
Human Growth Hormone	<1.0
Fibroblast Growth Factor	<1.0
Transforming Growth Factor	<1.0
Platelet-Derived Growth Factor	<1.0

**SEE LAST PAGE FOR REFERENCES**

### SCHEME OF THE ASSAY

1. Reconstitute the lyophilized reagents and allow any frozen specimens to thaw completely.
2. Extract the controls and unknown samples according to section 9 of the product insert.
3. Identify tubes in duplicate.
4. Dispense reagents according to the following scheme.

Tubes/Reagents	Total Counts	NSB	Cal 0-5	Controls and unknown samples
Calibrator 0	-	50 $\mu$ L	50 $\mu$ L	-
Calibrators (1-5)	-	-	50 $\mu$ L	-
Extracted Controls	-	-	-	50 $\mu$ L
Extracted Unknown Samples	-	-	-	50 $\mu$ L
Antiserum	-	-	200 $\mu$ L	200 $\mu$ L

5. Mix well; incubate for 2 hours (+/- 15 minutes) at 2-8°C.
6. Dispense 200  $\mu$ L of Tracer into all wells.
7. Mix well; incubate for 20 hours (+/- 1 hour) at 2-8°C.
8. Dispense 500  $\mu$ L Precipitating Complex into all wells, except the Total Count tubes.
9. Mix well, incubate for 2 hours (+/- 15 minutes) at 2-8°C.
10. Centrifuge using  $760 \times g^*$  for 20 minutes.
11. Decant the supernatants.
12. Count each tube in a gamma counter for 60 seconds or longer.

$$* g = (1118 \times 10^{-8}) (\text{radius in cm}) (\text{rpm})^2$$

## **TROUSSE DE DOSAGE RADIO-IMMUNOLOGIQUE DU FACTEUR DE CROISSANCE INSULINOMIMÉTIQUE DE TYPE 1**

### **1. INDICATION**

POUR USAGE DIAGNOSTIQUE IN VITRO.

Cette trousse contient les instructions et les réactifs permettant d'effectuer la détermination quantitative, par dosage radio-immunologique (RIA), de l'IGF-I dans le sérum humain. Il s'agit d'une procédure d'appoint du dosage de la somatotrophine dans le diagnostic de l'hypopituitarisme et de l'acromégalie.

### **2. RÉSUMÉ ET COMMENTAIRE**

La somatomédine C est un peptide composé de 70 acides aminés faisant partie d'une famille de facteurs de croissance qui comprend les facteurs de croissance insulino-mimétiques de types 1 et 2, les somatomédines A et B et la MSA. Il a récemment été découvert que la structure de la somatomédine C était identique à celle de l'IGF-I<sup>4</sup> dont la séquence a été publiée en 1978 par Rinderknecht et Humbel.<sup>6</sup> Il existe des similitudes entre la proinsuline et la somatomédine : toutes deux contiennent des peptides A et B liés à un peptide C et toutes deux sont dotées de disulfures internes. L'IGF-I a une nature très basique due à sa composition en acides aminés et circule sous forme liée à des protéines de haut poids moléculaire d'environ 140 000 daltons.

L'IGF-I relaie les actions activatrices de croissance de la somatotrophine. Il est libéré par une grande variété de tissus dans l'organisme en réponse à la somatotrophine et il est soumis à un mécanisme de rétrocontrôle qui forme une boucle sous haute surveillance entre l'hypothalamus et l'hypophyse.<sup>8</sup>

Hormis la somatotrophine, deux des plus importants facteurs influençant la teneur en IGF-I du sérum humain sont l'âge et le sexe. Les taux d'IGF-I sont minimisés à la naissance, puis augmentent au cours de la petite enfance et de l'enfance. Les taux les plus élevés sont atteints pendant l'adolescence avant de baisser lentement au cours de l'âge adulte. Les femmes présentent des taux d'IGF-I légèrement supérieurs à ceux des hommes pendant l'adolescence et à l'âge adulte.<sup>1,10</sup>

Le dosage de l'IGF-I a été préconisé comme outil de dépistage et de traitement des enfants souffrant d'une déficience en hormone de croissance.<sup>10</sup> Son utilisation diagnostique en association avec les dosages de somatotrophine<sup>9</sup> ou comme outil d'évaluation de la réaction d'un enfant à l'administration d'hormone de croissance<sup>4</sup> lui a conféré une place de choix dans les laboratoires d'endocrinologie, surtout en matière de troubles de la croissance.<sup>2,7</sup>

Le dosage de l'IGF-I joue également un rôle majeur dans le diagnostic et le traitement de l'acromégalie.<sup>5</sup> Les taux d'IGF-I peuvent permettre d'évaluer les résultats d'un traitement de cette affection à base de bromocriptine.<sup>9</sup>

### **3. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE DE DOSAGE**

Le dosage radio-immunologique de l'IGF-I conçu par DiaSorin est un dosage de déséquilibre à double anticorps qui comprend une procédure d'extraction à la silice octadécylsilylée des échantillons sériques. Une fois la procédure d'extraction terminée, le RIA est pratiqué par l'ajout d'échantillon et d'anticorps anti-IGF-I de lapin, suivi d'une incubation de 2 heures entre 2 et 8° C. L'IGF-I marqué à l'iode 125 est ensuite ajouté avant une deuxième incubation de 20 heures entre 2 et 8° C. Un vecteur préalablement précipité, un deuxième anticorps et le polyéthylène-glycol sont ajoutés en une seule étape. Le dosage peut être centrifugé et décanté après incubation du deuxième anticorps pendant 2 heures entre 2 et 8° C. L'IGF-I issu d'autres mammifères peut également être dosé à l'aide de cette procédure.

#### 4. RÉACTIFS FOURNIS DANS LA TROUSSE

Étalon 0 IGF-1	1 flacon/20 ml
Étalons 1 à 5 IGF-1	5 flacons/0,5 ml
Antisérums IGF-1	1 flacon/14 ml
Traceur IGF-1 <sup>125</sup> I	1 flacon/14 ml
Contrôles IGF-1	2 flacons/1,0 ml
Complexe précipitant IGF-1	1 flacon/35 ml
Silice octadécylsilylée	1 paquet/25 colonnes
Nombre de dosages	65

CONSERVATION : dès réception, la trousse doit être conservée à - 15° C au minimum. Après reconstitution, conservez chaque réactif à une température inférieure ou égale à -15° C jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette. Les réactifs ne doivent pas être utilisés au-delà de la date de péremption.

Pendant la reconstitution du contenu des flacons, agitez délicatement pour éviter la formation de mousse. Les réactifs de lots différents ne doivent pas être mélangés.

##### 4.1 Étalon 0 IGF-I : réactif lyophilisé

Tampon BSA-borate contenant 0,25 % d'azide de sodium comme conservateur. Reconstituez le flacon avec 20 ml d'eau purifiée et laissez reposer pendant 15 à 20 minutes jusqu'à dissolution complète du contenu ; mélangez bien avant utilisation.

##### 4.2 Étalons (1 à 5) IGF-I : réactif lyophilisé

Cinq étalons IGF-I humains intacts à des concentrations nominales comprises entre 3,0 et 75 nmol/l (0,12 à 3,0 unités/ml) sont pré-dilués dans un tampon BSA-borate contenant 0,1 % d'azide de sodium comme conservateur. Les valeurs exactes de ces concentrations sont fournies avec chaque lot. Reconstituez chaque flacon avec 0,5 ml d'eau purifiée et laissez-les reposer pendant 15 à 20 minutes jusqu'à dissolution complète du contenu ; mélangez bien avant utilisation. Les étalons IGF-I DiaSorin ont été calibrés selon la norme NBSB 87/518 de l'Organisation mondiale de la santé (OMS). Toute comparaison avec d'autres produits ou procédures de dosage doit être effectuée avec cette préparation de référence. Pour s'approcher des unités utilisées par de nombreux laboratoires commerciaux, une valeur de 25 nmol/l, équivalant à 1 unité/ml, a été attribuée. On passe des nanomoles/litre d'IGF-I aux ng/ml en multipliant par 7,7. Les étalons de la trousse démontrent leur commutabilité avec les échantillons des patients lorsqu'ils sont utilisés avec des réactifs et selon le mode d'emploi de ce dosage diagnostique in vitro, comme recommandé.

##### 4.3 Antisérums IGF-I : réactif lyophilisé

Le sérum anti-IGF-I de lapin est dilué dans un tampon BSA-borate avec de l'héparine contenant 0,002 % de thiomersal. Reconstituez le flacon avec 14 ml d'eau purifiée et laissez reposer entre 15 et 20 minutes jusqu'à dissolution complète du contenu ; mélangez bien avant utilisation.

##### 4.4 IGF-I <sup>125</sup>I : réactif lyophilisé

De l'IGF-I humain synthétique (53-70) est marqué à l'iode 125 et dilué dans un tampon BSA-borate-EDTA qui contient 0,008 % de thiomersal comme conservateur. Reconstituez le flacon avec 14 ml d'eau purifiée et laissez reposer pendant 15 à 20 minutes jusqu'à dissolution complète du contenu ; mélangez bien avant utilisation.

##### 4.5 Contrôles IGF-I (niveaux 1 et 2) : réactif lyophilisé

Le sérum humain est dopé, si besoin est, avec la quantité adéquate d'IGF-I humain intact afin d'obtenir une concentration comprise dans l'intervalle spécifié. 0,02 % d'azide de sodium est ajouté comme conservateur. Reconstituez les flacons avec 1,0 ml d'eau purifiée et laissez-les reposer entre

15 et 20 minutes jusqu'à dissolution complète du contenu ; mélangez soigneusement et traitez le sérum de contrôle qualité comme un échantillon inconnu. Les intervalles figurent sur les étiquettes des flacons de sérum de contrôle.

##### 4.6 Complexe précipitant IGF-I : réactif lyophilisé

Du sérum de lapin normal, préalablement précipité avec du sérum anti-lapin de chèvre et du polyéthylène-glycol (PEG), est dilué dans un tampon BSA-borate contenant 0,03 % de thiomersal. Reconstituez le flacon avec 35 ml d'eau purifiée ; mélangez

SOIGNEUSEMENT jusqu'à ce que la suspension apparaisse homogène puis laissez le flacon reposer pendant 30 minutes minimum à température ambiante en mélangeant de temps en temps.

##### 4.7 Silice octadécylsilylée : réactif prêt à l'emploi

Les colonnes en plastique contiennent de la silice octadécylsilylée (Sep-Pak). Elles doivent



être "amorçées" avant d'appliquer l'échantillon (voyez la section intitulée Procédure d'extraction). Les colonnes de silice octadécylsilylé peuvent être conservées à température ambiante. Elles sont stables pendant 3 ans après ouverture de l'emballage et indéfiniment s'il n'a pas été ouvert.

## 5. AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

### POUR USAGE DIAGNOSTIQUE IN VITRO.

Non prévu pour une utilisation interne ou externe sur l'homme ou l'animal. Il s'agit d'une procédure d'appoint du dosage de la somatotrophine dans le diagnostic de l'hypopituitarisme et de l'acromégalie.

### REACTIFS CONTENANT DES PRODUITS D'ORIGINE HUMAINE

#### Traitez-les comme potentiellement infectieux.

Chaque don de sérum/plasma intervenant dans la préparation de ce produit a été testé par une méthode agréée par la FDA et s'est avéré non réactif en présence de HBsAg, d'anticorps anti-VHC et d'anticorps anti-VIH1/2. Même si ces méthodes sont extrêmement précises, elles ne garantissent pas la détection de tous les dons infectés. Ce produit peut également contenir d'autres produits d'origine humaine pour lesquels il n'existe aucun test agréé. Comme aucune méthode de test connue ne peut offrir l'assurance complète de l'absence du virus de l'hépatite B (VHB), du virus de l'hépatite C (VHC), du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) ou d'autres agents infectieux, tous les produits d'origine humaine doivent être manipulés conformément aux bonnes pratiques de laboratoire en prenant les précautions appropriées décrites dans le document des Centers for Disease Control and Prevention/National Institutes of Health Manual, "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories," 4<sup>ème</sup> éd., mai 1999 ou dernière édition.

### REACTIFS CONTENANT DE L'AZIDE DE SODIUM

**ATTENTION** : certains réactifs de cette trousse contiennent de l'azide de sodium. Celui-ci peut réagir avec la plomberie en plomb ou en cuivre et former des azotures métalliques ultra-explosifs. Pour leur mise au rebut, rincez à grande eau pour empêcher l'accumulation d'azide. Pour plus d'informations, consultez "Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts," dans le manuel Guide-Safety Management n° CDC-22 publié par les Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, USA, 1976.

### Déclaration des risques relatifs aux substances dangereuses des communautés européennes (Directive du conseil 1999/45/CE)

R 20/21/22 - Nocif en cas d'inhalation, d'ingestion et de contact avec la peau.

R 32 - Un contact avec les acides dégage un gaz très toxique.

S28 - Après un contact avec la peau, lavez immédiatement à grande eau.

### REACTIFS CONTENANT DU THIOMERSAL

Certains réactifs de cette trousse contiennent du thiomersal, à base de composé de mercure. La mise au rebut de l'élément mercure, du mercure inorganique, des oxydes de mercure et des composés de mercure doit strictement respecter les réglementations locales, régionales et nationales.

**AVERTISSEMENT** : ce produit contient un produit chimique connu dans l'État de Californie comme étant à l'origine de malformations congénitales ou de troubles de la reproduction.

### REACTIFS CONTENANT DE L'IODE 125

Cette trousse contient un produit radioactif qui ne dépasse pas 2 $\mu$ Ci (74 kBq) d'iode 125. Les précautions appropriées et les bonnes pratiques de laboratoire doivent être utilisées pour la conservation, la manipulation et la mise au rebut de ce produit.

Pour les praticiens ou les établissements recevant des radio-isotopes dans le cadre d'une licence générale :

Ce produit radioactif peut être reçu, acquis, détenu et utilisé uniquement par des médecins, des vétérinaires dans le cadre de la pratique de médecine vétérinaire, des laboratoires cliniques ou des hôpitaux, et uniquement pour des analyses cliniques ou de laboratoire in vitro n'impliquant pas l'administration interne ou externe du produit, ni par rayonnement, à l'homme ou à l'animal. Sa réception, son acquisition, sa détention, son utilisation et son transfert sont sujets aux réglementations et à la licence générale de l'U.S. Nuclear Regulatory Commission ou de l'État avec lequel la Commission a conclu un accord pour l'exercice de l'autorité réglementaire.

1. Le produit radioactif doit être conservé dans son récipient d'origine à un endroit désigné.
2. L'accès aux produits radioactifs doit être limité au personnel autorisé uniquement.
3. Ne pipetez pas des solutions radioactives avec la bouche.

4. Ne mangez pas et ne buvez pas dans les zones de travail radioactives.
5. En cas de déversement de produits radioactifs, nettoyez la zone, puis lavez-la à l'aide d'un détergent alcalin ou d'une solution de décontamination radioactive. Tout article en verre utilisé doit être entièrement rincé à l'eau avant d'être lavé avec les autres articles en verre du laboratoire.

Pour les praticiens ou les établissements recevant des radio-isotopes dans le cadre d'une licence spécifique :

La réception, l'utilisation, le transfert et la mise au rebut de produits radioactifs sont sujets aux réglementations et conditions de votre licence spécifique.

**AVERTISSEMENT** : ce produit contient un produit chimique connu dans l'État de Californie comme étant cancérigène.

**ATTENTION** : la radioactivité imprimée sur la notice d'utilisation peut être légèrement différente de celle qui est imprimée sur l'étiquette de la boîte et sur l'étiquette du flacon du traceur. Les étiquettes de la boîte et du flacon du traceur indiquent la dose réelle de radioactivité à la date de calibrage, alors que la notice d'utilisation indique la radioactivité théorique de la trousse.

## 6. INDICATIONS D'UNE DÉTÉRIORATION POSSIBLE DES RÉACTIFS DE LA TROUSSE

- 6.1 Présence de particules anormales dans l'un quelconque des réactifs.
- 6.2 Écart de pente ou de position de la courbe d'étalonnage par rapport à la normale obtenue.
- 6.3 Diminution de la liaison maximale.
- 6.4 Liaison non spécifique élevée.

## 7. PRÉLÈVEMENT ET PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

Deux cent cinquante microlitres de sérum sont nécessaires pour le dosage.

Prélevez le sang par ponction veineuse dans un tube de verre sous vide de 5 ou 10 ml. Laissez le sang coaguler à température ambiante. Centrifugez pendant 15 minutes à 760 x g\* pour obtenir du sérum sans hémolyse. Aucun additif ou conservateur n'est requis pour maintenir l'intégrité de l'échantillon. Tous les plastiques, articles en verre ou autres produits entrant en contact avec l'échantillon ne doivent absolument pas être contaminés.

Du plasma hépariné ou contenant de l'EDTA peut générer des résultats légèrement inférieurs.

Le sérum doit être rapidement séparé des cellules et conservé à une température inférieure ou égale à - 15° C. Pour une conservation prolongée, les échantillons doivent être congelés au minimum à - 15° C. Ils peuvent être congelés et décongelés à plusieurs reprises.

## 8. MATÉRIEL ET PRODUITS REQUIS MAIS NON FOURNIS

- 8.1 Tubes en verre borosilicaté jetables, 12 x 75 mm.
- 8.2 Centrifugeuse à thermostat pour tubes de 12 x 75 mm.
- 8.3 Compteur de scintillation gamma pouvant mesurer l'iode 125.
- 8.4 Mélangeur Vortex.
- 8.5 Dispositifs de pipetage :
  - a. Micropipettes calibrées pour délivrer 50 µl, 250 µl et 500 µl.
  - b. Distributeurs à répétition calibrés pour distribuer 200 µl et 500 µl.

### Produits et réactifs requis pour l'extraction sur colonnes de silice octadécylsilylé

- 8.6 Seringues jetables 12 ml.
- 8.7 Alcool isopropylique.
- 8.8 Méthanol, de qualité CLHP ou supérieure.
- 8.9 Acide acétique à 4 %.
- 8.10 Acide chlorhydrique 0,5 N.
- 8.11 Source d'air comprimé.
- 8.12 Bain d'eau à 37° C.
- 8.13 Tubes en verre de 16 x 100 mm.

\* g = (1118 x 10<sup>-6</sup>) (radius in cm) (rpm)<sup>2</sup>

## **9. EXTRACTION DU SÉRUM SUR LES COLONNES DE SILICE OCTADÉCYLSILYLÉ**

- 9.1** Pipetez 250 µl de contrôles et d'échantillons inconnus dans une éprouvette en verre de 12 x 75 mm et ajoutez-y 1 ml d'HCl 0,5 N. Mélangez doucement à l'agitateur vortex pour obtenir un mélange uniforme.
- 9.2** Fixez chaque colonne de silice octadécylsilylé à un raccord de seringue.
- 9.3** Ajoutez 5 ml d'alcool isopropylique de qualité "réactif" dans chaque seringue.
- 9.4** Appuyez sur le piston de la seringue pour la vider.
- 9.5** Retirez la colonne de silice octadécylsilylé. (Détachez la colonne de l'extrémité de la seringue avant de retirer le piston afin de ne pas contaminer le contenu de la seringue avec le liquide situé dans la colonne de silice octadécylsilylé.)
- 9.6** Retirez les pistons des seringues.
- 9.7** Remettez les colonnes de silice octadécylsilylé en place sur les seringues.
- 9.8** Ajoutez 5 ml de méthanol de qualité CLHP.
- 9.9** Répétez les étapes 4 à 7.
- 9.10** Ajoutez 5 ml d'acide acétique à 4 %.
- 9.11** Répétez les étapes 4 à 7.
- 9.12** Répétez les étapes 10 et 11.
- 9.13** Appliquez l'échantillon de l'étape 1. Enfoncez lentement la cartouche à un débit de 1 ml toutes les 2 à 3 minutes.
- 9.14** Répétez les étapes 5 à 7.
- 9.15** Lavez la colonne de silice octadécylsilylé 2 fois avec 10 ml d'acide acétique à 4 % en répétant les étapes 5 à 7 entre les lavages.
- 9.16** Prélevez l'éluat dans des tubes en verre de 16 x 100 mm en éluant le peptide avec 4 ml de méthanol de qualité CLHP. Appuyez lentement afin que le méthanol reste en contact avec la colonne de silice octadécylsilylé pendant 3 minutes minimum.
- 9.17** Laissez le méthanol s'évaporer à siccité dans un bain d'eau à 37° C en utilisant de l'air comprimé ou de l'azote.
- 9.18** Reconstituez les échantillons déshydratés avec 500 µl d'étalon 0 et mettez-les en incubation à 37° C pendant 10 minutes pour obtenir une reconstitution complète (mélangez de temps en temps sur l'agitateur Vortex pendant l'incubation). Un échantillon dont on escompte des valeurs élevées doit être reconstitué avec 1,0 ml d'étalon 0 à ce moment-là. Le résultat final doit être corrigé par le facteur de dilution approprié (voyez la section Résultats pour le calcul).
- 9.19** Dosez 50 µl des extraits de sérum en double dans le dosage radio-immunologique.

## 10. PROCÉDURE DE DOSAGE

- 10.1 Reconstituez les réactifs lyophilisés et laissez les réactifs congelés décongeler complètement. Ne laissez pas les réactifs atteindre une température supérieure à 25° C. Mélangez délicatement tous les réactifs avant utilisation.
- 10.2 Installez des tubes de 12 x 75 mm étiquetés en doublet selon le Profil de dosage de la dernière page. Tous les volumes sont en microlitres.
- 10.3 Ajoutez les réactifs dans les tubes comme suit :
  - a. **Tubes de numération totale**  
Laissez-les de côté jusqu'à l'étape 5.
  - b. **Liaison non spécifique (NSB)**  
50 µl d'étalon 0
  - c. **Étalon 0 IGF-I**  
50 µl d'étalon 0  
200 µl d'antisérum IGF-I
  - d. **Étalons (1 à 5) IGF-I**  
50 µl d'étalon IGF-I  
200 µl d'antisérum IGF-I
  - e. **Contrôles et échantillons inconnus**  
50 µl d'extraits de sérum  
200 µl d'antisérum IGF-I
- 10.4 Mettez en incubation pendant 2 heures (±15 minutes) entre 2 et 8° C.
- 10.5 Ajoutez 200 µl d'IGF-I125I dans tous les tubes.
- 10.6 Mélangez les tubes délicatement à l'aide du Vortex en évitant la formation de mousse et mettez en incubation pendant 20 heures (±1 heure) entre 2 et 8° C.
- 10.7 Mélangez vigoureusement le complexe précipitant ; ajoutez-en 500 µl dans tous les tubes à l'exception des tubes de numération totale.
- 10.8 Mélangez les tubes délicatement à l'aide du Vortex en évitant la formation de mousse et mettez en incubation pendant 2 heures (±15 minutes) entre 2 et 8° C.
- 10.9 Centrifugez les tubes pendant 20 minutes à un minimum de 760 x g\* entre 20 et 25° C.
- 10.10 Décantez immédiatement le surnageant dans tous les tubes à l'exception des tubes de numération totale, en les renversant pendant 2 minutes minimum. Placez les tubes sur du papier absorbant pour éliminer toutes les gouttes de surnageant qui peuvent rester sur les bords avant de les replacer à l'endroit.
- 10.11 Utilisez un compteur de scintillation gamma pour effectuer la numération du précipité dans chaque tube et dans les tubes de numération totale pendant le temps nécessaire à l'obtention d'une exactitude statistique (consultez la section Limitations de la procédure).

## 11. COMMENTAIRES SUR LA PROCÉDURE

- 11.1 Ajoutez chaque aliquote de réactif au tiers inférieur du tube à essai pour garantir le mélange complet des réactifs.
- 11.2 Certains fabricants vendent des tubes jetables qui donnent des liaisons non spécifiques élevées.
- 11.3 Si le surnageant est aspiré dans le précipité, prenez soin de ne pas remuer le précipité.
- 11.4 Pour surveiller complètement la précision constante d'un dosage RIA, il faut parfois vérifier des facteurs supplémentaires. DiaSorin suggère de vérifier les paramètres suivants afin d'assurer la constance des performances de la trousse.
  - a. **Numérations totales**
  - b. **Liaison maximale**  
Coups moyens par minute (CPM) du tube de l'étalon 0 / CPM moyen des tubes de numération totale.

\* g =  $(1118 \times 10^{-8})$  (radius in cm) (rpm)<sup>2</sup>

**c. Liaison non spécifique**

CPM moyen du tube NSB / CPM moyen des tubes de numération totale.

**d. Pente de la courbe d'étalonnage**

Par exemple, surveillez les points d'inhibition de 80, 50 et 20 % de la courbe d'étalonnage.

**12. CONTRÔLE QUALITÉ**

Chaque laboratoire doit inclure au moins deux échantillons de contrôle pour chaque dosage afin de garantir la validité des résultats du dosage. Déterminez ensuite l'écart moyen et l'écart-type pour chaque contrôle, sur un minimum de dix (10) dosages. Une gamme de valeurs acceptable peut donc être obtenue pour ces contrôles en utilisant l'intervalle  $\pm 2$  écarts-types par rapport aux valeurs précédemment calculées. Le laboratoire de contrôle qualité de DiaSorin a déterminé un intervalle de valeurs pour les contrôles de la trousse.

**13. CALCUL DES RÉSULTATS**

Il existe de nombreuses méthodes de calcul des résultats des dosages radio-immunologiques. Chacune est basée sur l'obtention d'une courbe d'étalonnage en traçant l'ampleur de la liaison par rapport aux concentrations indiquées pour les étalons. Ce graphe peut être à l'échelle linéaire ou logarithmique.

Chacune de ces méthodes donne essentiellement les mêmes valeurs pour les contrôles et les échantillons, même si certains dosages peuvent être mieux "adaptés" à une méthode particulière qu'à une autre. La méthode de calcul pour le laboratoire de contrôle qualité DiaSorin est % B/B<sub>0</sub> par rapport à la concentration logarithmique.

**13.1** Calculez le CPM moyen pour chaque étalon, contrôle et échantillon inconnu.

**13.2** Soustrayez le CPM moyen des tubes NSB de toutes les numérations.

**13.3** Divisez le CPM corrigé de chaque étalon, contrôle ou échantillon inconnu par le CPM corrigé de l'étalon 0.

$$B/B_0 (\%) = \frac{\text{CPM de l'étalon ou de l'échantillon inconnu} - \text{CPM de NSB}}{\text{CPM de l'étalon 0} - \text{CPM de NSB}} \times 100$$

**13.4** En utilisant du papier quadrillé semi-logarithmique ou logarithmique à 2 cycles, tracez le pourcentage B/B<sub>0</sub> pour les étalons IGF-I (axe vertical) par rapport à

la concentration (axe horizontal).

**13.5** Tracez la droite de meilleur ajustement d'un point à l'autre.

**13.6** Interpolez les niveaux d'IGF-I dans les échantillons inconnus d'après le tracé.

**13.7** Corrigez en fonction du volume de reconstitution adéquat. Par exemple : si 250 µl de sérum ont été extraits et reconstitués avec 500 µl d'étalon 0, multipliez la valeur interpolée depuis la courbe par 2. Si 250 µl de sérum ont été extraits et reconstitués avec 1,0 ml d'étalon 0, multipliez la valeur interpolée depuis la courbe par 4.

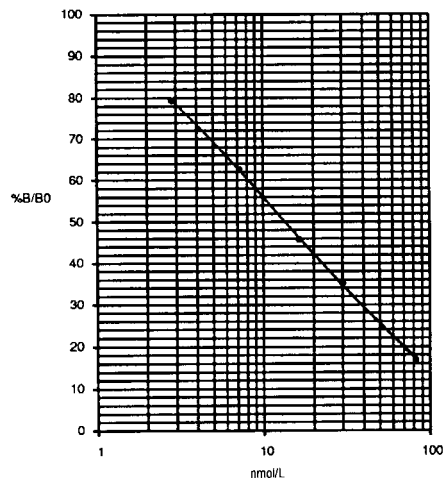
**13.8** Calculez la liaison maximale en divisant le CPM de l'étalon 0 par les numérations totales moyennes obtenues dans les tubes de numération totale.

**TABLEAU II**  
Données D'ECHANTILLONS IGF-I DE DiaSorin

Tube	CPM double	CPM moyen	CPM corrigé	% lié (B/T)	% (B/B <sub>0</sub> )	Conc. graphe (nmol/l)	Conc. finale (nmol/l)
Total	10 830 10,991	10 991					
NSB	351 338	345		3,2			
Étalon 0	4 060 4,055	4 058	3 713	37,2			
Étalons (nmol/l)							
1 (2,9)	3 332 3,264	3 298	2 953		79,5		
2 (7,3)	2 852 2,683	2 673	2 328		62,7		
3 (16,4)	2 032 2,059	2 046	1 701		45,8		
4 (29,9)	1 685 1,634	1 660	1 315		35,4		
5 (82,5)	991 964	978	633		17,0		
Échantillons de patients inconnus							
1	2 564 2,590	2 577	2 232		60,1	8,3	16,6
2	1 701 1,723	1 712	1 367		36,8	27,6	55,2

Des données d'échantillons typiques et une courbe d'étalonnage sont présentées au TABLEAU II et à la FIGURE 1 ; cette courbe est fournie à titre de référence seulement et ne doit pas être utilisée pour le calcul d'une valeur quelconque.

**Courbe d'étalonnage des échantillons IGF-I**



**FIGURE 1**

**TRAITEMENT DES RESULTATS**

Le laboratoire CQ DiaSorin utilise un programme d'ajustement de courbe cubique (smoothed spline curve fit).

#### 14. LIMITATIONS DE LA PROCÉDURE

- 14.1** Tout échantillon inconnu, dont la valeur est supérieure à l'étalon le plus élevé de la trousse, doit être correctement dilué avec l'étalon 0, à partir de l'extrait de la colonne de silice octadécylsilylé, et dosé de nouveau. Corrigez le résultat à l'aide du facteur de dilution approprié.
- 14.2** Les temps de numération doivent être suffisants pour empêcher l'erreur statistique lors de la numération (par exemple, l'accumulation de 2 000 CPM donnera une erreur de 5 % et 10 000 CPM donneront une erreur de 1 %).
- 14.3** L'IGF-I est élevé lors de la grossesse et il a été démontré que ses valeurs augmentaient avec l'âge gestationnel. D'autres conditions sont connues pour réduire les taux d'IGF-I, y compris un mauvais état nutritionnel, le jeûne et l'hypothyroïdie. L'hépatite peut également influencer les taux d'IGF-I. Des tests de provocation de la somatotrophine doivent également être utilisés dans le diagnostic de l'hypopituitarisme lorsque les résultats IGF-I sont faibles. Un taux normal d'IGF-I est très improbable lors du diagnostic d'hypopituitarisme, sauf en cas d'hyperprolactinémie ou de craniopharyngiome. A l'heure actuelle, aucun médicament n'est connu pour interférer avec le dosage de l'IGF-I.9

#### 15. VALEURS ESCOMPTÉES

##### Valeurs normales

Les valeurs normales doivent être vérifiées par chaque laboratoire. Nous avons étudié un grand nombre d'échantillons normaux (provenance : Minnesota, Israël, Maryland et Australie) durant la mise au point de notre dosage de l'IGF-I et nous avons constaté que les taux d'IGF-I varient avec l'âge et, dans certaines classes d'âge, selon le sexe du patient. Par conséquent, des contrôles assortis en termes d'âge et de sexe doivent être utilisés si besoin est. Le TABLEAU III et les FIGURES 2 et 3 donnent les résultats de valeurs normales obtenues par plusieurs laboratoires et rassemblées par DiaSorin. Étant donné la distribution dissymétrique prononcée au cours de la puberté, il est nécessaire d'utiliser un modèle statistique de transformation logarithmique afin de mettre au point des limites de confiance de 95 % lors de la définition d'intervalles pour les enfants. Ce n'est pas utile pour le traitement des valeurs chez les adultes.

**TABLEAU III**  
Étude conduite avec des valeurs normales en fonction de l'âge et du sexe  
**Nanomoles/l**

(ans) Classe d'âge	Homme			Femme		
	Moyenne	(n)	Intervalle*	Moyenne	(n)	Intervalle*
1 mois - 1,99	7,55	(16)	4,32-13,18	7,35	(12)	3,42-15,79
2,00-5,99	12,27	(17)	5,70-26,40	11,10	(12)	4,43-27,85
6,00-8,00	15,56	(15)	6,39-36,13	11,89	(13)	6,01-23,51
8,01-10,00	15,34	(13)	5,92-39,75	17,29	(11)	9,16-32,64
10,01-13,99	21,90	(24)	8,65-55,46	32,15	(14)	9,30-111,10
14,00-18,00	42,84	(15)	17,33-105,83	42,68	(15)	12,94-140,80
Adulte —	27,55	(36)	9,09-46,01	30,03	(41)	11,63-48,43

\*Modèle de transformation logarithmique avec limites de confiance à 95 % sauf pour les adultes.

Unités/ml						
(ans)	Homme			Femme		
Classe d'âge	Moyenne	(n)	Intervalle*	Moyenne	(n)	Intervalle*
1 mois - 1,99	0,30	(16)	0,17-0,53	0,29	(12)	0,14-0,63
2,00-5,99	0,49	(17)	0,23-1,06	0,44	(12)	0,17-1,11
6,00-8,00	0,62	(15)	0,26-1,44	0,48	(13)	0,24-0,94
8,01-10,00	0,61	(13)	0,24-1,59	0,69	(11)	0,37-1,31
10,01-13,99	0,88	(24)	0,35-2,22	1,28	(14)	0,37-4,44
14,00-18,00	1,71	(15)	0,69-4,23	1,71	(15)	0,52-5,63
Adulte	1,10	(36)	0,36-1,84	1,20	(41)	0,47-1,94

\*Modèle de transformation logarithmique avec limites de confiance à 95 % sauf pour les adultes.

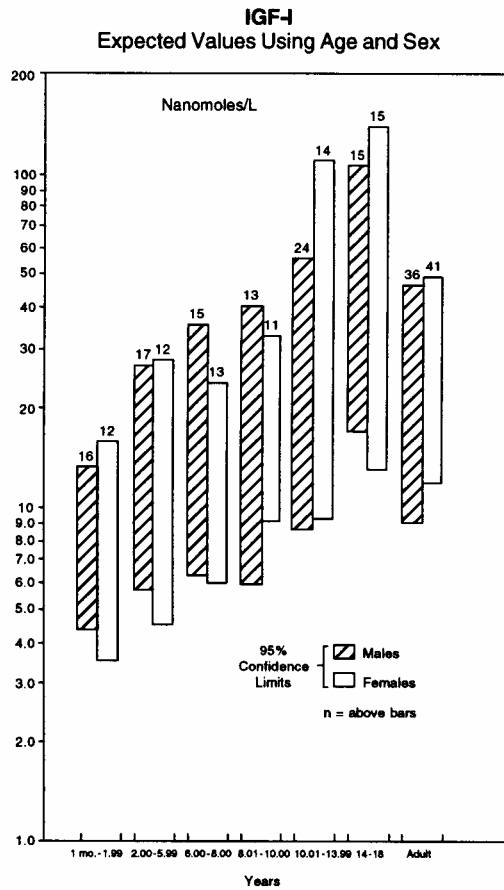


FIGURE 2



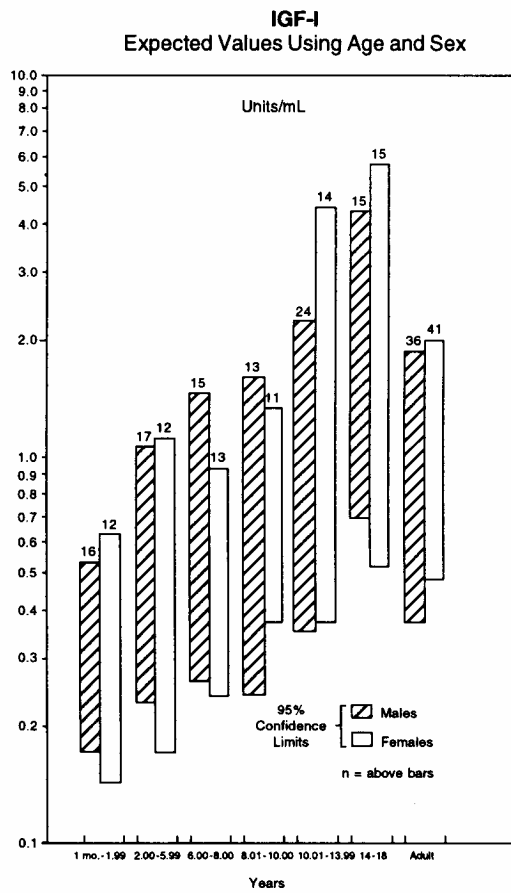


FIGURE 3

## 16. CRITÈRES DE QUALITÉ SPÉCIFIQUES

### 16.1 Précision

Variation intra-dosage (valeurs = nmol/l)

	Valeur moyenne	Écart-type	% C.V.	n
Faible	7,1	0,6	8,4	15
Moyen	13,4	1,3	10,1	15
Élevé	24,8	2,2	9,1	15

Variation inter-dosage (valeurs = nmol/l).

	Valeur moyenne	Écart-type	% C.V.	n
Faible	8,9	1,1	12,5	15
Moyen	17,4	1,8	10,3	15
Élevé	32,7	5,0	15,2	15

**16.2 PURETE : LA PURETE DU DOSAGE A ETE VERIFIEE PAR LES TESTS DE LINEARITE ET DE RECUPERATION.**

**Linéarité (parallélisme)**

Étude de dilution en série de 3 échantillons inconnus (valeurs = nmol/l)

Numéro d'échantillon	Non dilué	1/2	1/4
1	21,8	26,5	29,6
2	29,2	28,2	26,4
3	37,5	34,3	37,0

**Récupération**

Étude de la récupération (valeurs = nmol/l). Le pourcentage de récupération est calculé comme suit : valeur mesurée ÷ valeur escomptée x 100.

Valeur de référence	Étalon ajouté	Valeur escomptée	Valeur mesurée	Pourcentage de récupération
Lot N° 1				
15,7	1,2	16,9	16,9	100
15,7	3,4	19,1	18,3	96
15,7	7,7	23,4	24,6	106
Lot N° 2				
20,7	1,2	21,9	17,7	81
20,7	3,4	24,1	21,3	88
20,7	7,7	28,4	28,5	101

**16.3 Sensibilité Analytique**

Définie comme la concentration obtenue à 3 écarts-types de l'activité de liaison maximale, la quantité minimale décelable est de <2,0 nmol/l.

**16.4 Spécificité Analytique**

La comparaison de la réactivité de l'anticorps anti-IGF-I au point d'inhibition de 50 % B/B<sub>0</sub> a été effectuée avec les peptides suivants :

Peptide	% réaction croisée
IGF-II	<1,0
Somatotrophine	<1,0
Facteur de croissance de fibroblastes	<1,0
Facteur de croissance transformant	<1,0
Facteur de croissance dérivé des plaquettes	<1,0

**CONSULTEZ LA DERNIÈRE PAGE POUR LES RÉFÉRENCES**

## PROCÉDURE DE DOSAGE

1. Reconstituez les réactifs lyophilisés et laissez les échantillons congelés décongeler complètement.
2. Extrayez les contrôles et les échantillons inconnus selon les instructions données à la section 9 de la notice d'utilisation.
3. Identifiez les tubes en double.
4. Distribuez les réactifs conformément au profil suivant :

Tubes/réactifs	Numération totale	NSB	Étalon 0-5	Contrôles et échantillons inconnus
Étalon 0	-	50 µl	50 µl	-
Étalons (1-5)	-	-	50 µl	-
Contrôles extraits	-	-	-	50 µl
Échantillons inconnus extraits	-	-	-	50 µl
Antisérums	-	-	200 µl	200 µl

5. Mélangez bien ; mettez en incubation pendant 2 heures (+/- 15 minutes) entre 2 et 8° C.
6. Distribuez 200 µl de traceur dans toutes les cupules.
7. Mélangez bien ; mettez en incubation pendant 20 heures (+/- 1 heure) entre 2 et 8° C.
8. Distribuez 500 µl de complexe précipitant dans toutes les cupules, à l'exception des tubes de numération totale.
9. Mélangez bien et mettez en incubation pendant 2 heures (+/- 15 minutes) entre 2 et 8° C.
10. Centrifugez à 760 x g\* pendant 20 minutes.
11. Décantez les surnageants.
12. Comptez chaque tube dans un compteur gamma pendant 60 secondes ou plus.

$$* g = (1118 \times 10^{-8}) (\text{radius in cm}) (\text{rpm})^2$$

## IGF-I RIA-KIT

### 1. VERWENDUNGSZWECK

NUR ZUR IN-VITRO-DIAGNOSTIK.

Diese Packung enthält Anleitungen und Material für die quantitative Bestimmung von IGF-I in Humanserum mit dem Radioimmunoassay (RIA). Das Verfahren dient als zusätzliches Verfahren zur hGH-Bestimmung bei der Diagnose von Hypopituitarismus und Akromegalie.

### 2. ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

Somatomedin C ist ein 70 Aminosäuren langes Peptid, das zu einer Familie von Wachstumsfaktoren gehört, zu der die insulinähnlichen Wachstumsfaktoren I und II, Somatomedin A und B sowie MSA zählen. Vor kurzem wurde herausgefunden, dass Somatomedin C strukturell mit IGF-I<sup>4</sup> identisch ist, dessen Sequenz im Jahre 1978 von Rinderknecht und Humbel veröffentlicht wurde.<sup>6</sup> Zwischen Proinsulin und Somatomedin bestehen insofern Ähnlichkeiten, als beide Substanzen A- und B-Peptide, die mit einem C-Peptid verknüpft sind, sowie interne Disulfide enthalten. IGF-I ist aufgrund seiner Aminosäurezusammensetzung stark basischer Natur und zirkuliert gebunden an Proteine mit einem hohen Molekulargewicht von ungefähr 140.000 Dalton.

IGF-I vermittelt die Wachstumsförderungsvorgänge des Wachstumshormons. Es wird in zahlreichen Geweben des Körpers als Reaktion auf das Wachstumshormon freigesetzt und durch einen Rückkopplungsmechanismus gesteuert, der eine eng kontrollierte Schleife zwischen Hypothalamus und Hypophyse bildet.<sup>8</sup>

Neben dem Wachstumshormon sind Alter und Geschlecht zwei der wichtigsten Einflussfaktoren für die IGF-I-Konzentration im Serum. Die IGF-I-Konzentrationen sind bei der Geburt am niedrigsten und steigen im Laufe von Säuglingsalter und Kindheit an. Die höchsten Konzentrationen werden im Jugendalter erreicht und nehmen im Erwachsenenalter langsam wieder ab. Weibliche Personen weisen im Jugend- und Erwachsenenalter geringfügig höhere IGF-I-Konzentrationen auf als männliche Personen.<sup>1,10</sup> Die IGF-I-Messung wurde als Screening- und Behandlungshilfsmittel bei Kindern mit defektem Wachstumshormon befürwortet.<sup>10</sup> Durch ihre Anwendung bei der Diagnose zusammen mit Wachstumshormonmessungen<sup>8</sup> oder als Hilfsmittel zur Beurteilung der Reaktion eines Kindes auf verabreichtes Wachstumshormon<sup>4</sup> hat die Messung einen bedeutenden Stellenwert in Hormonlabors erlangt, vor allem bei der Behandlung von Wachstumsstörungen.<sup>2,7</sup>

Eine zweite wichtige Anwendung der IGF-I-Messung ist die Diagnose und Behandlung von Akromegalie.<sup>5</sup> IGF-I-Konzentrationen können bei der Auswertung der Ergebnisse einer Akromegaliebehandlung mit Bromokriptin hilfreich sein.<sup>9</sup>

### 3. TESTPRINZIP

Der IGF-I RIA von DiaSorin ist ein Doppelantikörper-Dysäquilibriumtest, der ein ODS-Silica-Extraktionsverfahren für Serumproben umfasst. Nach dem Extraktionsverfahren wird der RIA durch die Zugabe von Proben und Hase-anti-IGF-I durchgeführt, gefolgt von einer zweistündigen Inkubation bei 2-8°C. Anschließend wird Jod-125-IGF-I hinzugegeben, gefolgt von einer zweiten Inkubation von 20 Stunden bei 2-8°C. Ein zuvor präzipitierter Träger, ein zweiter Antikörper und Polyethylenglykol werden in einem einzigen Schritt hinzugegeben. Der Test kann nach zwei Stunden Antikörperinkubation bei 2-8 °C zentrifugiert und dekantiert werden. Der IGF-I-Wert von zahlreichen anderen Säugetieren kann mit Hilfe dieses Verfahrens ebenfalls gemessen werden.

### 4. KITREAGENZIEN

IgF-1-Nullkalibrator	1 Fläschchen / 20 ml
IgF-1-Kalibratoren 1-5	5 Fläschchen / 0,5 ml
IgF-1-Antiserum	1 Fläschchen / 14 ml
<sup>125</sup> I IgF-1-Tracer	1 Fläschchen / 14 ml
IgF-1-Kontrollen	2 Fläschchen / 1,0 ml
Präzipitierender IgF-1-Komplex	1 Fläschchen / 35 ml
ODS-Silica	1 Pckg. / 25 Säulen
Anzahl der Tests	65

LAGERUNG: Der Kit sollte bei -15°C oder bei tieferen Temperaturen aufbewahrt werden. Nach der Rekonstitution sind alle Reagenzien bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum bei -15° oder bei tieferen Temperaturen zu lagern. Die Reagenzien dürfen nach dem Verfallsdatum nicht verwendet werden.

Bei der Rekonstitution den Inhalt der Fläschchen vorsichtig mischen, um Schaumbildung zu vermeiden. Reagenzien aus verschiedenen Chargen dürfen nicht vermischt werden.

**4.1 IGF-I -Nullkalibrator:** lyophilisiertes Reagenz

BSA-Boratpuffer enthält 0,25% Natriumazid als Konservierungsmittel. Das Fläschchen mit 20 ml destilliertem Wasser rekonstituieren und 15-20 Minuten bis zur vollständigen Lösung des Inhalts stehen lassen; vor dem Gebrauch gründlich mischen.

**4.2 IGF-I-Kalibratoren (1-5):** lyophilisiertes Reagenz

Fünf intakte humane IGF-I-Kalibratoren werden in Nominalkonzentrationen von 3,0-75 nmol/l (0,12-3,0 Einheiten/ml) in BSA-Boratpuffer mit 0,1% Natriumazid als Konservierungsmittel vorverdünnt. Jeder Charge sind genaue Werte zugeteilt. Jedes Fläschchen mit 0,5 ml destilliertem Wasser rekonstituieren und 15-20 Minuten bis zur vollständigen Lösung des Inhalts stehen lassen; vor dem Gebrauch gründlich mischen. Die DiaSorin IGF-I-Kalibratoren wurden gegen den WHO-Standard NBSB 87/518 kalibriert. Jeder Vergleich mit anderen Produkten oder Verfahren sollte mit dieser Referenzvorbereitung erfolgen. Zur Annäherung der von vielen kommerziellen Labors verwendeten Einheiten wurde ein Wert von 25 nmol/l, der 1 Einheit/ml entspricht, festgelegt. Der in Nanomol/Liter angegebene IGF-I-Wert wird durch den Multiplikator 7,7 in ng/ml umgerechnet. Die Kitkalibratoren sind mit Patientenproben austauschbar, wenn sie mit Reagenzien verwendet werden und dieser diagnostische In-vitro-Test wie empfohlen durchgeführt wird.

**4.3 IGF-I-Antiserum:** lyophilisiertes Reagenz

Hase-anti-IGF-I-Serum wird in BSA-Boratpuffer mit Heparin verdünnt, das 0,002% Thimerosal enthält. Das Fläschchen mit 14 ml destilliertem Wasser rekonstituieren und 15-20 Minuten bis zur vollständigen Lösung des Inhalts stehen lassen; vor dem Gebrauch gründlich mischen.

**4.4 <sup>125</sup>I IGF-I:** lyophilisiertes Reagenz

Humanes synthetisches IGF-I (53-70) wird mit Jod-125 markiert und in einem BSA-Borat-EDTA-Puffer mit 0,008% Thimerosal als Konservierungsmittel verdünnt. Das Fläschchen mit 14 ml destilliertem Wasser rekonstituieren und 15-20 Minuten bis zur vollständigen Lösung des Inhalts stehen lassen; vor dem Gebrauch gründlich mischen.

**4.5 IGF-I-Kontrollen (Stufe 1 und 2):** lyophilisiertes Reagenz

Falls notwendig, wird Humanserum mit der entsprechenden Menge an intaktem humanem IGF-I versetzt, um eine Konzentration innerhalb des angegebenen Bereichs zu erzielen. Zugabe von 0,02% Natriumazid als Konservierungsmittel. Jedes Fläschchen mit 1,0 ml destilliertem Wasser rekonstituieren und 15-20 Minuten bis zur vollständigen Lösung des Inhalts stehen lassen; gründlich mischen und das Qualitätskontrollserum als unbekannte Probe behandeln. Die Wertebereiche sind auf den Kontrollfläschchen aufgedruckt.

**4.6 Präzipitierender IGF-I-Komplex:** lyophilisiertes Reagenz

Normales Hasenserum, das zuvor mit Ziegen-anti-Hasenserum und Polyethylenglykol (PEG) präzipitiert wird, wird in BSA-Boratpuffer unter Zugabe von 0,03% Thimerosal verdünnt. Das Fläschchen mit 35 ml destilliertem Wasser rekonstituieren; GRÜNDLICH mischen, bis die Suspension ganz homogen ist, und dann für mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur stehen lassen und gelegentlich umrühren.

**4.7 ODS-Silica:** gebrauchsfertiges Reagenz

Die Kunststoffsäulen enthalten Octadecylsilyl-Silica (Sep-Paks). Vor Anwendung der Probe müssen die Säulen „geprimed“ werden (siehe Abschnitt über das Extraktionsverfahren). Die ODS-Silicasäulen können bei Raumtemperatur aufbewahrt werden. Die Säulen sind bei geöffneter Packung 3 Jahre lang und bei ungeöffneter Packung unbegrenzt stabil.

**5. WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN**

NUR ZUR *IN-VITRO*-DIAGNOSTIK.

Nicht für internen oder externen Gebrauch bei Menschen oder Tieren. Dieses Verfahren dient als zusätzliches Verfahren zur hGH-Bestimmung bei der Diagnose von Hypopituitarismus und Akromegalie.

#### **REAGENZIEN MIT MATERIAL HUMANEN URSPRUNGS**

##### **Dieses Produkt ist als potenzieller Infektionserreger zu behandeln.**

Alle in der Herstellung dieses Produktes verwendeten Serum- bzw. Plasmaspendeeinheiten wurden nach einer FDA-genehmigten Methode getestet und für nicht reaktiv auf Hepatitis-B-Oberflächenantigen (HBsAg), Hepatitis-C-Antikörper (HCV) und Antikörper für HIV-1/2 befunden. Obwohl diese Methode äußerst genau ist, bietet sie keine Gewähr dafür, dass alle infizierten Einheiten identifiziert werden können. Dieses Produkt kann auch Material humanen Ursprungs enthalten, für welches es noch kein genehmigtes Testverfahren gibt. Da keine der zur Zeit bekannten Testmethoden absolute Gewähr für die Abwesenheit des Hepatitis-B-Virus (HBV), Hepatitis-C-Virus (HCV), des Retrovirus (HIV) oder anderer Infektionserreger bieten kann, sind alle Produkte mit Komponenten humanen Ursprungs unter Einhaltung guter Laborpraktiken und entsprechender Vorsichtsmaßnahmen laut Empfehlungen des Leitfadens der Centers for Disease Control and Prevention/National Institutes of Health (amerikanische Krankheitsforschungszentren/Staatliche Gesundheitsinstitute): «Biosafety in Micro-biological and Biomedical Laboratories» (Biosicherheit in mikrobiologischen und biomedizinischen Laboren), 4. Auflage, Mai 1999, oder aktuelle Auflage, als potenzielle infektiöse Substanzen zu behandeln.

#### **REAGENZIEN MIT NATRIUMAZID**

**VORSICHT:** Einige Reagenzien in diesem Kit enthalten Natriumazid, das gegebenenfalls mit Blei- oder Kupferleitungen reagieren und höchst explosive Metallazide bilden kann. Zur Entsorgung mit reichlich Wasser nachspülen, um Azidaufbau zu vermeiden. Weitere Informationen finden Sie im Abschnitt «Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts» (Dekontaminierung von Abflüssen in Laborspülbecken zur Entsorgung von Azidsalzen) des Handbuchs "Safety Management" (Sicherheitsmaßnahmen), Nr. CDC-22, herausgegeben von den Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, USA 1976.

#### **Europäische Gemeinschaften: Gefahrenbezeichnungen für gefährliche Stoffe (Richtlinie 1999/45/EG)**

R 20/21/22 - Gesundheitsschädlich beim Einatmen, Verschlucken und Berührung mit der Haut.

R 32 - Entwickelt bei Berührung mit Säure sehr giftige Gase.

S28 - Bei Berührung mit der Haut sofort mit viel Wasser abwaschen.

#### **REAGENZIEN MIT THIMEROSAL**

Einige Reagenzien in diesem Kit enthalten Thimerosal, das eine Quecksilberkomponente enthält. Die Entsorgung von elementarem oder anorganischem Quecksilber sowie von Quecksilberoxiden und -komponenten muss unter strikter Einhaltung aller lokalen, einzelstaatlichen und bundesstaatlichen Vorschriften erfolgen.

**WARNHINWEIS:** Dieses Produkt enthält eine Chemikalie, die nach Angaben des US-Bundesstaates Kalifornien Geburtsdefekte oder andere reproduktive Schäden hervorruft.

#### **REAGENZIEN MIT JOD-125**

Dieses Kit enthält radioaktives Material mit nicht mehr als 2 µCi (74 kBq) Jod-125. Bei der Lagerung, Handhabung und Entsorgung dieses Materials sind entsprechende Vorsichtsmaßnahmen und gute Laborpraktiken einzuhalten.

Für Ärzte bzw. Institutionen, welche im Rahmen einer Generallizenz Radioisotope erhalten:

Entgegennahme, Erwerb, Besitz und Verwendung dieses radioaktiven Materials sind nur Ärzten, veterinärmedizinisch tätigen Tierärzten, klinischen Laboren oder Krankenhäusern und nur für klinische In-vitro-Tests oder In-vitro-Labortests gestattet, bei denen kein interner oder externer Kontakt des Materials oder seiner Strahlung mit

Menschen oder Tieren stattfindet. Entgegennahme, Erwerb, Besitz, Verwendung und Weitergabe des Materials unterliegen den Vorschriften und der Generallizenz der US Nuclear Regulatory Commission (US-amerikanische Strahlenschutzbehörde) bzw. des Staates, mit dem diese Behörde ein Abkommen zur Ausübung ihrer Überwachungsfunktion abgeschlossen hat.

1. Die Lagerung des radioaktiven Materials ist auf einen speziell dafür bestimmten Bereich zu beschränken.
2. Der Zugang zu radioaktivem Material ist nur befugten Personen zu gestatten.
3. Radioaktives Material nicht mit dem Mund pipettieren.
4. Im vorgesehenen radioaktiven Arbeitsbereich nicht essen oder trinken.
5. Verschüttetes Material aufwischen und Bereich anschließend mit alkalischem Reinigungsmittel oder radiologischer Dekontaminationslösung waschen. Alle benutzten

Glasbehälter vor dem Waschen mit anderen Laborbehältern aus Glas gründlichst mit Wasser spülen.

Für Ärzte oder Einrichtungen, die im Rahmen einer Sondergenehmigung Radioisotope erhalten:

Entgegennahme, Gebrauch, Weitergabe und Entsorgung radioaktiven Materials unterliegen den Vorschriften und Bedingungen der jeweiligen Sondergenehmigung.

**WARNHINWEIS:** Dieses Produkt enthält eine Chemikalie, die nach Angaben des US-Bundesstaates Kalifornien krebserregend ist.

**ACHTUNG:** Die auf der Packungsbeilage angegebene Radioaktivität kann von der auf dem Etikett des Kartons und des Tracer-Fläschchens angegebenen etwas abweichen. Sowohl das Etikett des Kartons als auch das Etikett des Tracer-Fläschchens geben den tatsächlichen Wert der Radioaktivität am Kalibrationsdatum an, während die Packungsbeilage die theoretische Radioaktivität darstellt.

#### 6. ANZEICHEN FÜR MÖGLICHEN VERFALL DER KITREAGENZIEN

- 6.1 Existenz anormaler Feinpartikel in einem der Reagenzien
- 6.2 Eine Verschiebung des Anstiegs bzw. der Position der Kalibrierkurve im Vergleich zu den normalen Ergebnissen
- 6.3 Eine Abnahme der maximalen Bindung
- 6.4 Eine hohe nichtspezifische Bindung

#### 7. PROBENGEWINNUNG UND -VORBEREITUNG

Für den Assay werden zweihundertfünfzig Mikroliter Serum benötigt.

Das Blut durch Venenpunktur in einem evakuierten Glasröhrchen für 5 oder 10 ml sammeln. Blut bei Raumtemperatur gerinnen lassen. Zur Gewinnung von hämolysenfreiem Serum Blutproben 15 Minuten lang mit  $760 \times g^*$  zentrifugieren. Zur Aufrechterhaltung der Probenreinheit sind weder Zusatzstoffe noch Konservierungsmittel erforderlich. Alle mit der Probe in Kontakt gekommenen Kunststoffbehälter, Glasbehälter oder anderen Materialien sind von jeder Verunreinigung freizuhalten.

EDTA oder heparinisieretes Plasma können zu geringfügig niedrigeren Ergebnissen führen.

Das Serum sollte unverzüglich von den Zellen separiert und bei  $-15^\circ\text{C}$  oder tieferen Temperaturen aufbewahrt werden. Für eine lange Lagerung sollten Proben bei  $-15^\circ\text{C}$  oder tieferen Temperaturen eingefroren werden. Proben können mehrmals eingefroren und aufgetaut werden.

#### 8. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTE GERÄTE UND MATERIALIEN

- 8.1 Einweg-Borosilikatglasröhrchen, 12 x 75 mm
- 8.2 Temperaturgesteuerte Zentrifuge für 12 x 75 mm-Röhrchen
- 8.3 Gammazintillationszähler zur Messung von Jod-125
- 8.4 Vortexer
- 8.5 Pipettiergeräte:
  - a. Auf die Abgabe von 50  $\mu\text{l}$ , 250  $\mu\text{l}$  und 500  $\mu\text{l}$  kalibrierte Mikropipetten
  - b. Auf die Abgabe von 200  $\mu\text{l}$  und 500  $\mu\text{l}$  kalibrierte Multipipetten

#### Zur ODS-Silica-Säulenextraktion benötigte Materialien und Reagenzien

- 8.6 12 ml-Einwegspritzen
- 8.7 Isopropylalkohol
- 8.8 Methanol (HPLC-Gradient oder besser)
- 8.9 4% Essigsäure
- 8.10 0,5 N Salzsäure
- 8.11 Druckluftversorgung
- 8.12 Wasserbad bei  $37^\circ\text{C}$
- 8.13 16 x 100 mm-Glasröhrchen

#### 9. EXTRAKTION VON SERUM MIT ODS-SILICASÄULEN

- 9.1 250  $\mu\text{l}$  der Kontrollen und unbekanntenen Proben in ein 12 x 75 mm großes Glasteströhrchen pipettieren und 1 ml 0,5 N HCl hinzugeben. Vorsichtig vortexen, bis der Inhalt gut gemischt ist.
- 9.2 Jede ODS-Silicasäule an einem Spritzenverteiler befestigen.

- 9.3 5 ml Reagenzgrad-Isopropylalkohol in jede Spritze geben.
- 9.4 Den Inhalt mit Hilfe des Spritzenkolbens durch die Spritze pressen.
- 9.5 Die ODS-Silicasäule entfernen. (Die ODS-Silicasäule vom Spritzenende entfernen, bevor der Kolben entfernt wird, um eine Kontamination des Spritzeninhalts mit der in der ODS-Silicasäule enthaltenen Flüssigkeit zu vermeiden.)
- 9.6 Den Spritzenkolben aus den Spritzen entfernen.
- 9.7 Die ODS-Silicasäule wieder an den Spritzen anbringen.
- 9.8 5 ml Methanol (HPLC-Gradient) hinzugeben.
- 9.9 Die Schritte 4 bis 7 wiederholen.
- 9.10 5 ml 4% Essigsäure hinzugeben.
- 9.11 Die Schritte 4 bis 7 wiederholen.
- 9.12 Die Schritte 10 und 11 wiederholen.
- 9.13 Die Probe aus Schritt 1 verwenden. Langsam mit einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml pro 2-3 Minuten durch die Patrone pressen.
- 9.14 Die Schritte 5 bis 7 wiederholen.
- 9.15 Die ODS-Silicasäule zweimal mit 10 ml 4% Essigsäure waschen und zwischen den Waschgängen die Schritte 5 bis 7 wiederholen.
- 9.16 Das Eluat durch Elution des Peptids mit 4 ml Methanol (HPLC-Gradient) in 16 x 100 mm großen Glasröhrchen sammeln. Langsam drücken, so dass das Methanol mindestens 3 Minuten lang in Kontakt mit der ODS-Silicasäule bleibt.
- 9.17 Das Methanol in einem 37°C warmen Wasserbad mit Hilfe von Druckluft oder Stickstoff zu trockenem Methanol verdampfen lassen.
- 9.18 Die getrockneten Proben mit 500 µl Nullkalibrator rekonstituieren und bei 37°C 10 Minuten lang inkubieren, um eine vollständige Rekonstitution sicherzustellen (während der Inkubation intermittierend vortexen). Eine Probe, bei der ein erhöhter Wert erwartet wird, sollte zu diesem Zeitpunkt mit 1,0 ml Nullkalibrator rekonstituiert werden. Das Endergebnis muss durch den entsprechenden Verdünnungsfaktor korrigiert werden. (Näheres zur Berechnung finden Sie im Abschnitt über die Ergebnisse.)
- 9.19 50 µl der Serumextrakte in zweifacher Ausführung im Radioimmunoassay testen.

## 10. TESTVERFAHREN

- 10.1 Lyophilisierte Reagenzien rekonstituieren und gefrorene Reagenzien vollständig auftauen lassen. Die Reagenzien dürfen nicht auf mehr als 20-25°C erwärmt werden. Alle Reagenzien vor dem Gebrauch leicht mischen.
- 10.2 Beschriftete 12 x 75 mm-Röhrchen gemäß dem Testschema auf der letzten Seite in doppelter Ausführung vorbereiten. Alle Volumen sind in Mikroliter angegeben.
- 10.3 Reagenzien den Röhrchen wie folgt zugeben:
  - a. **Totalaktivität-Röhrchen**  
Bis Schritt 5 beiseite legen.
  - b. **Nichtspezifische Bindung (NSB)**  
50 µl Nullkalibrator
  - c. **IGF-I -Nullkalibrator**  
50 µl Nullkalibrator  
200 µl IGF-I-Antiserum
  - d. **IGF-I-Kalibratoren (1-5)**  
50 µl IGF-I-Kalibrator  
200 µl IGF-I-Antiserum
  - e. **Kontrollen und unbekannte Proben**  
50 µl Serumextrakte  
200 µl IGF-I-Antiserum
- 10.4 2 Stunden (± 15 Minuten) lang bei 2-8 °C inkubieren.
- 10.5 Zu allen Röhrchen 200 µl 125I-IGF-I hinzugeben.

$$* g = (1118 \times 10^{-8}) (\text{Radius in cm}) (\text{U/min})^2$$



- 10.6** Die Röhrchen vorsichtig ohne Schaumbildung vortexen und 20 Stunden ( $\pm 1$  Stunde) lang bei 2-8°C inkubieren.
- 10.7** Den präzipitierenden Komplex gründlich mischen; 500  $\mu$ l zu allen Röhrchen außer den Totalaktivität-Röhrchen zugeben.
- 10.8** Die Röhrchen vorsichtig ohne Schaumbildung vortexen und 2 Stunden ( $\pm 15$  Minuten) lang bei 2-8°C inkubieren.
- 10.9** Die Röhrchen 20 Minuten lang mit mindestens 760 x g\* bei 20-25°C zentrifugieren.
- 10.10** Die Überstände durch mindestens 2 Minuten langes Umdrehen der Röhrchen sofort aus allen Röhrchen außer den Totalaktivität-Röhrchen dekantieren. Bevor Sie die Röhrchen aufrecht stellen, die Röhrchen auf Saugpapier abtupfen, um alle eventuellen Tropfen von Überständen auf den Rändern zu entfernen.
- 10.11** Mit einem Gammazintillationszähler das Präzipitat jedes Röhrchens und der Totalaktivität-Röhrchen eine ausreichende Zeit lang messen, um statistische Genauigkeit zu erhalten (siehe den Abschnitt „Grenzen des Verfahrens“).

## 11. ANMERKUNGEN ZUM VERFAHREN

- 11.1** Jedes Aliquot des Reagenzes in das untere Drittel des Teströhrchens hinzugeben, damit sich die Reagenzien vollständig vermischen.
- 11.2** Die Einweg-Röhrchen einiger Hersteller führen zu hohen nichtspezifischen Bindungen.
- 11.3** Falls Sie es vorziehen, den Überstand vom Präzipitat abzusaugen, achten Sie dabei darauf, das Präzipitat nicht aufzurühren.
- 11.4** Um die konsistente Leistung eines Radioimmunoassays vollständig zu überwachen, müssen möglicherweise weitere Faktoren überprüft werden. DiaSorin empfiehlt, die folgenden Parameter zu überprüfen, um sicherzustellen, dass die Leistung des Kits konstant ist.
- a. Totalaktivität**
- b. Maximale Bindung**  
Durchschnittliche Zählungen pro Minute (CPM) des Nullkalibrator-Röhrchens / Durchschnittliche CPM der Totalaktivität-Röhrchen.
- c. Nichtspezifische Bindung**  
Durchschnittliche CPM des NSB-Röhrchens / Durchschnittliche CPM der Totalaktivität-Röhrchen.
- d. Steilheit der Eichkurve**  
Überwachen Sie zum Beispiel die 80%-, 50%- und 20%-Suppressions-Punkte der Eichkennlinie.

## 12. QUALITÄTSKONTROLLE

Jedem Labor wird empfohlen, bei jedem Assay mindestens zwei Kontrollproben mitzutesten, um die Gültigkeit aller Testergebnisse zu gewährleisten. Ein Mittelwert und eine Standardabweichung sind dann für jede Kontrolle in mindestens zehn (10) Versuchsgängen zu bestimmen. Ein zulässiger Wertebereich kann dann für diese Kontrollen mit  $\pm 2$  Standardabweichungen der zuvor bestimmten Werte ermittelt werden. Das Qualitätskontrolllabor von DiaSorin hat für die in dieser Packung enthaltenen Kontrollen einen Bereich ermittelt.

## 13. ERGEBNISBERECHNUNG

Es gibt viele Möglichkeiten, die Ergebnisse von Radioimmunoassays zu berechnen. Bei jeder Methode wird eine Kalibrationskurve angelegt, indem die prozentualen Bindungen gegen die angegebenen Konzentrationen der Kalibratoren aufgetragen werden. Diese Kurve kann entweder eine lineare oder eine logarithmische Skala besitzen. Jede dieser Methoden führt im Wesentlichen zu denselben Werten für Kontrollen und Proben; bei einigen Assays ist die eine Methode jedoch möglicherweise besser geeignet als die andere. Die Umrechnungsmethode für das DiaSorin Qualitätskontrolllabor ist % B/B<sub>0</sub> gegen log Konzentration.

$$* g = (1118 \times 10^{-8}) (\text{Radius in cm}) (\text{U/min})^2$$

- 13.1** Die durchschnittliche CPM für die einzelnen Kalibratoren, Kontrollen und unbekanntes Proben berechnen.
- 13.2** Die durchschnittliche CPM der NSB-Röhrchen von allen Zählungen abziehen.
- 13.3** Die korrigierte CPM der einzelnen Kalibratoren, Kontrollen oder unbekanntes Proben durch die korrigierte CPM des Nullkalibrators teilen.

$$B/B_0 (\%) = \frac{\text{CPM des Kalibrators oder der unbekanntes Probe} - \text{CPM der NSB}}{\text{CPM des Nullkalibrators} - \text{CPM der NSB}} \times 100$$

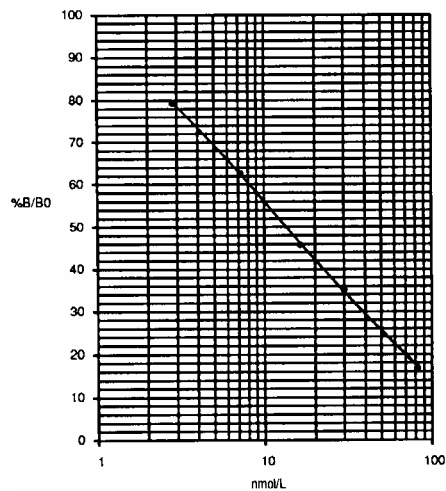
- 13.4** Auf halblogarithmischem Millimeterpapier (2 Zyklen) oder doppelt-logarithmischem Millimeterpapier prozentuale Bindungen B/B<sub>0</sub> für die IGF-I-Kalibratoren (vertikale Achse) gegen die Konzentration (horizontale Achse) auftragen.
- 13.5** Durch die Punkte eine Ausgleichsgerade ziehen.
- 13.6** Die Konzentrationen von IGF-I in den unbekanntes Proben aus der Auftragung interpolieren.
- 13.7** Mit dem entsprechenden Rekonstitutionsvolumen korrigieren. Beispiel: Wenn 250 µl Serum mit 500 µl Nullkalibrator extrahiert und rekonstituiert wurden, den aus der Kurve interpolierten Wert mit dem Faktor 2 multiplizieren. Wenn 250 µl Serum mit 1,0 ml Nullkalibrator extrahiert und rekonstituiert wurden, den aus der Kurve interpolierten Wert mit dem Faktor 4 multiplizieren.
- 13.8** Die maximale Bindung wird berechnet, indem die CPM des Nullkalibrators durch die in den Totalaktivität-Röhrchen erhaltenen durchschnittlichen Gesamtzählungen dividiert wird.

**TABELLE II**  
DiaSorin IGF-I-ProbenDaten

Röhrchen	Zweifache CPM	Durchschn. CPM	Korrigierte CPM	% Gebunden (B/T)	% (B/B <sub>0</sub> )	Kurvenkonz. (nmol/l)	Endkonz. (nmol/l)
Gesamt	10,830 10,991	10,991					
NSB	351 338	345		3,2			
Nullkalibrator	4,060 4,055	4,058	3,713	37,2			
Kalibratoren (nmol/l)							
1 (2,9)	3,332 3,264	3,298	2,953		79,5		
2 (7,3)	2,852 2,683	2,673	2,328		62,7		
3 (16,4)	2,032 2,059	2,046	1,701		45,8		
4 (29,9)	1,685 1,634	1,660	1,315		35,4		
5 (82,5)	991 964	978	633		17,0		
Unbekannte Patientenproben							
1	2,777 2,777	2,577	2,232		60,1	8,3	16,6
2	1,701 1,723	1,712	1,367		36,8	27,6	55,2

Typische Proben Daten und eine Eichkurve werden in TABELLE II und ABBILDUNG 1 gezeigt; diese Kurve dient nur als Beispiel und sollte nicht zur Berechnung von Probenwerten verwendet werden.

**IGF-I-PROBENEICHKURVE**



**ABBILDUNG 1**

**DATENREDUKTION**

Das Qualitätskontrolllabor von DiaSorin verwendet eine geglättete Spline-Kurvenanpassung.

#### 14. GRENZEN DES VERFAHRENS

- 14.1 Jede unbekannte Probe, deren Wert größer ist als der größte Kalibratorwert des Kits, muss aus dem ODS-Silicasäulenextrakt entsprechend mit Nullkalibrator verdünnt und erneut getestet werden. Das Ergebnis muss mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor korrigiert werden.
- 14.2 Die Zählzeiten sollten ausreichend lang sein, um das Auftreten von Fehlern aufgrund von statistischen Fehlern bei der Zählung zu vermeiden (2.000 CPM ergeben z. B. 5 % Fehler; 10.000 CPM ergeben 1 % Fehler).
- 14.3 Die IGF-I-Werte sind während einer Schwangerschaft erhöht, und es wurde festgestellt, dass die Werte mit zunehmender Dauer der Schwangerschaft ansteigen. Unter anderen Bedingungen, zu denen ein schlechter Ernährungsstatus, Fasten und Hypothyroidismus zählen, sinken dagegen die IGF-I-Konzentrationen. Durch Hepatitis können die IGF-I-Konzentrationen ebenfalls beeinflusst werden. Bei der Diagnose von Hypopituitarismus sollten provokative Tests bezüglich des menschlichen Wachstumshormons auch angewendet werden, wenn die IGF-I-Ergebnisse gering ausfallen. Ein normales IGF-I-Ergebnis ist bei der Diagnose von Hypopituitarismus sehr unwahrscheinlich, außer im Falle von Hyperprolaktinämie oder Kraniopharyngiom. Zurzeit sind keine Drogen bekannt, durch die der IGF-I-Assay beeinträchtigt wird.<sup>9</sup>

#### 15. ERWARTETE WERTE

##### Normalbereich

Die Normalbereiche sollten von jedem Labor überprüft werden. Im Laufe der Entwicklung unseres IGF-I-Assays wurde eine große Anzahl von normalen Proben (geografische Herkunft: Minnesota, Israel, Maryland und Australien) untersucht, und wir haben herausgefunden, dass die IGF-I-Werte je nach Alter und in einigen Altersgruppen je nach Geschlecht variieren; daher sollten gegebenenfalls Kontrollen von Personen mit entsprechendem Alter und Geschlecht verwendet werden. In TABELLE III sowie in den ABBILDUNGEN 2 und 3 werden die Ergebnisse von Normalwerten dargestellt, die von DiaSorin aus verschiedenen Labors zusammengetragen und kollationiert wurden. Da während der Pubertät eine deutliche Verzerrung der Verteilung auftritt, muss ein statistisches Modell zur logarithmischen Transformation angewendet werden, um bei der Festlegung der Wertebereiche für Kinder Grenzwerte mit 95%iger Sicherheit zu erhalten. Für die Handhabung von Erwachsenenwerten ist dies nicht erforderlich.

**TABELLE III**  
Normalbereichsstudie nach Alter und Geschlecht  
**Nanomol/l**

(Jahre) Altersgruppe	Männlich			Weiblich		
	Mittelwert	(n)	Bereich*	Mittelwert	(n)	Bereich*
1 Mon.-1,99	7,55	(16)	4,32-13,18	7,35	(12)	3,42-15,79
2,00-5,99	12,27	(17)	5,70-26,40	11,10	(12)	4,43-27,85
6,00-8,00	15,56	(15)	6,39-36,13	11,89	(13)	6,01-23,51
8,01-10,00	15,34	(13)	5,92-39,75	17,29	(11)	9,16-32,64
10,01-13,99	21,90	(24)	8,65-55,46	32,15	(14)	9,30-111,10
14,00-18,00	42,84	(15)	17,33-105,83	42,68	(15)	12,94-140,80
Erwachsene	27,55	(36)	9,09-46,01	30,03	(41)	11,63-48,43

\*Logarithmisches Transformationsmodell mit Grenzwerten mit 95%iger Sicherheit (außer für Erwachsene)

Einheiten/ml						
(Jahre)	Männlich			Weiblich		
Altersgruppe	Mittelwert	(n)	Bereich*	Mittelwert	(n)	Bereich*
1 Mon.-1,99	0,30	(16)	0,17-0,53	0,29	(12)	0,14-0,63
2,00-5,99	0,49	(17)	0,23-1,06	0,44	(12)	0,17-1,11
6,00-8,00	0,62	(15)	0,26-1,44	0,48	(13)	0,24-0,94
8,01-10,00	0,61	(13)	0,24-1,59	0,69	(11)	0,37-1,31
10,01-13,99	0,88	(24)	0,35-2,22	1,28	(14)	0,37-4,44
14,00-18,00	1,71	(15)	0,69-4,23	1,71	(15)	0,52-5,63
Erwachsene	1,10	(36)	0,36-1,84	1,20	(41)	0,47-1,94

\*Logarithmisches Transformationsmodell mit Grenzwerten mit 95%iger Sicherheit (außer für Erwachsene)

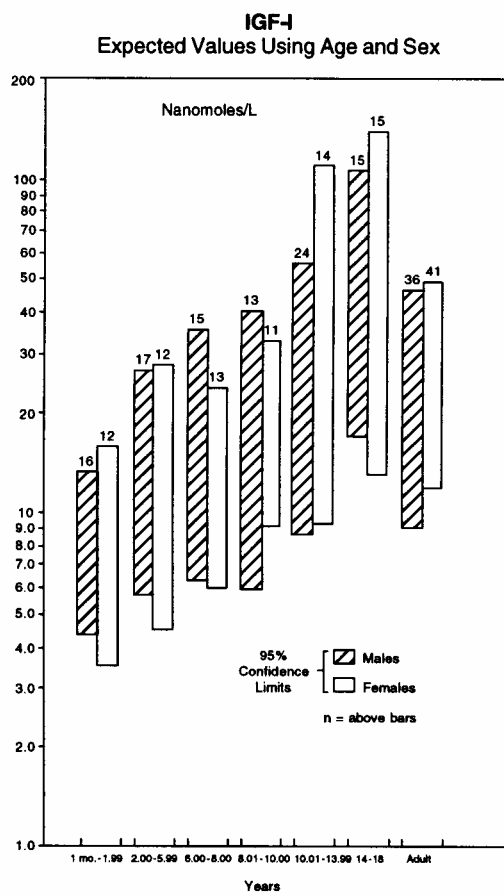


ABBILDUNG 2

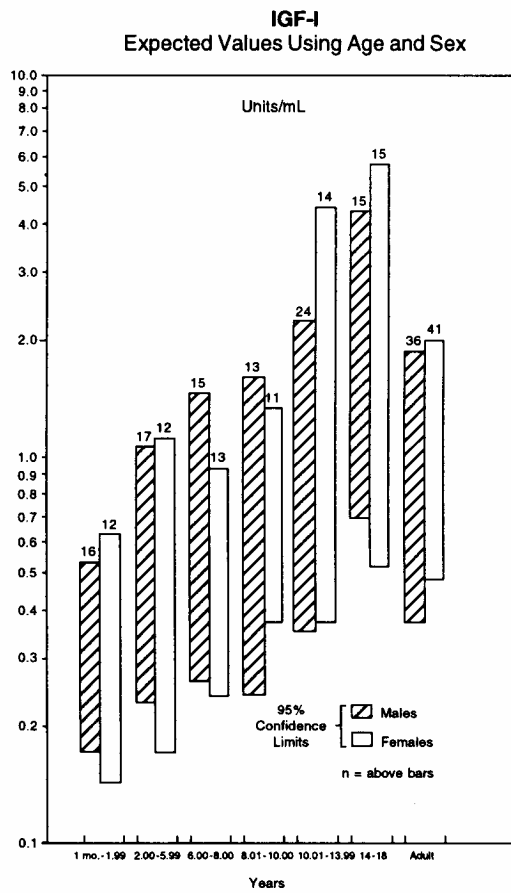


ABBILDUNG 3

## 16. TESTCHARAKTERISTIKA

### 16.1 Präzision

Testinterne Varianz (Werte = nmol/l)

	Mittelwert	SD	% VK	n
Niedrig	7,1	0,6	8,4	15
Mittel	13,4	1,3	10,1	15
Hoch	24,8	2,2	9,1	15

Varianz zwischen verschiedenen Tests (Werte = nmol/l)

	Mittelwert	SD	% VK	n
Niedrig	8,9	1,1	12,5	15
Mittel	17,4	1,8	10,3	15
Hoch	32,7	5,0	15,2	15

**16.2 RICHTIGKEIT: DIE RICHTIGKEIT DES TESTS WURDE DURCH LINEARITÄTSTEST UND WIEDERFINDUNGSTEST GEPRÜFT.**

**Linearität (Parallelität)**

Serienverdünnung von 3 unbekanntenen Proben (Werte = nmol/l)

Probennummer	Unverdünnt	1/2	1/4
1	21,8	26,5	29,6
2	29,2	28,2	26,4
3	37,5	34,3	37,0

**Wiederfindung**

Wiederfindungsuntersuchung (Werte = nmol/l). Die Wiederfindungsrate wird wie folgt berechnet: Gemessener Wert ÷ erwarteter Wert x 100.

Hintergrund	Hinzugefügter Kalibrator	Erwarteter Wert	Gemessener Wert	Prozent Wiederfindung
Satz Nr. 1				
15,7	1,2	16,9	16,9	100
15,7	3,4	19,1	18,3	96
15,7	7,7	23,4	24,6	106
Satz Nr. 2				
20,7	1,2	21,9	17,7	81
20,7	3,4	24,1	21,3	88
20,7	7,7	28,4	28,5	101

**16.3 Analytische Sensitivität**

Wenn die geringste nachweisbare Konzentration als die scheinbare Konzentration bei 3 Standardabweichungen von den Zählungen bei maximaler Bindung definiert wird, beträgt sie <2,0 nmol/l.

**16.4 Analytische Spezifität**

Der Vergleich der Reaktivität des IGF-I-Antikörpers bei der 50-prozentigen Suppression B/B<sub>0</sub> wurde mit den folgenden Peptiden durchgeführt:

Peptid	% Kreuzreaktivität
IGF-II	<1,0
Menschliches Wachstumshormon	<1,0
Fibroblastenwachstumsfaktor	<1,0
Transformationswachstumsfaktor	<1,0
Von Thrombozyten abgeleiteter Wachstumsf.	<1,0

**LITERATURANGABEN FINDEN SIE AUF DER LETZTEN SEITE**

## TESTSCHEMA

1. Lyophilisierte Reagenzien rekonstituieren und gefrorene Proben vollständig auftauen lassen.
2. Die Kontrollen und unbekanntes Proben gemäß Abschnitt 9 der Produktbeilage extrahieren.
3. Röhrchen in doppelter Anordnung aufstellen.
4. Reagenzien wie folgt dispensieren:

Röhrchen/Reagenzien	Totalaktivität	NSB	KAL. 0-5	Kontrollen und unbekanntes Proben
Nullkalibrator	-	50 µl	50 µl	-
Kalibratoren (1-5)	-	-	50 µl	-
Extrahierte Kontrollen	-	-	-	50 µl
Extrahierte unbekanntes Proben	-	-	-	50 µl
Antiserum			200 µl	200 µl

5. Gut mischen; 2 Stunden ( $\pm 15$  Minuten) lang bei 2-8°C inkubieren.
6. 200 µl Tracer in alle Wells dispensieren.
7. Gut mischen; 20 Stunden ( $\pm 1$  Stunde) lang bei 2-8°C inkubieren.
8. 500 µl präzipitierenden Komplex in alle Wells dispensieren, mit Ausnahme der Totalaktivität-Röhrchen.
9. Gut mischen; 2 Stunden ( $\pm 15$  Minuten) lang bei 2-8°C inkubieren.
10. Mit 760 x g\* 20 Minuten lang zentrifugieren.
11. Die Überstände dekantieren.
12. Jedes Röhrchen mindestens 60 Sekunden lang in einem Gamma-Zähler zählen.

\*  $g = (1118 \times 10^{-8}) (\text{Radius in cm}) (\text{U/min})^2$



## KIT RIA I DE FACTOR DE CRESCIMENTO TIPO INSULINA

### 1. USO INDICADO

PARA USO DIAGNÓSTICO IN VITRO.

Este kit contém instruções e materiais para a determinação quantitativa de IGF-I no soro humano através de radioimunoensaio (RIA). Este procedimento deve ser usado como procedimento anexo à determinação de hGH no diagnóstico do hipopituitarismo e a acromegalia.

### 2. RESUMO E EXPLICAÇÃO

A somatomedina C é um peptídeo aminoácido 70 que faz parte da família dos factores de crescimento que inclui os factores de crescimento tipo insulina I e II, as somatomedinas A e B e MSA. Recentemente, foi verificado que a somatomedina C tem a mesma estrutura do IGF-I<sup>4</sup>, cuja sequência foi publicada em 1978 por Rinderknecht e Humbel.<sup>6</sup> Tanto a pró-insulina como a somatodina contém peptídeos A e B com um peptídeo-C ligado, e ambas têm dissulfetos internos. O IGF-I é de natureza muito básica devido à sua composição de aminoácidos e circula ligado a proteínas de peso molecular alto, de aproximadamente 140,000 daltons.

O IGF-I medeia as acções de estímulo do crescimento da hormona do crescimento. É libertado por certos tecidos do corpo como resposta à hormona do crescimento e está sob o controlo de um mecanismo de retroalimentação que forma um circuito firmemente controlado entre o hipotálamo e a glândula pituitária.<sup>8</sup>

À parte da hormona do crescimento, dois dos mais importantes factores que influenciam a concentração de IGF-I no soro são a idade e o sexo. Os níveis de IGF-I são mais baixos no nascimento e aumentam durante a infância. Os níveis mais altos são atingidos durante a adolescência e descem lentamente durante a idade adulta. As mulheres apresentam uns níveis de IGF-I levemente mais altos do que os homens durante a adolescência e a idade adulta.<sup>1,10</sup>

A medição de IGF-I foi defendida como instrumento de despistagem e controlo em crianças deficientes em hormona do crescimento.<sup>10</sup> O seu uso em diagnóstico acompanhado por medições de hormona do crescimento<sup>9</sup> ou como instrumento para avaliar a resposta de uma criança a quem se ministra hormona do crescimento<sup>4</sup> levou-o a um lugar notável no laboratório endócrino, particularmente quando se faz face a doenças do crescimento.<sup>2,7</sup>

Um segundo uso importante da medição de IGF-I encontra-se no diagnóstico e tratamento da acromegalia.<sup>5</sup> Os níveis de IGF-I podem ser eficazes para avaliar os resultados do tratamento com bromocriptina da acromegalia.<sup>9</sup>

### 3. PRINCÍPIO DO ENSAIO

O RIA IGF-I da DiaSorin é um ensaio de desequilíbrio de anticorpo duplo que inclui um procedimento de extracção de ODS-sílica para amostras de soro. Após o procedimento de extracção, o radioimunoensaio é executado utilizando uma adição de amostra e anti-IGF-I de coelho, seguida de 2 horas de incubação a 2-8°C. Depois, realiza-se uma adição de IGF-I iodo-125 seguida de uma segunda incubação durante 20 horas a 2-8°C. Num único passo, aditam-se um portador pré-precipitado, um segundo anticorpo e glicol polietileno. O ensaio pode ser centrifugado e decantado após 2 horas de incubação do segundo anticorpo a 2-8°C. O IGF-I de muitos outros mamíferos também pode ser medido com este procedimento.

### 4. REAGENTES FORNECIDOS NO KIT

Calibrador O IgF-1	1 frasco/ 20 mL
Calibradores 1-5 IgF-1	5 frascos/0,5 mL
Anti-soro IgF-1	1 frasco/ 14 mL
Traçador <sup>125</sup> IgF-1 I	1 frasco/ 14 mL
Controlos IgF-1	2 frascos/ 1,0 mL
Complexo precipitante IgF-1	1 frasco/35 mL
ODS-Sílica	1 pkg./25 colunas
Número de testes	65

**ARMAZENAMENTO:** Ao ser recebido, o kit deve ser armazenado a -15°C ou menos. Após a reconstituição, armazene cada reagente a -15°C ou menos até à data de validade no rótulo. Os reagentes não devem ser usados após o prazo de validade.

Ao reconstituir o conteúdo dos frascos, misture com cuidado para evitar a formação de espuma. Não misture reagentes de lotes diferentes.

**4.1 Calibrador 0 GF-I :** reagente liofilizado

O tampão de BSA-borato contém 0,25% de azida de sódio adicionado como conservante. Reconstitua o frasco com 20 mL de água depurada e deixe-o em descanso durante 15 - 20 minutos até o respectivo conteúdo estar completamente dissolvido; misture perfeitamente antes de usar.

**4.2 IGF-I Calibradores (1-5):** reagente liofilizado

Cinco calibradores IGF-I humano intacto em concentrações nominais de 3,0-75 nmol/L (0,12- 3,0 unidades/mL) são pré-diluídos num tampão de BSA-borato contendo 0,1% de azida de sódio como conservante. Os valores exactos são atribuídos a cada lote. Reconstitua cada frasco com 0,5 mL de água depurada e deixe os frascos em descanso durante 15 - 20 minutos até o respectivo conteúdo estar completamente dissolvido; misture perfeitamente antes de usar. Os calibradores IGF-I da DiaSorin foram calibrados de acordo com a Norma NBSB 87/518 da Organização Mundial da Saúde (OMS/WHO). Qualquer comparação com outros produtos ou procedimentos deve ser efectuada com base nesta preparação de referência. Para aproximar-se das unidades utilizadas por muitos laboratórios comerciais, foi atribuído um valor de 25 nmol/L igual a 1 unidade/mL. Nanomoles/litro de IGF-I é convertido em ng/mL pelo multiplicador 7,7. Os calibradores do kit demonstram permutabilidade com amostras de pacientes quando usados com reagentes e um procedimento operacional deste teste de diagnóstico in vitro tal como recomendado.

**4.3 Anti-soro IGF-I :** reagente liofilizado

Soro anti-IGF-I de coelho é diluído em tampão de BSA-borato com heparina contendo 0,002% de timerosal. Reconstitua o frasco com 14 mL de água depurada e deixe-o em descanso durante

15 - 20 minutos até o respectivo conteúdo estar completamente dissolvido; misture perfeitamente antes de usar.

**4.4 <sup>125</sup>IGF-I I:** reagente liofilizado

O IGF-I humano sintético (53-70) é marcado com iodo-125 e é diluído em tampão de BSA-borato-EDTA que contém 0,008% de timerosal como conservante. Reconstitua o frasco com 14 mL de água depurada e deixe-o em descanso durante 15 - 20 minutos até o respectivo conteúdo estar completamente dissolvido; misture perfeitamente antes de usar.

**4.5 Controlos IGF-I (Níveis 1 e 2):** reagente liofilizado

O soro humano é enriquecido, se necessário, com quantidades apropriadas de IGF-I humano intacto para obter uma concentração dentro das faixas especificadas. Acrescenta-se 0,02% de azida de sódio como conservante. Reconstitua os frascos com 1,0 mL de água depurada e deixe-o em descanso durante 15 - 20 minutos até o respectivo conteúdo estar completamente dissolvido; misture perfeitamente e trate o soro de controlo de qualidade como uma amostra desconhecida. Os intervalos estão impressos nos frascos de controlo.

**4.6 Complexo precipitador IGF-I:** reagente liofilizado

O soro de coelho normal pré-precipitado com soro anti-coelho de cabra e glicol polietileno (PEG), é diluído em tampão de BSA-borato com adição de 0,03% de timerosal. Reconstitua o frasco com 35 mL de água depurada; misture PERFEITAMENTE até a suspensão ficar homogénea e depois deixe-o em descanso durante um mínimo de 30 minutos à temperatura ambiente, misturando ocasionalmente.

**4.7 ODS-Sílica:** reagente pronto a usar

As colunas de plástico contém sílica quimicamente ligada a octadecilsilano (ODS) (Sep-Paks). As colunas devem ser "preparadas" antes de aplicar a amostra (ver a secção de Procedimento de Extração). As colunas de ODS-sílica podem ser armazenadas à temperatura ambiente. As colunas são estáveis durante 3 anos após a embalagem ter sido aberta, e indefinidamente em caso de a embalagem ficar fechada.

**5. AVISOS E PRECAUÇÕES**

**PARA USO DIAGNÓSTICO IN VITRO.**

Não recomendado para o uso interno ou externo em seres humanos ou animais. Este procedimento deve ser usado como procedimento anexo à determinação de hGH no diagnóstico do hipopituitarismo e a acromegalia.

**REAGENTES COM MATERIAL DE FONTE HUMANA**  
**Trate como se fossem potencialmente infecciosos.**

Cada unidade de doador de soro/plasma usada na preparação deste produto foi testada por um método aprovado pela FDA e determinada como sendo não reactiva para a presença de HBsAg, anticorpo para HCV e anticorpo para HIV 1/2. Embora estes métodos sejam muito precisos, não garantem que todas as unidades infectadas sejam detectadas. Este produto também pode conter outros materiais de origem humana para os quais não há teste aprovado. Como nenhum método de teste conhecido pode oferecer segurança total em relação à ausência do vírus da hepatite B (HBV), do vírus da hepatite C (HCV), do vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) ou de outros agentes infecciosos, todos os produtos que contêm materiais de fonte humana devem ser manuseados de acordo com boas práticas laboratoriais, usando as precauções adequadas tal como descrito no Manual dos Centros Americanos para Controlo e Prevenção de Doenças e Institutos Nacionais de Saúde, "Biossegurança em Laboratórios Microbiológicos e Biomédicos," (Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories) 4<sup>a</sup> ed., Maio de 1999 ou edição actual.

**REAGENTES COM AZIDA DE SÓDIO**

**CUIDADO:** Alguns reagentes presentes neste kit contêm azida de sódio. A azida de sódio pode reagir com chumbo ou cobre para formar azidas de metal altamente explosivo. Ao eliminar, lave com grande quantidade de água para impedir a formação de azida. Para mais informações, consulte "Descontaminação de drenos de pias de laboratórios para remover sais de azidas," no Manual Guia-Gestão de Segurança N.º CDC-22 emitido pelos Centros de Controlo e Prevenção de Doenças, GA, EUA, 1976.

**Frases de Risco de Substâncias Perigosas da Comunidade Europeia (Directiva do Conselho 1999/45/EC)**

R20/21/22 - Nocivo pela inalação, em contacto com a pele e se ingerido.

R32 - O contacto com ácidos liberta gás muito tóxico.

S28 - Após contacto com a pele, lave imediatamente com água em abundância.

**REAGENTES CONTENDO TIMEROSAL**

Alguns reagentes neste kit contêm timerosal que contêm um composto de mercúrio. A remoção de mercúrio elementar, mercúrio inorgânico, óxidos de mercúrio e compostos de mercúrio deve ser efectuada em estrita conformidade com todas as normas estatais e locais.

**ADVERTÊNCIA** Este produto contém um elemento químico que provoca malformações congénitas ou outros prejuízos à reprodução, segundo o Estado da Califórnia.

**REAGENTES COM IODO-125**

Este kit contém material radioactivo que não excede 4µCi (148kBq) de iodo-125. Devem ser tomadas todas as precauções apropriadas e usadas boas práticas laboratoriais no armazenamento, manuseamento e eliminação deste material.

Para médicos ou instituições que recebem rádio-isótopos sob uma licença geral:

Este material radioactivo pode ser recebido, adquirido, possuído e usado apenas por médicos, veterinários na prática da medicina veterinária, laboratórios clínicos e hospitais, e apenas para testes laboratoriais ou testes clínico in vitro que não envolvam administração interna ou externa do material, ou a radiação deste para seres humanos ou animais. A sua recepção, aquisição, posse, uso e transferência estão sujeitos aos regulamentos e à licença geral da Comissão Reguladora Nuclear dos Estados Unidos ou do estado com o qual a Comissão entrou em acordo para o exercício da autoridade reguladora.

1. O armazenamento de qualquer material radioactivo deve ser limitado a uma área especificamente designada.
2. O acesso a materiais radioactivos deve ser limitado apenas a pessoal autorizado.
3. Não pipete material radioactivo por via oral.
4. Não coma nem beba nas áreas designadas para trabalho radioactivo.
5. As áreas onde possam ocorrer fugas devem ser limpas e lavadas com detergente alcali ou solução de descontaminação radiológica. Qualquer vidro usado deve ser enxaguado completamente em água antes de lavar qualquer outro material de vidro do laboratório.

Para médicos ou instituições que recebem rádio-isótopos sob uma licença específica:

A recepção, uso, transferência e eliminação de materiais radioactivos estão sujeitos aos regulamentos e condições de sua licença específica.

**ADVERTÊNCIA:** Este produto contém um elemento químico que provoca cancro, segundo o Estado da Califórnia.

**ATENÇÃO:** O símbolo de radioatividade impresso na embalagem pode ser ligeiramente diferente do símbolo impresso no rótulo da caixa e no rótulo do frasco do traçador. O rótulo da caixa e do frasco do traçador indicam a quantidade real de radioatividade na data de calibragem enquanto a embalagem indica a radioatividade teórica no kit.

#### **6. INDICAÇÕES DE POSSÍVEL DETERIORAÇÃO DOS REAGENTES DO KIT**

- 6.1 A presença de partículas anormais em qualquer dos reagentes.
- 6.2 Um deslocamento na inclinação ou posição da curva do calibrador em relação à que é normalmente obtida.
- 6.3 Uma diminuição na ligação máxima.
- 6.4 Uma ligação não específica alta.

#### **7. RECOLHA DE ESPÉCIMES E PREPARAÇÃO**

São necessários duzentos e cinquenta microlitros de soro para o ensaio.

Recolha sangue por venipunctura num tubo de vidro vazio de 5 ou 10 mL. Deixe o sangue coagular à temperatura ambiente. Centrifugue durante 15 minutos usando  $760 \times g^*$  para obter soro sem hemólise. Não são necessários aditivos ou conservantes para manter a integridade da amostra. Qualquer plástico, vidro ou outro material que entrar em contacto com o espécime deve estar completamente descontaminado.

O EDTA ou o plasma heparinizado pode provocar uns resultados levemente mais baixos.

O soro deve ser imediatamente separado das células e armazenado a  $-15^{\circ}\text{C}$  ou menos. Para um armazenamento prolongado, as amostras devem ser congeladas a uma temperatura de  $-15^{\circ}\text{C}$  ou menos. Os espécimes podem ser congelados e descongelados várias vezes.

#### **8. EQUIPAMENTOS E MATERIAIS NECESSÁRIOS NÃO FORNECIDOS**

- 8.1 Tubos de vidro descartáveis de borossilicato, 12 x 75 mm.
- 8.2 Centrífuga controlada por temperatura para acomodar tubos de 12 x 75 mm.
- 8.3 Contador de cintilação gama capaz de contar iodo-125.
- 8.4 Vórtex.
- 8.5 Dispositivos para pipetar
  - a. Micropipetadores calibrados para administrar 50  $\mu\text{L}$ , 250  $\mu\text{L}$  e 500  $\mu\text{L}$ .
  - b. Distribuidores de repetição, calibrados para administrar 200  $\mu\text{L}$  e 500  $\mu\text{L}$ .

#### **Materiais e reagentes necessários para ODS-sílica**

##### **Extracção de coluna**

- 8.6 Seringas descartáveis de 12 mL.
- 8.7 Álcool isopropil.
- 8.8 Metanol, grau HPLC ou melhor.
- 8.9 Ácido acético a 4%.
- 8.10 0.5 N de ácido hidroclórico.
- 8.11 Abastecimento de ar comprimido.
- 8.12 Banho de água a  $37^{\circ}\text{C}$ .

- 8.13 Tubos de vidro de 16 x 100 mm.

#### **9. EXTRACÇÃO DE SORO COM COLUNAS DE ODS-SÍLICA**

- 9.1 Pipete 250  $\mu\text{L}$  de controlos e amostras desconhecidas num tubo de vidro para teste 12 x 75 mm e acrescente 1 mL de 0,5 N HCl. Agite com cuidado até misturar bem.
- 9.2 Aplique cada coluna de ODS-sílica no centro da seringa.
- 9.3 Adicione 5 mL de álcool isopropil grau reagente a cada seringa.
- 9.4 Pressione o êmbolo da seringa.
- 9.5 Remova a coluna de ODS-sílica. (Remova a coluna de ODS-sílica do fundo da seringa antes de retirar o êmbolo para evitar a contaminação do conteúdo da seringa com o fluído na coluna de ODS-sílica.)
- 9.6 Remova o êmbolo das seringas.
- 9.7 Reponha a coluna de ODS-sílica nas seringas.

- 9.8 Adicione 5 mL de metanol grau HPLC.
- 9.9 Repita os passos 4 a 7.
- 9.10 Adicione 5 mL de ácido acético a 4%.
- 9.11 Repita os passos 4 a 7.
- 9.12 Repita os passos 10 e 11.
- 9.13 Aplique a amostra do passo 1. Faça passar lentamente o cartucho a um ritmo de 1 mL por 2-3 minutos.
- 9.14 Repita os passos 5 a 7.
- 9.15 Lave a coluna de ODS-sílica 2 vezes com 10 mL de ácido acético a 4% repetindo os passos 5 a 7 entre duas lavagens.
- 9.16 Junte o eluído em tubos de vidro de 16 x 100 mm eluindo o peptídeo com 4 mL de metanol grau HPLC. Puxe lentamente de maneira ao metanol ficar em contacto com a coluna de ODS-sílica durante um mínimo de 3 minutos.
- 9.17 Evapore o metanol até à secura num banho a 37°C usando ar comprimido ou nitrogénio.
- 9.18 Reconstitua as amostras secas com 500 µL do calibrador 0 e incube a 37°C durante 10 minutos para assegurar uma completa reconstituição (misture de forma intermitente durante a incubação). Nesta altura, uma amostra que se espera que seja elevada deve ser reconstituída com 1,0 mL de calibrador 0. O resultado final deve ser corrigido pelo factor de diluição adequado (ver a secção de Resultados para o cálculo).
- 9.19 Ensaie 50 µL dos extractos de soro em duplicado no radioimunoensaio.

## 10. PROCEDIMENTO DE ENSAIO

- 10.1 Reconstitua os reagentes liofilizados e deixe descongelar totalmente qualquer reagente congelado. Não deixe os reagentes atingir temperaturas acima de 20-25°C. Misture com cuidado todos os reagentes antes de usar.
- 10.2 Prepare tubos de 12 x 75 mm rotulados em duplicata de acordo com o Esquema do Ensaio, na última página. Todos os volumes são em microlitros.
- 10.3 **Adicione reagentes aos tubos da seguinte forma:**
  - a. **Total de tubos de contagem**  
Não considere até ao passo 5
  - b. **Ligação não específica (NSB)**  
50 µL de calibrador 0
  - c. **Calibrador 0 de IGF-I**  
50 µL de calibrador 0  
200 µL de anti-soro IGF-I
  - d. **Calibradores IGF-I (1-5)**  
50 µL de calibrador IGF-I  
200 µL de anti-soro IGF-I
  - e. **Controlos e amostras desconhecidas**  
50 µL de extracto de soro  
200 µL de anti-soro IGF-I
- 10.4 Incube durante 2 horas (±15 minutos) a 2-8°C.
- 10.5 Adicione 200 µL de IFG-I I125 a todos os tubos.
- 10.6 Misture com cuidado os tubos sem fazer espuma e incube durante 20 horas (±1 hora) a 2-8°C.
- 10.7 Misture vigorosamente o complexo precipitante; adicione 500 µL a todos os tubos excepto os tubos de contagem total.
- 10.8 Misture com cuidado os tubos sem fazer espuma e incube durante 2 horas (±15 minutos) a 2-8°C.
- 10.9 Centrifugue os tubos durante 20 minutos usando no mínimo 760 x g\* a 20-25°C.

$$* g = (1118 \times 10^{-8}) (\text{raio em cm}) (\text{rpm})^2$$

**10.10** Decante imediatamente os sobrenadantes de todos os tubos excepto os tubos de contagem total invertendo-os durante um tempo mínimo de 2 minutos. Seque os tubos com papel absorvente para retirar qualquer gota de sobrenadante que possa ter permanecido nas bordas antes de colocar os tubos direitos.

**10.11** Usando um contador de cintilação gama, conte o precipitado de cada tubo e dos tubos de contagem total por tempo suficiente para atingir precisão estatística (ver secção de Limitações do Procedimento).

## **11. COMENTÁRIOS SOBRE O PROCEDIMENTO**

**11.1** Adicione cada alíquota de reagente para o terço inferior do tubo de ensaio para garantir a mistura completa dos reagentes.

**11.2** Os tubos descartáveis de alguns fabricantes produzem ligações não específicas elevadas.

**11.3** Se opta por aspirar o sobrenadante do precipitado, tome cuidado para não perturbar o precipitado.

**11.4** Para monitorar completamente o desempenho consistente de um ensaio RIA, há factores adicionais que devem ser verificados. A DiaSorin sugere a verificação dos parâmetros seguintes para assegurar um desempenho consistente do kit.

### **a. Contagens totais**

#### **b. Ligação máxima**

Média de contagens por minuto (CPM) de Tubo calibrador 0 / Média da CPM do total dos tubos de contagem.

#### **c. Ligação não específica**

CPM média de Tubo NSB/Média da CPM do total de tubos de contagem.

#### **d. Inclinação da curva do calibrador**

Por exemplo, monitore os pontos de supressão 80, 50 e 20% da linha do calibrador.

## **12. CONTROLO DE QUALIDADE**

Cada laboratório deve incluir ao menos duas amostras de controlo em cada ensaio para assegurar a validade dos resultados de cada ensaio. Deve-se então determinar o desvio médio e o desvio padrão para cada controlo usando um mínimo de dez (10) ensaios. Pode-se então obter um intervalo aceitável de valores para esses controlos usando  $\pm 2$  desvios padrão dos valores previamente determinados. O Laboratório de Controlo de Qualidade da DiaSorin determinou um intervalo para os controlos incluídos neste kit.

## **13. CÁLCULO DE RESULTADOS**

Existem vários métodos para calcular resultados de ensaios RIA. Cada um baseia-se em obter uma curva de calibragem plotando a extensão da ligação versus as concentrações declaradas dos calibradores. Este gráfico pode ser em escala linear ou logarítmica.

Cada um destes métodos dá essencialmente os mesmos resultados para controlos e amostras, embora certos ensaios possam “se encaixar” melhor em um método em especial do que em outro. O método de cálculo para o Laboratório de Controlo de Qualidade DiaSorin é % B/B<sub>0</sub> versus a concentração do registo.

**13.1** Calcule a CPM média para cada calibrador, controlo e amostra desconhecida.

**13.2** Subtraia a CPM média dos tubos NSB de todas as contagens.

**13.3** Divida a CPM corrigida de cada calibrador, controlo ou amostra desconhecida pela CPM corrigida do calibrador 0.

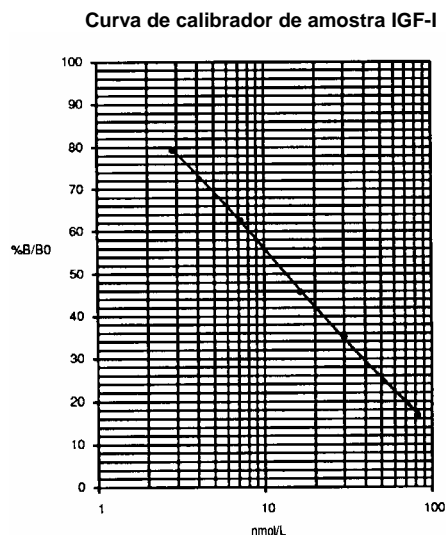
$$B/B_0 (\%) = \frac{\text{CPM do calibrador de amostra desconhecida} - \text{CPM de NSB}}{\text{CPM do calibrador 0} - \text{CPM de NSB}} \times 100$$

- 13.4** Usando 2 papéis de gráfico ciclo semi-log ou log-logit, plote a percentagem B/B<sub>0</sub> para os calibradores IGF-I (eixo vertical) versus a concentração (eixo horizontal).
- 13.5** Desenhe uma linha de melhor ajuste através dos pontos.
- 13.6** Interpole os níveis de IGF-I nas amostras desconhecidas a partir do gráfico.
- 13.7** Corrija para o volume de reconstituição apropriado. Por exemplo: Se foram extraídas 250 µL de soro e foram reconstituídas com 500 µL do calibrador 0, multiplique o valor interpolado da curva por 2. Se foram extraídas 250 µL de soro e foram reconstituídas com 1,0 mL de calibrador 0, multiplique o valor interpolado da curva por 4.
- 13.8** Calcule a ligação máxima dividindo a CPM do calibrador 0 pela média de contagens totais obtida nos tubos de contagem total.

**TABELA II**  
Dados de Amostra do IGF-I Sda DIASORIN

Tubo	Duplicado CPM	Média CPM	Corrigido CPM	% Limite (B/T)	% (B/B <sub>0</sub> )	Gráfico Conc. (nmol/L)	Final Conc. (nmol/L)
Total	10,830 10,991	10,991					
NSB	351 338	345		3,2			
Calibrador 0	4,060 4,055	4,058	3,713	37,2			
Calibradores (nmol/L)							
1 (2,9)	3,332 3,264	3,298	2,953		79,5		
2 (7,3)	2,852 2,683	2,673	2,328		62,7		
3 (16,4)	2,032 2,059	2,046	1,701		45,8		
4 (29,9)	1,685 1,634	1,660	1,315		35,4		
5 (82,5)	991 964	978	633		17,0		
Pacientes desconhecidos							
1	2,564 2,590	2,577	2,232		60,1	8,3	16,6
2	1,701 1,723	1,712	1,367		36,8	27,6	55,2

Os dados típicos da amostra e a curva do calibrador são apresentados na TABELA II e na FIGURA 1; esta curva serve apenas como referência e não deverá ser usada para o cálculo de qualquer valor.



**FIGURA 1**

#### **DADOS DE REDUÇÃO**

O Laboratório de controlo de qualidade da DiaSorin usa um ajuste de curva spline suave.

#### **14. LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO**

- 14.1** Qualquer amostra desconhecida que apresente uma leitura maior do que o calibrador kit mais alto deve ser apropriadamente diluída da coluna ODS-silica com o calibrador 0 e testada novamente. Corrija o resultado usando um factor de diluição apropriado.
- 14.2** Devem ser feitas contagens suficientes para evitar a introdução de erros devidos a erro estatístico na contagem (por exemplo, um acúmulo de 2,000 CPM levará a um erro de 5%; 10,000 CPM levará a um erro de 1%).
- 14.3** O IGF-I é elevado durante a gravidez e os valores aumentam com o tempo de gestação. São conhecidas outras condições que reduzem os níveis de IGF-I, incluindo um estado nutricional pobre, o jejum ou o hipotireoidismo. A hepatite pode também influenciar os níveis de IGF-I. No diagnóstico do hipopituitarismo, devem ser usados também testes provocados da hormona do crescimento humano quando os resultados de IGF-I são baixos. Um resultado de IGF-I normal é muito improvável no diagnóstico do hipopituitarismo ou o craniofaringioma. Nesta altura, não se conhece nenhum medicamento que interfira no ensaio de IGF-I.9

#### **15. VALORES ESPERADOS**

##### **Intervalo normal**

Os intervalos normais devem ser verificados por cada laboratório. No desenvolvimento do nosso ensaio de IGF-I, foram estudados um grande número de amostras normais (origem geográfica: Minnesota, Israel, Maryland e Austrália), e nós encontramos que os valores de IGF-I variam com a idade e em algumas faixas etárias com o sexo; portanto, os controlos emparelhados de idade e sexo devem ser usados onde apropriado. TABELA III e FIGURAS 2 e 3 apresentam os resultados de valores normais procedentes de vários laboratórios e reunidos pela DiaSorin. Por causa de haver uma distorção pronunciada da distribuição durante a puberdade, é necessário usar um modelo estatístico de transformação do registo para desenvolver uns limites de confiança de 95% em faixas de ajuste de crianças. Isto não é necessário para o tratamento de valores de adultos.



**TABELA III**  
Estudo de intervalo normal de acordo com a idade e o sexo

(anos)	Homem			Mulher		
	Média	(n)	Faixa*	Média	(n)	Faixa*
1 mo.-1,99	7,55	(16)	4,32-13,18	7,35	(12)	3,42-15,79
2,00-5,99	12,27	(17)	5,70-26,40	11,10	(12)	4,43-27,85
6,00-8,00	15,56	(15)	6,39-36,13	11,89	(13)	6,01-23,51
8,01-10,00	15,34	(13)	5,92-39,75	17,29	(11)	9,16-32,64
10,01-13,99	21,90	(24)	8,65-55,46	32,15	(14)	9,30-111,10
14,00-18,00	42,84	(15)	17,33-105,83	42,68	(15)	12,94-140,80
Adulto —	27,55	(36)	9,09-46,01	30,03	(41)	11,63-48,43

\*95% de limites de confiança em modelo de transformação de registo excepto para adultos.

(anos)	Homem			Mulher		
	Média	(n)	Faixa*	Média	(n)	Faixa*
1 mo.-1,99	0,30	(16)	0,17-0,53	0,29	(12)	0,14-0,63
2,00-5,99	0,49	(17)	0,23-1,06	0,44	(12)	0,17-1,11
6,00-8,00	0,62	(15)	0,26-1,44	0,48	(13)	0,24-0,94
8,01-10,00	0,61	(13)	0,24-1,59	0,69	(11)	0,37-1,31
10,01-13,99	0,88	(24)	0,35-2,22	1,28	(14)	0,37-4,44
14,00-18,00	1,71	(15)	0,69-4,23	1,71	(15)	0,52-5,63
Adulto —	1,10	(36)	0,36-1,84	1,20	(41)	0,47-1,94

\* 95% de limites de confiança em modelo de transformação de registo excepto para adultos.

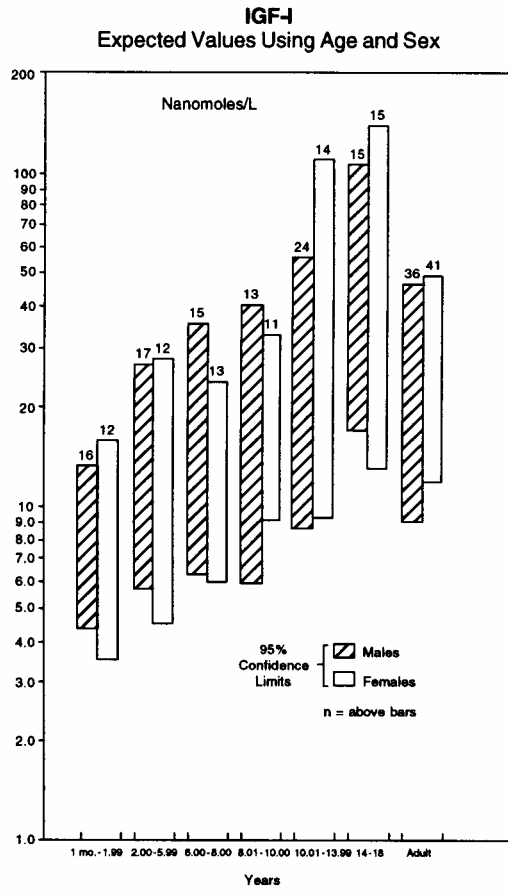


FIGURA 2

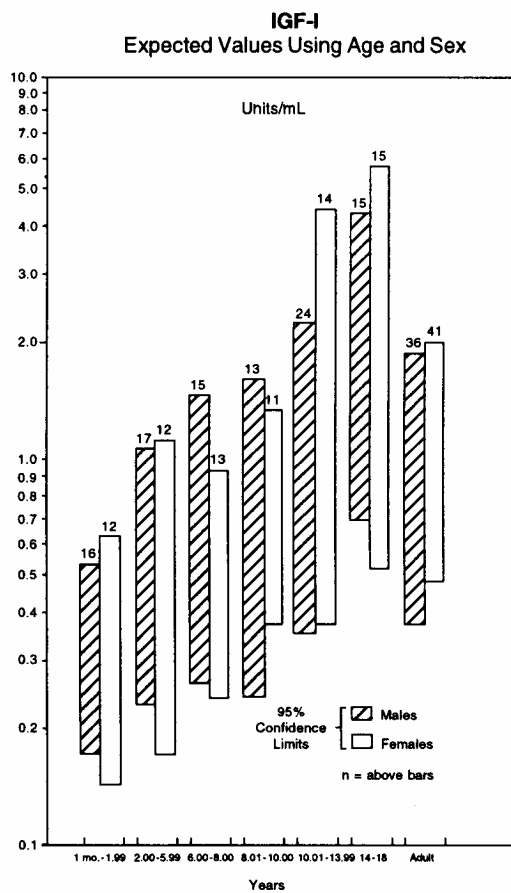


FIGURA 3

## 16. CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DE DESEMPENHO

### 16.1 Precisão

Varição intra ensaio (valores = nmol/L)

	Valor médio	Desvio padrão	% C.V.	n
Baixo	7,1	0,6	8,4	15
Médio	13,4	1,3	10,1	15
Alto	24,8	2,2	9,1	15

Varição intra ensaio (valores = nmol/L)

	Valor médio	Desvio padrão	% C.V.	n
Baixo	8,9	1,1	12,5	15
Médio	17,4	1,8	10,3	15
Alto	32,7	5,0	15,2	15

**16.2 PRECISÃO: A PRECISÃO DO ENSAIO FOI VERIFICADA ATRAVÉS DO TESTE DA LINEARIDADE E DO TESTE DE RECUPERAÇÃO.**

**Linearidade (Paralelismo)**

Estudo serial de diluição de 3 mostras desconhecidas (valores = nmol/L)

Número da amostra	Não diluído	1/2	1/4
1	21,8	26,5	29,6
2	29,2	28,2	26,4
3	37,5	34,3	37,0

**Recuperação**

Estudo de recuperação (valores = nmol/L). A percentagem de recuperação é calculada como valor medido ÷ valor esperado x 100.

Base	Calibrador adicionado	Valor esperado	Valor medido	Percentagem de recuperação
Conjunto No. 1				
15,7	1,2	16,9	16,9	100
15,7	3,4	19,1	18,3	96
15,7	7,7	23,4	24,6	106
Conjunto No. 2				
20,7	1,2	21,9	17,7	81
20,7	3,4	24,1	21,3	88
20,7	7,7	28,4	28,5	101

**16.3 Sensibilidade Analítica**

Quando definida como a concentração aparente em 3 desvios-padrão das contagens na ligação máxima, a quantidade mínima detectável é de <2,0 nmol/L.

**16.4 Especificidade Analítica**

A comparação da reactividade do anticorpo IGF-I no B/B<sub>0</sub> supressão de 50% foi feita com os seguintes peptídeos:

Peptídeo	% reactividade cruzada
IGF-II	<1,0
Hormona do crescimento humana	<1,0
Factor de crescimento de fibroblastos	<1,0
Factor de crescimento transformador	<1,0
Factor de crescimento derivado das plaquetas	<1,0

**CONSULTE A ÚLTIMA PÁGINA PARA OBTER REFERÊNCIAS**

## ESQUEMA DO ENSAIO

1. Reconstitua os reagentes liofilizados e deixe descongelar totalmente qualquer espécime congelado.
2. Extraia os controlos e amostras desconhecidas de acordo com a secção 9 da embalagem do produto.
3. Identifique dois tubos.
4. Despeje os reagentes de acordo com o seguinte esquema:

Tubos/Reagentes	Contagens totais	NSB	CAL 0-5	Controlos e amostras desconhecidas
Calibrador 0	-	50	50	-
Calibradores (1-5)	-	µL	µL	-
Controlos extraídos	-	-	50	50 µL
Amostras desconhecidas	-	-	µL	50 µL
extraídas	-	-	-	200 µL
Anti-soro	-	-	200 µL	-

5. Misture bem; incube durante 2 horas (+/- 15 minutos) a 2-8°C.
6. Despeje 200 µL do traçador em todos os poços.
7. Misture bem; incube durante 20 horas (+/- 1 hora) a 2-8°C.
8. Despeje 500 µL de complexo precipitante em todos os poços, excepto os tubos de contagem total.
9. Misture bem; incube durante 2 horas (+/- 15 minutos) a 2-8°C.
10. Centrifugue usando  $760 \times g^*$  durante 20 minutos.
11. Decante os sobrenadantes.
12. Conte cada tubo em um contador gama durante 60 segundos ou mais.

$$* g = (1118 \times 10^{-8}) (\text{raio em cm}) (\text{rpm})^2$$

## INSULINLIK TILLVÄXTFAKTOR I RIA KIT

### 1. AVSEDD ANVÄNDNING

FÖR DIAGNOSTISKT BRUK IN VITRO.

Satsen innehåller anvisningar och materiel för kvantitativ bestämning av IGF-I i humant serum med radioimmunoassay (RIA). Proceduren är avsedd att användas som en kompletterande metod för hGH-bestämning vid diagnos av hypopituitarism och akromegali.

### 2. SAMMANFATTNING OCH BESKRIVNING

Somatomedin C är en 70-aminosyrapeptid som ingår i en familj av tillväxtfaktorer, vilken omfattar de insulinlika tillväxtfaktorerna I och II, somatomedin A och B samt MSA. Strukturen hos somatomedin C har nyligen funnits vara identisk med IGF-I<sup>4</sup>, vars sekvens publicerades 1978 av Rinderknecht och Humbel.<sup>6</sup> Proinsulin och somatomedin är lika på så sätt att båda innehåller A- och B-peptider med en länkad C-peptid, och båda har interna disulfider. IGF-I är till sin natur mycket basisk genom dess aminosyrakomposition och cirkulerar bunden till proteiner med en hög molekylär vikt på cirka 140.000 dalton.

IGF-I förmedlar de tillväxtfrämjande funktionerna hos tillväxthormon. Ämnet frigörs från flera olika vävnader som svar på tillväxthormon och regleras av en återkopplingsmekanism som bildar en noggrant kontrollerad slinga mellan hypotalamus och hypofysen.<sup>8</sup>

Ålder och kön är två av de viktigaste faktorerna som, utöver tillväxthormon, påverkar IGF-I-koncentrationen i serumet. IGF-I-nivåerna är lägst vid födseln och ökar under spädbarnsålder och barndom. De högsta nivåerna nås under uppväxttiden (tonåren) och minskar långsamt under mogen ålder. Kvinnor uppvisar något högre IGF-I-nivåer än män under tonåren och vuxen ålder.<sup>1, 10</sup>

IGF-I-mätningar har rekommenderats som ett verktyg för undersökning av behandling av barn med tillväxthormonbrist.<sup>10</sup> Dess användning inom diagnostik, tillsammans med tillväxthormonmätningar<sup>8</sup>, eller som ett verktyg för att utvärdera barns svar på administrerat tillväxthormon<sup>4</sup> har gett proceduren en dominerande plats i endokrina laboratorier, särskilt vid behandling av tillväxtrubbningar.<sup>2, 7</sup>

IGF-I-mätningar är också användbara vid diagnostik och behandling av akromegali.<sup>5</sup> IGF-I-nivåerna gör det enklare att utvärdera resultaten efter bromokriptinbehandling av akromegali.<sup>9</sup>

### 3. ANALYSPRINCIP

DiaSorin IGF-I RIA är en dubblerad antikropp-obalansassay som innefattar en procedur för extraktion av ODS-kiselsyra (oktadekasilyl-kiselsyra) för serumprover. Efter extraktionen utförs RIA med prover och anti-IGF-I från kanin, följt av 2 timmars inkubation vid 2-8°C. Därefter tillsätts jod-125 IGF-I, följt av en andra inkubation i 20 timmar vid 2-8°C. Förutfärd bärare, en andra antikropp och polyetylen glykol tillsätts i ett enda steg. Efter två timmars inkubation vid 2-8°C av den andra antikroppen centrifugeras och dekanteras assayrören. IGF-I från många andra däggdjur kan också mätas med denna metod.

### 4. REAGENSER I FÖRPACKNINGEN

IgF-1 kalibreringslösning 0	1 flaska à 20 mL
IgF-1 kalibreringslösningar 1-5	5 flaskor à 0,5 mL
IgF-1 antiserum	1 flaska à 14 mL
<sup>125</sup> I IgF-1 spårämne	1 flaska à 14 mL
IgF-1 kontroller	2 flaskor à 1,0 mL
IgF-1 utfällningskomplex	1 flaska à 35 mL
ODS-kiselsyra	1 förpackning/25 kolonner
Antal test	65

FÖRVARING: Öppnad förpackning förvaras vid högst -15°C. Efter rekonstituering förvaras varje reagens vid högst -15°C till det utgångsdatum som anges på etiketten. Reagenserna får ej användas efter utgångsdatum.

När man rekonstituerar innehållet i flaskorna måste man blanda försiktigt för att undvika skumbildning. Reagens från skilda batcher får ej blandas.

#### 4.1 IGF-I kalibreringslösning 0: frystorkad reagens

BSA-boratbufferten innehåller 0,25% natriumazid som konserveringsmedel. Rekonstituera flaskans innehåll med 20 mL renat vatten och låt stå 15 -20 minuter tills innehållet är fullständigt upplöst. Blanda noga före användning.

#### 4.2 IGF-I kalibreringslösningar (1-5): frystorkade reagenser

Fem humanintakta IGF-I kalibreringslösningar med nominella koncentrationer på 3,0-75 nmol/L (0,12- 3,0 enheter/mL), färdigspädda i BSA-boratbuffert innehållande 0,1% natriumazid som konserveringsmedel. Exakta värden anges för varje batch. Rekonstituera innehållet i varje flaska med 0,5 mL renat vatten och låt flaskorna stå 15 - 20 minuter tills innehållet är fullständigt upplöst. Blanda noga före användning. DiaSorins IGF-I kalibreringslösningar har kalibrerats mot WHO:s standard NBSB 87/518. Alla jämförelser med andra produkter eller metoder skall ske med denna referensstandard som utgångspunkt. För att approximera enheterna som används av många kommersiella laboratorier anges värdet 25 nmol/L som likvärdigt med 1 enhet/mL. Nanomol/liter IGF-I omvandlas till ng/mL genom att multiplicera med 7,7. Kalibreringslösningarna i satsen kan betraktas som likvärdiga med patientprover när de används med de reagenser och metoder som rekommenderas för detta diagnostiska in vitro-test.

#### 4.3 IGF-I antiserum: frystorkad reagens

Kanin serum mot IGF-I spätt med BSA-boratbuffert med heparin innehållande 0,002% timerosal. Rekonstituera flaskans innehåll med 14 mL renat vatten och låt stå 15 - 20 minuter tills innehållet är fullständigt upplöst. Blanda noga före användning.

#### 4.4 <sup>125</sup>I IGF-I: frystorkad reagens

Humant syntetiskt IGF-I (53-70) märkt med jod-125 och upplöst i BSA-borat-EDTA-buffert innehållande 0,008% timerosal som konserveringsmedel. Rekonstituera flaskans innehåll med 14 mL renat vatten och låt stå 15 - 20 minuter tills innehållet är fullständigt upplöst. Blanda noga före användning.

#### 4.5 IGF-I kontroller (nivå 1 och 2): frystorkade reagenser

Humant serum med tillsats (vid behov) av lämplig mängd intakt humant IGF-I för att er hålla en halt inom det angivna området. Med tillsats av 0,02% natriumazid som konserveringsmedel. Rekonstituera innehållet i varje flaska med 1,0 mL renat vatten och låt stå 15 - 20 minuter tills innehållet är fullständigt upplöst. Blanda noga och behandla kvalitetskontroller serumet som ett okänt prov. Haltintervallet anges på flaskorna med kontrollen.

#### 4.6 IGF-I utfällningskomplex: frystorkad reagens

Normalt kanin serum förfutfällt med antikanin serum från get och polyetylenglykol (PEG), spätt med BSA-boratbuffert med tillsats av 0,03% timerosal. Rekonstituera flaskans innehåll med 35 mL renat vatten. Blanda NOGA tills suspensionen ser homogen ut och låt den sedan stå minst 30 minuter i rumstemperatur. Blanda då och då.

#### 4.7 ODS-kiselsyra: reagens färdig för användning

Plastkolonner innehållande oktadekasil-kiselsyra (Sep-Paks). Kolonnerna måste "primas" innan proverna appliceras (se avsnittet om extraktion). Kolonnerna med ODS-kiselsyra kan förvaras i rumstemperatur. Kolonnerna är stabila i 3 år i öppnad förpackning och under obegränsad tid i oöppnad förpackning.

### 5. VARNINGAR OCH FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER

#### FÖR DIAGNOSTISKT BRUK *IN VITRO*.

Ej avsett för vare sig invärtes eller utvärtes bruk på människor eller djur. Proceduren skall användas som en kompletterande metod vid hGH-bestämning för diagnos av hypopituitarism och akromegali.

#### **REAGENSER SOM INNEHÅLLER MATERIAL AV HUMANT URSPRUNG, skall behandlas som potentiellt smittfarliga.**

Varje donerad enhet serum/plasma som använts för beredning av produkten har testats med en metod godkänd av USA:s läkemedelsverk (FDA) och befunnits negativ vad gäller förekomst av HBsAg, antikroppar mot HCV och antikroppar mot HIV 1/2. Även om dessa metoder är mycket tillförlitliga utgör de ingen garanti för att samtliga infekterade enheter upptäcks. Produkten kan även innehålla annat material av humant ursprung för vilket det inte finns något godkänt test. Eftersom ingen känd testmetod kan ge en fullständig garanti för att det inte förekommer hepatit-B-virus (HBV), hepatit-C-virus (HCV), humant immunbristvirus (HIV) eller andra infektiösa agenser, skall alla produkter som innehåller material av humant ursprung hanteras i enlighet med god laboratoriepraxis och med lämpliga försiktighetsåtgärder. Se handboken "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories" från U.S. Centers for Disease Control and Prevention/National Institutes of Health, 4:e upplagan, maj 1999, eller aktuell upplaga.

### REAGENSER SOM INNEHÅLLER NATRIUMAZID

**FÖRSIKTIGT!** Vissa reagenser i satsen innehåller natriumazid. Natriumazid kan reagera med bly och koppar i avloppsledningar och bilda högexplosiva metallazider. När reagensen kasseras måste man efterspola med stora mängder vatten för att förhindra att azid ackumuleras. För mer information hänvisas till avsnittet "Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts" i handboken "Safety Management No. CDC-22" utgiven av Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, USA, 1976.

#### Europeiska Gemenskapens Riskfraser för farliga preparat (EG-direktiv 1999/45/EEC)

R20/21/22 - Farligt vid inandning, hudkontakt och förtäring.

R32 - Utvecklar mycket giftig gas vid kontakt med syra.

S28 - Vid kontakt med huden, tvätta genast med mycket vatten.

### REAGENSER SOM INNEHÅLLER TIMEROSAL

Vissa reagenser i satsen innehåller timerosal som innehåller en kvicksilverförening. Kassering av ren kvicksilver, oorganisk kvicksilver, kvicksilveroxider och kvicksilverföreningar skall ske enligt gällande lokala och nationella bestämmelser.

**WARNING:** Produkten innehåller en kemikalie som enligt staten Kalifornien är känd för att orsaka medfödda missbildningar eller andra reproduktionsrelaterade skador.

### REAGENSER SOM INNEHÅLLER JOD-125

Satsen innehåller radioaktivt material som ej överstiger 2  $\mu\text{Ci}$  (74 kBq) jod-125. Adekvata försiktighetsåtgärder måste vidtas och god laboratoriepraxis följas vid förvaring, hantering och kassering av detta material.

För mottagningar och institutioner som tar emot radioisotoper under en allmän licens:

Detta radioaktiva material får endast tas emot, förvärvas, ägas och användas av läkare, veterinärer med praktik inom veterinärmedicin, kliniska laboratorier eller sjukhus, och får endast användas för kliniska tester in vitro eller laborietester in vitro, vilka ej innebär någon invärtes eller utvärtes administrering av materialet, eller av strålning från det, till människor eller djur. För mottagande, förvärv, innehav, användning och överlåtelse gäller de regler och den allmänna licens som utfärdats av den amerikanska Nuclear Regulatory Commission eller av den stat med vilken kommissionen har ingått ett avtal för utövande av regulatorisk myndighet.

1. Radioaktivt material får endast förvaras på en speciellt avsedd plats.
2. Endast auktoriserad personal får ha tillgång till radioaktivt material.
3. Pipettera aldrig radioaktivt material med munnen.
4. Undvik att äta eller dricka i lokaler där radioaktivt material används.
5. Ytor där spill kan förekomma skall torkas av och därefter rengöras med ett alkaliskt rengöringsmedel eller en radiologisk dekontamineringslösning. Alla glasvaror som används måste sköljas noga med vatten innan de diskas tillsammans med andra glasvaror för laboratoriebruk.

För mottagningar och institutioner som tar emot radioisotoper under en specifik licens:

När ni tar emot, använder, överlåter och kasserar radioaktivt material gäller reglerna och villkoren i er specifika licens.

**WARNING!** Produkten innehåller en kemikalie som enligt staten Kalifornien är känd för att orsaka cancer.

**OBSERVERA!** Den radioaktivitet som anges på bipacksedeln kan skilja sig något från den aktivitet som anges på etiketterna på kartongen och på flaskan med spårämnet. Etiketterna på kartongen och på flaskan med spårämnet anger den verkliga radioaktivitetsmängden vid kalibreringsdatum, medan bipacksedeln anger den teoretiska radioaktiviteten för satsen.

## 6. TECKEN SOM KAN TYDA PÅ EN KVALITETSFÖRSÅMRING HOS

### REAGENSERNA I SATSEN

- 6.1 Förekomst av onormalt partikelformigt material i någon av reagenserna.
- 6.2 En förändring av kalibreringskurvans läge eller lutning jämfört med vad som normalt erhålles.
- 6.3 En sänkning av maximal bindning.
- 6.4 En hög ospecifik bindning.



## 7. PROVTAGNING OCH PROVHANTERING

Det krävs 250 µL serum för en assay.

Ta blodprov genom venpunktion med ett 5 eller 10 mL glasrör av vacutainertyp. Låt blodet koagulera i rumstemperatur. Centrifugera i 15 minuter vid 760 x g\* så att hemolysfria serumprover erhålles. Inga tillsatser eller konserveringsmedel behövs för att bibehålla intakta prover. Alla plastartiklar, glasvaror och annan materiel som kommer i kontakt med provet måste vara helt fria från kontaminerande material.

EDTA eller hepariniserad plasma kan ge något lägre resultat.

Serumet skall genast separeras från cellerna och förvaras vid högst -15°C. Vid långtidsförvaring skall proverna hållas frysta vid högst -15°C. Proverna kan frysas och tinas flera gånger.

## 8. NÖDVÄNDIG UTRUSTNING OCH MATERIEL SOM EJ MEDFÖLJER

- 8.1 Borosilikatrör för engångsbruk, 12 x 75 mm.
- 8.2 Temperaturreglerad centrifug som passar för 12 x 75 mm rör.
- 8.3 Gammaräknare som kan räkna jod-125.
- 8.4 Vortex.
- 8.5 Pipetteringshjälpmedel:
  - a. Mikropipetter kalibrerade för 50, 250, och 500 µL.
  - b. Repeterande dispenserer kalibrerade för 200 och 500 µL.

### Material och reagenser som behövs för extraktion i kolonner med ODS-kiselsyra

- 8.6 12 mL sprutor för engångsbruk.
- 8.7 Isopropylalkohol.
- 8.8 Metanol, HPLC-klassad eller bättre.
- 8.9 4% ättiksyra.
- 8.10 0,5 N saltsyra.
- 8.11 Tryckluft.
- 8.12 37°C vattenbad.
- 8.13 16 x 100 mm glasrör.

## 9. EXTRAKTION AV SERUM I KOLONNER MED ODS-KISELSYRA

- 9.1 Pipettera 250 µL kontroller och okända prover i ett 12 x 75 mm glasprovrör och tillsätt 1 mL 0,5 N HCl. Vortexa försiktigt så att innehållet blandas väl.
- 9.2 Aptera varje kolonn med ODS-kiselsyra på en spruta.
- 9.3 Tillsätt 5 mL reagensklassad isopropylalkohol till varje spruta.
- 9.4 Tryck innehållet genom sprutan med sprutkolven.
- 9.5 Avlägsna kolonnen med ODS-kiselsyra. Avlägsna kolonnen från sprutan innan kolven tas bort, detta för att inte kontaminera sprutans innehåll med vätska från kolonnen.
- 9.6 Avlägsna kolvarna från sprutorna.
- 9.7 Sätt tillbaka kolonnerna med ODS-kiselsyra på sprutorna.
- 9.8 Tillsätt 5 mL HPLC-klassad metanol.
- 9.9 Upprepa steg 4 - 7.
- 9.10 Tillsätt 5 mL 4% ättiksyra.
- 9.11 Upprepa steg 4 - 7.
- 9.12 Upprepa steg 10 och 11.
- 9.13 Applicera provet från steg 1. Tryck långsamt genom patronen med en flödes hastighet på 1 mL per 2-3 minuter.
- 9.14 Upprepa steg 5 - 7.
- 9.15 Tvätta kolonnen med ODS-kiselsyra två gånger med 10 mL 4% ättiksyra och upprepa steg 5 , 6 och 7 mellan tvättningarna.

$$*g = (1118 \times 10^{-8}) (\text{radie i cm}) (\text{rpm})^2$$

- 9.16** Samla upp eluatet i 16 x 100 mm glasrör genom att späda peptiden med 4 mL HPLC-klassad metanol. Tryck långsamt så att metanolen har kontinuerlig kontakt med kolonnen med ODS-kiselsyra i minst 3 minuter.
- 9.17** Indunsta metanolen så att den torkar i ett 37°C vattenbad med hjälp av tryckluft eller kväve.
- 9.18** Rekonstituera de torkade proverna med 500 µL 0-kalibreringslösning och inkubera vid 37°C i 10 minuter för att säkerställa en fullständig rekonstitution (vortexa då och då under inkubationen). Ett prov som förväntas vara förhöjt skall här rekonstrueras med 1,0 mL av kalibreringslösning 0. Det slutliga resultatet skall korrigeras med lämplig spädningsfaktor (se avsnittet Resultatberäkning).
- 9.19** Testa ett dubbelprov av 50 µL serumextrakt i radioimmunoassayen.

## 10. TESTPROCEDUR

- 10.1** Rekonstituera de frystorkade reagenserna och låt frysta reagenser tina fullständigt. Se till att reagenserna ej blir varmare än 20-25°C. Blanda alla reagenser försiktigt före användning.
- 10.2** Ställ i ordning märkta 12 x 75 mm rör för dubbelprov enligt "Lathund för testet" på sista sidan. Alla volymer är i mikroliter.
- 10.3** Tillsätt reagens till rören enligt följande:
- Totalaktivitetsrör**  
Ställ undan dessa fram till steg 5.
  - Ospecifik bindning (NSB)**  
50 µL kalibreringslösning 0.
  - IGF-I kalibreringslösning 0**  
50 µL kalibreringslösning 0.  
200 µL IGF-I antiserum.
  - IGF-I kalibreringslösningar (1-5)**  
50 µL IGF-I kalibreringslösning.  
200 µL IGF-I antiserum.
  - Kontroller och okända prover**  
50 µL serumextrakt.  
200 µL IGF-I antiserum.
- 10.4** Inkubera i 2 timmar (±15 minuter) vid 2-8°C.
- 10.5** Tillsätt 200 µL 125I IGF-I i alla rör.
- 10.6** Vortexa rören försiktigt utan att det bildas skum och inkubera dem i 20 timmar (±1 timme) vid 2-8°C.
- 10.7** Skaka utfällningskomplexet kraftigt och pipettera 500 µL till alla rör utom totalaktivitetsrören.
- 10.8** Vortexa rören försiktigt utan att det bildas skum och inkubera dem i 2 timmar (±15 minuter) vid 2-8°C.
- 10.9** Centrifugera rören i 20 minuter vid minst 760 x g\* vid 20-25°C.
- 10.10** Dekantera genast supernatanten från alla rör utom totalaktivitetsrören genom att vända dem upp-och-ned i minst 2 minuter. Håll rören mot absorberande papper för att få bort eventuella supernatandroppar från kanterna innan du vänder rören rätt igen.
- 10.11** Använd gammaräknare och räkna fällningen i varje rör samt totalaktivitetsrören under tillräckligt lång tid för att säkerställa statistisk noggrannhet (se avsnittet Metodbegränsningar).

## 11. KOMMENTARER TILL PROCEDURERNA

- 11.1** Tillsätt alla reagens till den nedersta tredjedelen av provröret så att reagenserna kan blandas fullständigt.
- 11.2** Engångsrör från vissa tillverkare ger en förhöjd ospecifik bindning.
- 11.3** Om du väljer att suga bort supernatanten från fällningen måste du vara försiktig så att du inte rör upp fällningen.

$$*g = (1118 \times 10^{-8}) (\text{radie i cm}) (\text{rpm})^2$$

**11.4** För att bekräfta att ett RIA-test ger konsekventa resultat kan man kontrollera ett antal andra faktorer. DiaSorin rekommenderar att man regelbundet kontrollerar följande parametrar för att vara säker på att satsen ger konsekventa resultat:

**a. Totalaktivitet**

**b. Maximal bindning**

Medelvärde av antal knäpp per minut (CPM) för röret med 0-lösning / CPM-medelvärdet för totalaktivetsrören.

**c. Ospezifisk bindning**

CPM-medelvärdet för NSB-röret / CPM-medelvärdet för totalaktivetsrören.

**d. Kalibreringskurvans lutning**

Följ exempelvis kalibreringskurvans punkter för 80, 50 och 20% hämning.

**12. KVALITETSKONTROLL**

Alla laboratorier skall ta med minst två kontroller vid varje assay för att garantera att resultaten är korrekta. Man bör fastställa ett medelvärde och en standardavvikelse för varje kontroll genom att köra den i minst tio test. Man kan få fram ett godkänt område för kontrollerna genom att använda  $\pm 2$  standardavvikelser för de tidigare uppmätta värdena. DiaSorin Quality Control Laboratory har bestämt ett intervall för kontrollerna i satsen.

**13. RESULTATBERÄKNING**

Det finns många olika metoder för att beräkna resultaten från RIA-test. Alla är baserade på att man tar fram en kalibreringskurva genom att plotta bindningsgraden mot de angivna koncentrationerna hos kalibreringslösningarna. Diagrammet kan ha antingen linjär eller logaritmisk skala.

Samtliga metoder ger i stort sett samma värden för kontroller och prover, även om en viss beräkningsmetod kan passa bättre för vissa assayer än för andra. Den beräkningsmetod som används på DiaSorins kvalitetskontrolllaboratorium är % B/B<sub>0</sub> avsatt mot logaritmen för koncentrationen.

**13.1** Beräkna medel-CPM för varje kalibreringslösning, kontroll och okänt prov.

**13.2** Subtrahera medel-CPM för NSB-rören från alla värden.

**13.3** Dividera det korrigerade CPM-värdet för varje kalibreringslösning, kontroll och okänt prov med det korrigerade CPM-värdet för 0-lösningen.

$$B/B_0 (\%) = \frac{\text{CPM för kalibreringslösning eller okänt prov} - \text{CPM för NSB}}{\text{CPM för kalibreringslösning 0} - \text{CPM för NSB}} \times 100$$

**13.4** Använd ett lin-log-papper över två tiopotenser eller log-log-papper och plotta procent B/B<sub>0</sub> för IGF-I-kalibreringslösningarna (lodrät axel) mot koncentrationen (vågrät axel).

**13.5** Rita en bästa anpassad linje genom punkterna.

**13.6** Avläs IGF-I-halterna i de okända proverna från diagrammet.

**13.7** Korrigera till lämplig rekonstitutionsvolym. Exempel: Om 250  $\mu$ L serum har extraherats och rekonstituerats med 500  $\mu$ L 0-lösning, multiplicera det avlästa värdet i kurvan med 2. Om 250  $\mu$ L serum har extraherats och rekonstituerats med 1,0 mL 0-lösning, multiplicera det avlästa värdet i kurvan med 4.

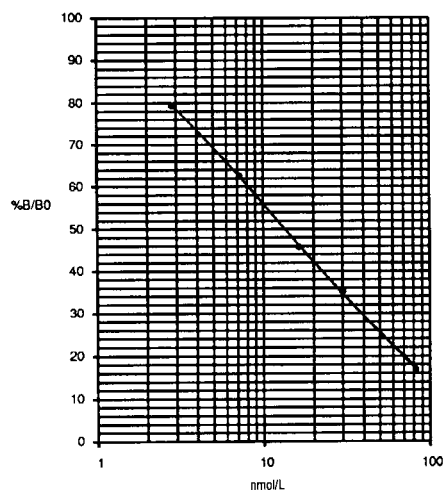
**13.8** Beräkna maximal bindning genom att dividera CPM för 0-lösningen med medelvärdet för totalaktivetsrören.

**TABELL II**  
DiaSorin IGF-I ProvData

Rör	Dubbelprov CPM	Medel- CPM	Korrigerad CPM	% Bunden (B/T)	% (B/B <sub>0</sub> )	Diagram konc. (nmol/L)	Slutlig konc. (nmol/L)
Total	10,830 10,991	10,991					
NSB	351 338	345		3,2			
Kalibreringslösning	04,060 4,055	4,058	3,713	37,2			
Kalibreringslösningar 1-5 (nmol/L)							
1 (2,9)	3,332 3,264	3,298	2,953		79,5		
2 (7,3)	2,852 2,683	2,673	2,328		62,7		
3 (16,4)	2,032 2,059	2,046	1,701		45,8		
4 (29,9)	1,685 1,634	1,660	1,315		35,4		
5 (82,5)	991 964	978	633		17,0		
Patient okända							
1	2,564 2,590	2,577	2,232		60,1	8,3	16,6
2	1,701 1,723	1,712	1,367		36,8	27,6	55,2

Typiska provdata och en kalibreringskurva visas i tabell II och figur 1. Denna kurva är endast avsedd som ett exempel och skall inte användas för att beräkna några värden.

**IGF-I EXEMPEL PÅ KALIBRERINGSKURVA**



**Figur 1**

**DATAREDUKTION**

DiaSorins kvalitetskontrolllaboratorium använder en mjuk anpassning till spline-funktioner.

#### 14. METODBEGRÄNSNINGAR

- 14.1** Varje okänt prov som ger ett högre värde än den högsta kalibreringslösningen skall spädas på lämpligt sätt från kolonnen med ODS-kiselsyraextrakt med kalibreringslösning 0 och därefter testas på nytt. Korrigera resultatet med lämplig spädningsfaktor.
- 14.2** Aktiviteten i rören måste räknas under tillräckligt lång tid för att man ska kunna undvika statistiska fel (till exempel ger en räkning av 2.000 CPM ett fel på 5% medan 10 000 CPM ger ett fel på 1%).
- 14.3** IGF-I förhöjs vid graviditet och ökar med graviditetens längd. Andra tillstånd är kända för att reducera nivåerna av IGF-I, däribland bristfällig näringsstatus, fastande och hypotyroidism. Även hepatit kan påverka IGF-I-nivåerna. Vid diagnos av hypopituitarism bör också provokationstest för humant tillväxthormon användas när IGF-I-resultaten är låga. Ett normalt IGF-I-resultat är mycket osannolikt vid diagnos av hypopituitarism utom för hyperprolaktinemi eller kraniofaryngiom. Inga läkemedel har i skrivande stund funnits interferera med IGF-I-assayen.<sup>9</sup>

#### 15. FÖRVÄNTADE VÄRDEN

##### Referensområde

Normala områden bör fastställas av varje laboratorium. Ett stort antal prover (geografiskt ursprung: Minnesota, Israel, Maryland och Australien) har studerats under utvecklingen av vår IGF-I-assay och vi har funnit att IGF-I-värden varierar med ålder och inom vissa åldergrupper med kön. När så är lämpligt bör därför matchande kontroller med hänsyn till ålder och kön användas. Tabell III och figur 2 och 3 visar resultaten av normala värden som insamlats av DiaSorin från flera laboratorier. Eftersom det föreligger en uttalad obalans i distributionen under puberteten är det nödvändigt att använda en logaritmisk statistisk omvandlingsmodell för att utveckla 95-procentiga konfidensgränser för fastställning av områden för barn. Detta är ej nödvändigt med värden för vuxna.

**TABELL III**  
Studie av referensområden efter ålder och kön  
**Nanomol/L**

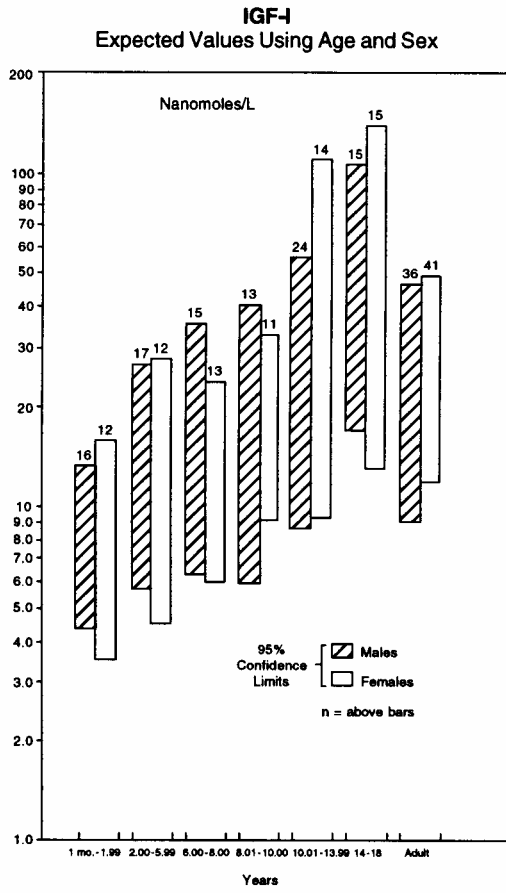
Åldersgrupp (år)	Man			Kvinna		
	Medelv ärde	(n)	Område*	Medelv ärde	(n)	Område*
1 mån-1,99	7,55	(16)	4,32-13,18	7,35	(12)	3,42-15,79
2,00-5,99	12,27	(17)	5,70-26,40	11,10	(12)	4,43-27,85
6,00-8,00	15,56	(15)	6,39-36,13	11,89	(13)	6,01-23,51
8,01-10,00	15,34	(13)	5,92-39,75	17,29	(11)	9,16-32,64
10,01-13,99	21,90	(24)	8,65-55,46	32,15	(14)	9,30-111,10
14,00-18,00	42,84	(15)	17,33-105,83	42,68	(15)	12,94-140,80
Vuxna —	27,55	(36)	9,09-46,01	30,03	(41)	11,63-48,43

\* Logaritmisk omvandlingstabell med 95-procentiga konfidensgränser (ej för vuxna).

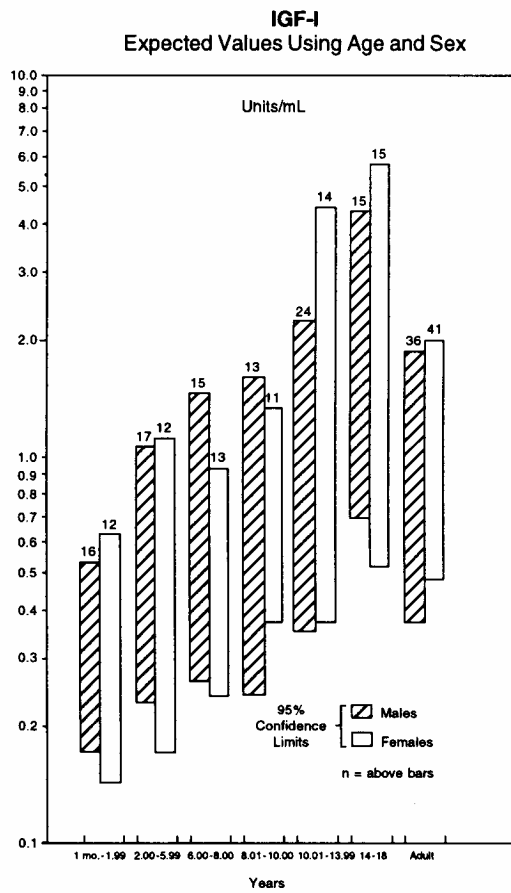
##### Enheter/mL

Åldersgrupp (år)	Man			Kvinna		
	Medelv ärde	(n)	Område*	Medelv ärde	(n)	Område*
1 mån-1,99	0,30	(16)	0,17-0,53	0,29	(12)	0,14-0,63
2,00-5,99	0,49	(17)	0,23-1,06	0,44	(12)	0,17-1,11
6,00-8,00	0,62	(15)	0,26-1,44	0,48	(13)	0,24-0,94
8,01-10,00	0,61	(13)	0,24-1,59	0,69	(11)	0,37-1,31
10,01-13,99	0,88	(24)	0,35-2,22	1,28	(14)	0,37-4,44
14,00-18,00	1,71	(15)	0,69-4,23	1,71	(15)	0,52-5,63
Vuxna —	1,10	(36)	0,36-1,84	1,20	(41)	0,47-1,94

\* Logaritmisk omvandlingstabell med 95-procentiga konfidensgränser (ej för vuxna).



FIGUR 2



FIGUR 3

## 16. SPECIFIKA PRESTANDA

### 16.1 Precision

Variation inom serier (värden = nmol/L)

	Medelvärde	S.D	(% C.V.)	n
Låg	7,1	0,6	8,4	15
Medel	13,4	1,3	10,1	15
Hög	24,8	2,2	9,1	15

Variation mellan serier (värden = nmol/L)

	Medelvärde	S.D	(% C.V.)	n
Låg	8,9	1,1	12,5	15
Medel	17,4	1,8	10,3	15
Hög	32,7	5,0	15,2	15

## 16.2 RIKTIGHET: RIKTIGHETEN FÖR ASSAYEN HAR KONTROLLERATS GENOM ETT LINEARITETSTEST OCH ETT UTBYTESTEST.

### Linearitet (parallelitet)

Seriespänningsstudie av 3 okända prover (värden = nmol/L)

Prov nummer	Outspätt	1/2	1/4
1	21,8	26,5	29,6
2	29,2	28,2	26,4
3	37,5	34,3	37,0

### Utbyte

Utbytesstudie (värden = nmol/L). Det procentuella utbytet beräknas som uppmätt värde ÷ förväntat värde x 100.

Bakgrund	Tillsatt kalibreringslösning	Förväntat värde	Uppmätt värde	Procent utbyte
Uppsättning 1				
15,7	1,2	16,9	16,9	100
15,7	3,4	19,1	18,3	96
15,7	7,7	23,4	24,6	106
Uppsättning 2				
20,7	1,2	21,9	17,7	81
20,7	3,4	24,1	21,3	88
20,7	7,7	28,4	28,5	101

## 16.3 Analytisk Känslighet

När den lägsta detekterbara halten definieras som den skenbara halten vid tre standardavvikelser från aktiviteten för maximal bindning ligger den på <2,0 nmol/L.

## 16.4 Analytisk Specificitet

Jämförelse av korsreaktiviteten hos IGF-I-antikropp vid 50% hämning B/B<sub>0</sub> utfördes med följande peptider:

Peptid	% korsreaktivitet
IGF-II	<1,0
Humant tillväxthormon	<1,0
Fibroblasttillväxtfaktor	<1,0
Transformerande tillväxtfaktor	<1,0
Trombocytrelaterad tillväxtfaktor	<1,0

**SE SISTA SIDAN FÖR REFERENSER**



## LATHUND FÖR TESTET

1. Rekonstituera de frystorkade reagenserna och låt eventuella frysta prover tina helt.
2. Extrahera kontrollerna och de okända proverna enligt avsnitt 9.
3. Märk upp rör för dubbelprover.
4. Pipettera reagens enligt följande schema:

Rör/Reagens	Totalaktivitet	NSB	CAL 0-5	Kontroller och okända prover
Kalibreringslösning 0	-	50 µL	50 µL	-
Kalibreringslösningar (1-5)	-	-	50 µL	-
Extraherade kontroller	-	-	-	50 µL
Extraherade okända prover	-	-	-	50 µL
Antiserum			200 µL	200 µL

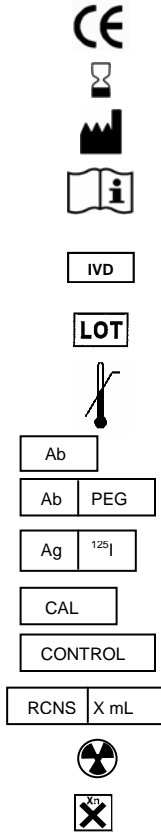
5. Blanda väl och inkubera rören i 2 timmar (+/- 15 minuter) vid 2-8°C.
6. Tillsätt 200 µL spårämne i varje rör.
7. Blanda väl och inkubera rören i 20 timmar (+/- 1 timme) vid 2-8°C.
8. Tillsätt 500 µL utfällningskomplex i varje rör, utom i totalaktivetsrören.
9. Blanda väl och inkubera rören i 2 timmar (+/- 15 minuter) vid 2-8°C.
10. Centrifugera vid  $760 \times g^*$  i 20 minuter.
11. Häll av supernatanterna.
12. Räkna varje rör i en gammarräknare i minst 60 sekunder.

$$*g = (1118 \times 10^{-8}) (\text{radie i cm}) (\text{rpm})^2$$

#### REFERENCES/BIBLOGRAPHIE/LITERATUR/REFERÊNCIAS/REFERENSER

1. Bala, R.M., J. Lopatka, A. Leung, E. McCoy and R.G. McArthur, "Serum Immuno-reactive Somatomedin Levels in Normal Adults, Pregnant Women at Term, Children at Various Ages and Children with Constitutionally Delayed Growth," **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, 52(3):508, (1981).
2. Borges, J.L., M.C. Gelato, A.D. Rogol, M.L. Vance, R.M. Macleod, D.L. Loriaux, J. Rivier, R.M. Blizzard, R.F. Furlanetto, W.S. Evans, D.L. Kaiser, G.R. Merriam, J. Speiss and W. Vale, "Effects of Human Pancreatic Tumor Growth Hormone Releasing Factor on Growth Hormone and Somatomedin C Levels in Patients with Idiopathic Growth Hormone Deficiency," **The Lancet**, 199, July, (1983).
3. Hayek, A. and G.T. Peake, "Growth and Somatomedin-C Responses to Growth Hormone in Dwarfed Children," **The Journal of Pediatrics**, 99(6):868, (1981).
4. Klapper, D.V., M.E. Svoboda and J.J. Van Wyk, "Sequence Analysis of Somatomedin-C: Confirmation of Identity with Insulin-Like Growth Factor I," **Endocrinology**, 112(6):2215, (1983).
5. Rieu, M., F. Girard, H. Bricaire and M. Binoux, "The Importance of Insulin-Like Growth Factor (Somatomedin) Measurements in the Diagnosis and Surveillance of Acromegaly," **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, 55(1):147, (1982).
6. Rinderknecht, E. and R.E. Humbel, "The Amino Acid Sequence of Human Insulin-like Growth Factor I and Its Structural Homology with Proinsulin," **The Journal of Biological Chemistry**, 253(8):2769, (1978).
7. Rosenfeld, R.G., S.F. Kemp and R.L. Hintz, "Constancy of Somatomedin Response to Growth Hormone Treatment of Hypopituitary Dwarfism and Lack of Correlation with Growth Rates," **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, 53:611, (1981).
8. Underwood, L.E., A.J. D'Ercole and J.J. Van Wyk, "Somatomedin-C and the Assessment of Growth," **Pediatric Clinics of North America**, 27:771, (1980).
9. Wass, J.A.H., D.R. Clemmons, L.E. Underwood, I. Barrow, G.M. Besser and J.J. Van Wyk, "Changes in Circulating Somatomedin-C Levels in Bromocriptine-Treated Acromegaly," **Clinical Endocrinology**, 17:369, (1982).
10. Wilson, D.M., A.M. Luna, R.L. Hintz and R.G. Rosenfeld, "Somatomedins in Adolescence: The Effect of Puberty on Plasma Levels of Insulin-Like Factors I and II," **Clinical Research**, 31(1):61A, (1983).

### SYMBOLS USED WITH DEVICES



English	Français	Deutsch	Português	Svenska
European Conformity	Conformité aux normes européennes	CE – Konformitätskennzeichnung	Conformidade com as normas europeias	Europeisk överensstämmelse
Expiration Date	Date limite d'utilisation	Mindesthaltbarkeitsdatum	Prazo de validade	Utgångsdatum
Manufacturer	Fabricant	Hersteller	Fabricante	Tilverkare
Consult Instructions for Use	Consulter les instructions d'utilisation	Gebrauchsanweisung beachten	Consulte as instruções de utilização	Se bruksanvisningen
In vitro diagnostic.	Diagnostic in vitro.	In-vitro-Diagnostikum.	Diagnóstico in vitro.	Diagnostik in vitro.
Lot No.	No. de lot	Chargen-Nr.	N.º do lote	Batch-nummer
Maximum temperature	Température maximale	Höchsttemperatur	Temperatura máxima	Max. temperatur
Ab	Antisérum	Antiserum	Anti-soro	Antiserum
Ab PEG	Réactif précipitant	Fällungsreagenz	Precipitado no reagente	Utfällningsreagens
Ag <sup>125</sup> I	Traceur : antigène marqué à l'iode <sup>125</sup>	Tracer: <sup>125</sup> I-markiertes Antigen	Traçador: antígeno marcado com <sup>125</sup> I	Spårelement: antigen betecknad med <sup>125</sup> I
CAL	Étalon	Kalibrator	Calibrador	Kalibrator
CONTROL	Sérum de contrôle	Kontrollserum	Soro de controlo	Kontrollserum
RCNS X mL	Reconstituer avec X mL	Mit X ml auflösen	Reconstituir com X mL	Rekonstituera med X mL
Radioactive	Radioactif	Radioaktiv	Radioactivo	Radioaktiv
Harmful	Nocif	Gesundheitsschädlich	Nocivo	Skadligt

**Distribué Par :**

DiaSorin S.A.  
11, rue Georges Besse  
92160 Antony, France



DiaSorin Inc.  
1951 Northwestern Avenue  
P.O. Box 285  
Stillwater, MN 55082-0285 U.S.A.

Phone: 651-439-9710  
FAX: 651-779-7847

For Customer Service in the U.S. and Canada Call Toll Free: 800-328-1482
In the United Kingdom Call: 44 118 9364200 FAX: 44 118 9792061
10417
27277 9/03

PRINTED IN U.S.A.

