

IVD

IRMA IGF-I

REF

A15729



**IMMUNORADIOMETRIC ASSAY FOR THE IN VITRO DETERMINATION
OF INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR I IN HUMAN SERUM AND PLASMA**



1. PRINCIPLE OF THE ASSAY

The immunoradiometric assay of Insulin-like Growth Factor I (IGF-I) is a "sandwich" type assay. Mouse monoclonal antibodies directed against two different epitopes of IGF-I and hence not competing are used. In order to release IGF-I from its binding proteins, a prior dissociation step is necessary. Samples and calibrators are incubated in tubes coated with the first monoclonal antibody in the presence of the second monoclonal antibody labeled with iodine 125. After incubation, the content of tubes is removed and bound radioactivity is measured. Unknown values are determined by interpolation from a standard curve. The bound radioactivity is directly proportional to the IGF-I concentration in the sample.

2. DESCRIPTION OF REAGENTS

All reagents of the kit are stable until the expiry date indicated on the kit label, if stored at 2-8°C. Storage conditions for reagents after reconstitution or dilution are indicated in paragraph Assay Procedure.

2.1 Anti-IGF-I antibody-coated tubes : 2 x 50 tubes (ready-to-use)

2.2 ¹²⁵I-labeled anti-IGF-I antibody : one 33 mL vial (ready-to-use)

The vial contains 370 kBq, at the date of manufacture, of ¹²⁵I-labeled immunoglobulins in liquid form, containing bovine serum albumin, sodium azide (<0.1%, see § Precautions), and a dye.

2.3 Calibrators : six vials (lyophilized)

The calibrator vials contain from 0 to 1,200 ng/mL of IGF-I in a buffer with bovine serum albumin and a preservative. The exact concentration is indicated on each vial label. The calibrators were calibrated against the international reference standard, WHO 87/518.

2.4 Control sample : one vial (lyophilized)

The vial contains IGF-I lyophilized in bovine serum albumin. The expected values are in the concentration range indicated on the vial label.

2.5 Dissociation buffer : two 25 mL vials (ready-to-use)

The vial contains bovine serum albumin.

2.6 Wash solution (20x) : one 50 mL vial

Concentrated solution has to be diluted before use.

Note : Temperatures and expiry dates printed on vial labels only apply to the long-term storage of components by the manufacturer. Do not take into account.

3. MATERIAL REQUIRED BUT NOT PROVIDED

In addition to standard laboratory equipment, the following items are required:

- Precision micropipet (50 µL).
- Semi-automatic pipets (300 µL, 1 mL).
- Vortex type mixer.
- Horizontal or orbital shaker (min. 300 rpm).
- Aspiration system.
- Gamma counter set for 125 iodine.

4. PRECAUTIONS

4.1 General remarks

- Bring all reagents to room temperature before pipeting.
- Do not mix the reagents from kits of different lots.
- A standard curve must be included with each assay.
- The correct setting of the shaker is very important for the reproducibility of the assay.
- It is recommended to perform the assay in duplicate.
- Strictly observe the order in which reagents are to be added.
- Each tube must be used only once.

4.2 Protection against ionizing radiation

The purchase, possession, utilization, and transfer of radioactive material is subject to the regulations of the country of use.

Adherence to the basic rules of radiation safety should provide adequate protection:

- No eating, drinking, smoking or application of cosmetics should be carried out in the presence of radioactive materials.
- No pipeting of radioactive solutions by mouth.
- Avoid all contact with radioactive materials by using gloves and laboratory overalls.
- All manipulation of radioactive substances should be done in an appropriate place, distant from corridors and other busy places.
- Radioactive materials should be stored in the container provided in a designated area.
- A record of receipt and storage of all radioactive products should be kept up to date.
- Laboratory equipment and glassware which are subject to contamination should be segregated to prevent cross-contamination of different radioisotopes.
- Each case of radioactive contamination or loss of radioactive material should be resolved according to established procedures.
- Radioactive waste should be handled according to the rules established in the country of use.

4.3 Sodium azide

Some reagents contain sodium azide as a preservative. Sodium azide can react with lead, copper or brass to form explosive metal azides. Dispose of the reagents by flushing with large amounts of water through the plumbing system.

4.4 Human serum

All serum and plasma samples should be handled as if capable of transmitting hepatitis or AIDS. Waste should be discarded according to the country rules.

5. SPECIMEN COLLECTION, PROCESSING, STORAGE AND DILUTION

- Collect blood in dry tubes or in tubes with heparin or EDTA.
- Separate serum or plasma from cells by centrifugation.
- Serum and plasma samples may be stored at 2-8°C, if the assay is to be performed within 24 hours. For longer storage keep frozen (<-18°C) after aliquoting so as to avoid repeated freezing and thawing.
- If samples have concentrations greater than the highest calibrator, they must be diluted with the dissociation buffer.

6. ASSAY PROCEDURE

6.1 Preparation of reagents

Let all the reagents come to room temperature.

6.1.1 Reconstitution of calibrators and control sample

The contents of the vials must be brought to room temperature before reconstitution with the volume of distilled water indicated on the vial label. Wait for 30 min following reconstitution and mix gently to avoid foaming before dispensing. Store the reconstituted solutions at 2-8°C for one week or aliquoted at <-18°C for a longer time, until the expiry date of the kit.

6.1.2 Preparation of the wash solution

Pour the content of the vial into 950 mL of distilled water and homogenize. The diluted solution may be stored at 2-8°C until the expiry date of the kit.

6.2 Treatment of samples and control

Do not treat calibrators.

- To plastic tubes, add successively 50 µL of sample and 1 mL of dissociation buffer (these conditions allow to treat 50 samples; divide volumes by two to treat 100 samples, i.e. 25 µL of serum and 500 µL of buffer).
- Mix with a vortex-type shaker.
- Treated samples may be kept for 48h at 2-8°C; for longer storage keep at <-18°C.

6.3 Assay procedure (see table next page).

7. RESULTS

Results are obtained from the standard curve by interpolation. The curve serves for the determination of IGF-I concentrations in samples measured at the same time as the calibrators.

7.1 Standard curve

The results in the package insert were calculated using a semi-logarithmic curve fit ("spline" mode) with B/T (%) or B/Bmax (%) on vertical axis and the IGF-I concentration of the calibrators on the horizontal axis (ng/mL). Other data reduction methods may give slightly different results.

Total activity : 127,559 cpm				
Calibrators	IGF-I ng/mL	cpm (n=3)	B/T (%)	B/Bmax (%)
0	0	257	0.20	0.43
1	30	1,138	0.89	1.93
2	100	4,496	3.52	7.65
3	300	18,620	14.59	31.72
4	600	39,285	30.79	66.93
5	1,200	58,695	46.00	100

(Example of standard curve, do not use for calculation)

7.2 Samples

Locate the ratio B/T (%) or B/Bmax (%) on the vertical axis of the standard curve, read-off the IGF-I concentration of the sample on the horizontal axis in ng/mL.

8. QUALITY CONTROL

Good laboratory practices imply that control samples be used regularly to ensure the quality of the results obtained. These samples must be processed exactly the same way as the assay samples, and it is recommended that their results be analyzed using appropriate statistical methods.

In case of packaging deterioration or if data obtained show some performance alteration, please contact your local distributor or use the following e-mail address:

immuno-techsup@beckmancoulter.com

9. EXPECTED VALUES

It is suggested that each laboratory establish its own normal values. The following values obtained with healthy subjects are indicative only.

Adults

Age (years)	n	IGF-I (ng/mL)				
		Min.	5 th percentile	Median	95 th percentile	Max.
20-30	51	219	232	288	385	644
30-40	44	140	177	245	382	405
40-50	43	64	124	199	290	336
50-60	18	71	71	147	263	284
60-70	20	94	94	141	269	269
70-80	20	72	76	117	160	167

Children

Stage of puberty (years)	n	IGF-I (ng/mL)			
		Mean	Min.	Max.	
P1	0-4	5	114	49	171
	>4	27	250	76	499
P2	6	303	247	396	
P3	7	414	249	642	
P4-P5	7	400	271	550	

Children constitutionally small

These children have a height that is lower by two standard deviations or more than average with GH concentration greater than 20 mIU/L after stimulation, and a regular rate of growth.

Stage of puberty (years)	n	IGF-I (ng/mL)			
		Mean	Min.	Max.	
P1	0-4	13	114	98	180
	5-7	25	115	98	156
	8-9	21	129	76	186
	10-11	24	151	76	234
	>12	27	198	131	278
P2	20	258	163	502	
P3	14	351	185	617	
P4	9	423	272	540	

10. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

(for more details, see the data sheet "APPENDIX")

10.1 Analytical sensitivity: 2 ng/mL

10.2 Specificity

The antibodies used in the immunoassay are highly specific for IGF-I. Extremely low cross reactivities were obtained against several molecules (insulin, proinsulin, IGF II, GH).

10.3 Precision

10.3.1 Intra-assay

Samples were assayed in 25 times in the same series. The coefficients of variation were found below or equal to 6.3%.

10.3.2 Inter-assay

Samples were assayed in duplicate in 25 different series. Coefficients of variation were found below or equal to 6.8%.

10.4 Accuracy

10.4.1 Dilution test

High-concentration samples were serially diluted with the zero calibrator. The recovery percentages obtained were between 88% and 111%.

10.4.2 Recovery test

Low-concentration samples were spiked with known quantities of IGF-I. The recovery percentages obtained were between 91% and 103%.

10.5 Measurement range (from analytical sensitivity to highest calibrator):

2 – 1,200 ng/mL.

11. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

The non-respect of the instructions in this package insert may affect results significantly. Results should be interpreted in the light of the total clinical presentation of the patient, including clinical history, data from additional tests and other appropriate information.

For assays employing antibodies, the possibility exists for interference by heterophile antibodies in the patient sample. Patients who have been regularly exposed to animals or have received immunotherapy or diagnostic procedures utilizing immunoglobulins or immunoglobulin fragments may produce antibodies, e.g. HAMA, that interfere with immunoassays.

Such interfering antibodies may cause erroneous results. Carefully evaluate the results of patients suspected of having these antibodies.

6.3 ASSAY PROCEDURE

Step 1 Additions	Step 2 Incubation	Step 3 Counting
<p>To antibody coated tubes, add successively in this order:</p> <ul style="list-style-type: none"> - 300 µL of tracer*, - 50 µL of calibrator, control or sample, <p>Mix.</p>	<p>Incubate 60 minutes at 18-25°C with shaking (350 rpm).</p>	<p>Aspirate carefully the content of tubes (except the 2 tubes «total cpm»).</p> <p>Wash twice with 2 mL of wash solution.</p> <p>Count bound cpm (B) and total cpm (T) for 1 min.</p>

* Add 300 µL of tracer to 2 additional tubes to obtain total cpm.

IVD

IRMA IGF-I

REF

A15729



**TROUSSE IMMUNORADIOMETRIQUE POUR LE DOSAGE IN VITRO
DE L'INSULINE-LIKE GROWTH FACTOR I DANS LE SERUM ET LE PLASMA HUMAIN**



1. PRINCIPE DU DOSAGE

Le dosage de l'IGF-I est un dosage immunoradiométrique de type "sandwich". La trousse utilise des anticorps monoclonaux de souris dirigés contre deux épitopes différents de la molécule et réagissant sans compétition. Avant le dosage, une étape de dissociation est nécessaire afin de libérer l'IGF-I de ses protéines de liaison. Dans des tubes recouverts d'un premier anticorps monoclonal, les extraits ou les calibrators sont ensuite incubés en présence d'un second anticorps monoclonal marqué à l'iode 125. Après incubation, le contenu des tubes est aspiré et la radioactivité liée est mesurée. Les valeurs inconnues sont déterminées par interpolation à l'aide de la courbe standard. La quantité de radioactivité fixée est directement proportionnelle à la concentration en IGF-I de l'échantillon.

2. REACTIFS FOURNIS

Tous les réactifs de la trousse conservés à 2-8°C sont stables jusqu'à la date de péremption mentionnée sur la trousse. Les conditions de conservation des réactifs après reconstitution ou dilution, sont indiquées dans le paragraphe Mode Opérateur.

2.1 Tubes revêtus d'anticorps anti-IGF-I : 2 x 50 tubes (prêts à l'emploi)

2.2 Anticorps monoclonal marqué à l'iode 125 : 1 flacon de 33 mL (prêt à l'emploi)

Le flacon contient 370 kBq, en début de lot, d'immunoglobulines marquées sous forme liquide avec de la sérum albumine bovine, de l'azide de sodium (<0,1%, voir § Précautions) et un colorant.

2.3 Calibrateurs : 6 flacons (lyophilisés)

Les flacons de calibrators contiennent entre 0 et 1200 ng/mL de IGF-I recombinant en tampon avec de l'albumine sérique bovine et un conservateur. La concentration exacte est indiquée sur l'étiquette de chaque flacon. Ils sont calibrés par rapport à la référence internationale WHO 87/518.

2.4 Echantillon de contrôle : 1 flacon (lyophilisé)

Le flacon contient de l'IGF-I lyophilisée dans de l'albumine sérique bovine. Les valeurs attendues sont comprises dans la fourchette de concentrations indiquée sur l'étiquette du flacon.

2.5 Tampon de dissociation : deux flacons de 25 mL (prêts à l'emploi)

Le flacon contient du sérum d'albumine bovine.

2.6 Solution de lavage (20x) : 1 flacon de 50 mL

Solution concentrée, à diluer avant usage.

Remarque : Les températures et dates d'expiration imprimées sur les étiquettes des flacons, concernent uniquement le stockage à long terme des réactifs par le fabricant, avant l'assemblage de la trousse. Ne pas en tenir compte.

3. MATERIEL NECESSAIRE MAIS NON FOURNI

En plus de l'équipement de laboratoire usuel, il est nécessaire d'utiliser le matériel suivant :

- Micropipette de précision (50 µL).
- Pipettes semi-automatiques (300 µL, 1 mL).
- Mélangeur de type vortex.
- Agitateur à mouvement de va et vient horizontal ou à plateau oscillant (min. 300 rpm).
- Système d'aspiration.
- Compteur gamma calibré pour l'iode 125.

4. PRECAUTIONS

4.1 Précautions générales

- Equilibrer les réactifs à la température du laboratoire avant utilisation.
- Ne pas mélanger des réactifs de lots différents.
- Effectuer simultanément la courbe standard et le dosage des échantillons.
- Le bon réglage de l'agitateur est une condition importante pour la reproductibilité du dosage.
- Il est recommandé de réaliser les dosages en double.
- Observer strictement l'ordre dans lequel les réactifs sont ajoutés.
- Chaque tube ne doit être utilisé qu'une seule fois.

4.2 Protection contre les rayonnements ionisants

L'achat, la possession, l'utilisation et l'échange de matières radioactives sont soumis aux réglementations en vigueur dans le pays de l'utilisateur.

L'application des règles de base de protection contre les rayonnements ionisants assure une protection adéquate.

Certaines d'entre elles sont rappelées ci-après :

- Ne pas manger, ni boire, ni fumer, ni appliquer de cosmétiques dans les laboratoires où des produits radioactifs sont utilisés.
- Ne pas pipeter des solutions radioactives avec la bouche.
- Eviter le contact direct avec tout produit radioactif en utilisant des blouses et des gants de protection.
- Toute manipulation de matières radioactives se fera dans un local approprié, éloigné de tout passage.
- Les produits radioactifs seront stockés dans leur conditionnement d'origine dans un local approprié.
- Un cahier de réception et de stockage de produits radioactifs sera tenu à jour.
- Le matériel de laboratoire et la verrerie qui ont été contaminés doivent être éliminés au fur et à mesure afin d'éviter une contamination croisée de plusieurs isotopes.
- Chaque cas de contamination ou perte de substance radioactive devra être résolu selon les procédures établies.
- Toute mise aux déchets de matière radioactive se fera en accord avec les règlements en vigueur.

4.3 Azide de sodium

Certains réactifs contiennent de l'azide de sodium comme agent conservateur. L'azide de sodium peut réagir avec le plomb, le cuivre et le laiton, et former des azides métalliques explosifs. Lors du rejet de telles solutions à l'évier, laisser couler un volume important d'eau dans les canalisations.

4.4 Sérum humain

Tous les échantillons de sérum ou de plasma doivent être manipulés comme étant susceptibles de contenir les virus de l'hépatite ou du SIDA. Les déchets doivent être éliminés selon les réglementations nationales en vigueur.

5. PRELEVEMENT, PREPARATION CONSERVATION ET DILUTION DES ECHANTILLONS

- Recueillir le sang dans des tubes avec ou sans additifs, ou contenant de l'héparine, ou de l'EDTA.
- Séparer le sérum ou le plasma des cellules par centrifugation.
- Les échantillons sériques ou plasmatiques peuvent être conservés à 2-8°C si le dosage est réalisé dans les 24 heures. Sinon, il est préférable de les conserver congelés (<-18°C) et de préférence aliquotés, afin d'éviter les congélations et décongélations successives.
- Si les échantillons analysés ont une concentration supérieure au calibrator le plus élevé de la gamme, les diluer dans le tampon de dissociation.

6. MODE OPERATOIRE

6.1 Préparation des réactifs

Equilibrer les réactifs à la température du laboratoire.

6.1.1 Reconstitution des calibrateurs et de l'échantillon de contrôle

Reprendre par le volume d'eau distillée indiqué sur les étiquettes des flacons. Attendre 30 min après reconstitution et agiter doucement en évitant la formation de mousse avant de répartir dans les tubes. Les solutions reconstituées peuvent être conservées une semaine à 2-8°C. Au-delà il est préférable de les conserver congelées à une température inférieure à <-18°C jusqu'à la date d'expiration de la trousse.

6.1.2 Préparation de la solution de lavage

Verser le contenu du flacon dans 950 mL d'eau distillée. Homogénéiser. La solution diluée peut être conservée à 2-8°C jusqu'à la date de péremption de la trousse.

6.2 Traitement des échantillons et contrôle

Ne pas traiter les calibrateurs.

- Ajouter successivement dans des tubes en plastique 50 µL d'échantillon et 1 mL de tampon de dissociation (conditions pour le traitement de 50 échantillons; diviser les volumes par deux pour traiter 100 échantillons, soit 25 µL de sérum et 500 µL de tampon).
- Mélanger avec un agitateur de type vortex.
- Les échantillons traités peuvent être conservés à 2-8°C pendant 48 heures; pour une plus longue conservation, les garder à une température <-18°C.

6.3 Mode opératoire (voir tableau page suivante)

7 RÉSULTATS

Les résultats sont déduits de la courbe standard par interpolation. La courbe sert à déterminer les taux IGF-I de tous les échantillons mesurés en même temps que les calibrators.

7.1 Courbe standard

Les résultats présentés dans cette notice ont été calculés en employant un mode de tracé semi-logarithmique pour la gamme standard (mode "spline") avec en ordonnée le rapport B/T (%) ou B/Bmax (%) et en abscisse les concentrations en IGF-I des calibrators (ng/mL). L'utilisation d'un autre mode de calcul peut conduire à des résultats légèrement différents.

Activité totale : 127559 cpm				
Calibrateurs	IGF-I ng/mL	cpm (n=3)	B/T (%)	B/Bmax (%)
0	0	257	0,20	0,43
1	30	1138	0,89	1,93
2	100	4496	3,52	7,65
3	300	18620	14,59	31,72
4	600	39285	30,79	66,93
5	1200	58695	46,00	100

(Exemple de courbe standard, ne pas utiliser pour les calculs)

7.2 Echantillons

Repérer le rapport B/T ou B/Bmax sur l'axe vertical, puis le point correspondant de la courbe standard. En déduire la concentration en IGF-I de l'échantillon par lecture sur l'axe horizontal, en ng/mL.

8. CONTROLE DE QUALITE

Les bonnes pratiques de laboratoire impliquent que des échantillons de contrôle soient utilisés dans chaque série de dosage pour s'assurer de la qualité des résultats obtenus. Ces échantillons devront être traités de la même façon que les prélèvements à doser et il est recommandé d'en analyser les résultats à l'aide de méthodes statistiques appropriées.

En cas de détérioration de l'emballage ou si les résultats obtenus montrent une perte de performance du produit, veuillez contacter : Beckman Coulter France Tel : 01 49 90 90 00 ou notre service Support Technique : Tel : 04 91 17 27 27, Fax : 04 91 17 27 25, e-mail : immuno-techsup@beckmancoulter.com

9. VALEURS ATTENDUES

Il est recommandé à chaque laboratoire d'établir ses propres valeurs normales. Les valeurs suivantes déterminées chez des sujets sains sont données à titre indicatif.

Adultes

Tranches d'âges	n	IGF-I (ng/mL)				
		Min.	5 ^{ème} percentile	Médiane	95 ^{ème} percentile	Max.
20-30	51	219	232	288	385	644
30-40	44	140	177	245	382	405
40-50	43	64	124	199	290	336
50-60	18	71	71	147	263	284
60-70	20	94	94	141	269	269
70-80	20	72	76	117	160	167

Enfants

Stade pubertaire (années)	n	IGF-I (ng/mL)			
		Moyenne	Min.	Max.	
P1	0-4	5	114	49	171
	>4	27	250	76	499
P2	6	303	247	396	
P3	7	414	249	642	
P4-P5	7	400	271	550	

Enfants de petite taille constitutionnelle

Ces enfants ont une taille basse de 2 déviations standards ou plus que la moyenne avec une concentration en GH supérieure à 20 mUI/L après stimulation, et une courbe de croissance régulière.

Stade pubertaire (années)	n	IGF-I (ng/mL)			
		Moyenne	Min.	Max.	
P1	0-4	13	114	98	180
	5-7	25	115	98	156
	8-9	21	129	76	186
	10-11	24	151	76	234
	>12	27	198	131	278
P2	20	258	163	502	
P3	14	351	185	617	
P4	9	423	272	540	

10. PERFORMANCES

(voir la feuille "APPENDIX" pour plus de détails)

10.1 Sensibilité analytique: 2 ng/mL

10.2 Spécificité

L'anticorps utilisé dans ce dosage est hautement spécifique IGF-I. Des réactivités croisées extrêmement basses ont été obtenues vis à vis de nombreuses molécules apparentées (insuline, proinsuline, IGF-II, GH).

10.3 Précision

10.3.1 Intra-essai

Des échantillons ont été dosés 25 fois dans une même série. Les coefficients de variation obtenus étaient inférieurs ou égaux à 6,3%.

10.3.2 Inter-essais

Des échantillons ont été dosés en doublet dans 25 séries différentes. Les coefficients de variation obtenus étaient inférieurs ou égaux à 6,8%.

10.4 Exactitude

10.4.1 Epreuve de dilution

Des échantillons de concentration élevée ont été dilués en série avec le calibrateur zéro. Les pourcentages de recouvrement s'échelonnent entre 88% et 111%.

10.4.2 Epreuve de surcharge

Des quantités connues de la IGF-I ont été ajoutées à des sérums humains. Les pourcentages de recouvrement s'échelonnent entre 91% et 103%.

10.5 Plage de mesure (de la sensibilité analytique au calibrateur le plus élevé) : 2 – 1200 ng/mL.

11. LIMITATIONS DE LA METHODE

Le non-respect des recommandations indiquées dans cette notice peut avoir un impact significatif sur les résultats. Les résultats doivent être interprétés à la lumière du dossier clinique complet du patient, incluant l'historique clinique et les données des tests additionnels et toute autre information appropriée.

Pour les tests employant des anticorps, il existe la possibilité d'une interférence par des anticorps hétérophiles présents dans l'échantillon du patient. Les patients qui ont été régulièrement exposés à des animaux ou qui ont reçu une immunothérapie ou qui ont subi des procédures diagnostiques utilisant des immunoglobulines ou des fragments d'immunoglobulines peuvent produire des anticorps, par exemple des anticorps HAMA (anticorps humains anti-souris), qui interfèrent avec les tests immunologiques.

Ces anticorps qui interfèrent peuvent être la cause de résultats erronés. Evaluer avec précaution les résultats de patients suspectés de posséder ces anticorps.

6.3 MODE OPERATOIRE

Step 1 Répartition	Step 2 Incubation	Step 3 Comptage
<p>Dans les tubes recouverts d'anticorps, distribuer successivement et dans cet ordre :</p> <ul style="list-style-type: none"> - 300 µL de traceur*, - 50 µL de calibrateur, d'échantillon ou de contrôle, <p>Agiter.</p>	<p>Incuber 60 minutes à 18-25°C avec agitation (350 rpm).</p>	<p>Aspirer soigneusement le contenu de chaque tube (sauf les 2 tubes "cpm totaux").</p> <p>Laver 2 fois avec 2 mL de solution de lavage.</p> <p>Compter les cpm liés (B) et cpm totaux (T) pendant 1 min.</p>

* Ajouter 300 µL de traceur dans 2 tubes supplémentaires pour obtenir les cpm totaux.



**IMMUNORADIOMETRISCHER ASSAY FÜR DIE IN-VITRO BESTIMMUNG VON
INSULIN-ÄHNLICHER WACHSTUMSFAKTOR I IN HUMANEM SERUM UND PLASMA**



1. TESTPRINZIP

Der Radioimmunoassay für IGF-I basiert auf dem typischen "Sandwichprinzip". Der Kit verwendet monoklonale Mausantikörper, wobei es sich um verschiedene und deshalb nicht gegeneinander konkurrierende Epitope des IGF-I handelt. Ein erster Dissoziationsschritt ist nötig, um IGF-I von seinen Bindungsproteinen freizusetzen. Die Proben bzw. Kalibrators werden in mit dem ersten Antikörpern beschichteten Röhrchen inkubiert, in Anwesenheit eines zweiten ¹²⁵I-markierten monoklonalen Antikörpers. Nach der Inkubation wird die Flüssigkeit abgesaugt, und die gebundene Radioaktivität gemessen. Unbekannte Probenwerte werden mittels Interpolation aus der Standardkurve bestimmt. Die IGF-I-Konzentration in den Proben ist direkt proportional zur gebundenen Radioaktivität.

2. REAGENZIEN

Die Reagenzien sind verwendbar bis zum Verfallsdatum, wenn sie bei 2-8°C gelagert werden. Lagerungskonditionen der Reagenzien nach der Wiederherstellung oder Verdünnung werden im Paragraph Testdurchführung erläutert.

2.1 Röhrchen mit anti-IGF-I Antikörpern beschichtet: 2 x 50 Röhrchen (gebrauchsfertig)

2.2 ¹²⁵I-markierten anti-IGF-I Antikörpers : eine 33 mL Flasche (gebrauchsfertig)
Die Flasche enthält 370 kBq (am Tag der Herstellung) des ¹²⁵I-markierten Immunglobuline in flüssiger Form mit Bovinem serum Albumine, Natriumazid (<0.1%, siehe § Warn-, und Sicherheitshinweise) und einem Farbstoff.

2.3 Kalibrators : sechs Fläschchen (lyophilisiert)
Die Kalibratorflaschen enthalten zwischen 0 und 1200 ng/mL des IGF-I in Puffer mit bovinem Serum Albumin und Konservierungsstoff. Die genauen Konzentrationen sind auf jedem Fläschchen angegeben. Die Kalibrators sind gegen den internationalen Standard WHO 87/518 kalibriert.

2.4 Kontrollprobe : eine Flasche (lyophilisiert)
Die Flaschen enthalten IGF-I lyophilisiert in bovinem Serum Albumin. Die erwarteten Werte liegen im Konzentrationsbereich, der auf dem Fläschchen angegeben ist.

2.5 Dissoziationpuffer : zwei 25 mL Fläschchen (gebrauchsfertig)
Die Flasche enthält Bovines Serum Albumin.

2.6 Waschlösung (20x) : eine 50 mL Flasche
Die konzentrierte Lösung muss vor Gebrauch verdünnt werden.

Anmerkung : Auf die Fläschchen gedruckte Temperaturen und Verfallsdaten betreffen nur die Langzeitlagerung beim Hersteller, vor der Zusammensetzung des Kits. Bitte nicht beachten.

3. ERFORDERLICHE, ABER NICHT MITGELIEFERTER GERÄTE

Zusätzlich zu der Standardlaborausstattung, werden die folgenden Materialien benötigt:

- Präzisionspipette (50 µL)
- halbautomatische Pipetten (300 µL, 1 mL).
- Vortex-Mixer.
- Horizontal-, oder Orbitalschüttler (min.300 rpm).
- Absaugsystem.
- Gamma-Counter für I-125.

4. WARN-, UND SICHERHEITSHINWEISE

4.1 Allgemeinhinweise

- Die Reagenzien sollten Raumtemperatur haben vor dem Pipettieren.
- Reagenzien aus Kits von verschiedenen Produktionsserien sollten nicht miteinander vermischt werden.
- Eine Standardkurve ist für jeden Assay notwendig.
- Die korrekte Einstellung des Schüttlers ist sehr wichtig für die Reproduzierbarkeit des Assays.
- Der Assay sollte in Doppelbestimmung durchgeführt werden.
- Die Reihenfolge für die Reagenzzugabe sollte strikt eingehalten werden.
- Jedes Röhrchen darf nur einmal verwendet werden.

4.2 Schutz vor radioaktiver Strahlung

Annahme, Besitz und Verwendung, Lagerung, Transport und Beseitigung unterliegen den Vorschriften der Atomenergie- bzw. der jeweiligen staatlichen Behörde.

Die Einhaltung der Grundregeln beim Umgang mit Radioaktivität sollte eine ausreichende Sicherheit gewährleisten:

- In Räumen, in denen mit radioaktiven Materialien gearbeitet wird, sollte Essen, Trinken, Rauchen und das Auftragen von Kosmetika vermieden werden.
- Keine Mundpipette verwenden.
- Direkter Kontakt mit radioaktiven Materialien sollte durch Tragen entsprechender Schutzkleidung (Laborkittel, Handschuhe) vermieden werden.
- Das Arbeiten mit radioaktiven Stoffen muß in dafür speziell gekennzeichneten Bereichen, die vom normalen Laborbetrieb abgetrennt sind, erfolgen.
- Radioaktive Materialien sollten in einem speziell gekennzeichneten Bereich gelagert werden.
- Ein Register der Eingänge und Lagerung aller radioaktiven Produkte sollte ständig aktualisiert werden.
- Kontaminierte Labor und Glasgeräte sollten isoliert werden, um eine Kreuzkontamination von verschiedenen Radioisotopen zu verhindern.
- Kontaminationen des Arbeitsplatzes müssen unverzüglich sorgfältig nach den üblichen Verfahren entfernt werden.
- Radioaktiver Abfall muss entsprechend den Richtlinien jedes Einsatzortes entsorgt werden.

4.3 Natriumazid

Zur Vermeidung mikrobieller Kontamination enthalten einige Reagenzien Natriumazid. Natriumazid kann mit Blei, Kupfer oder Messing zu explosiven Metallaziden reagieren. Um dies zu vermeiden, sollte bei einer Entsorgung über Rohrleitungen mit viel Wasser nachgespült werden.

4.4 Humanserum

Mit allen Serum- und Plasmaproben ist so vorzugehen, als ob eine tatsächliche Ansteckungsgefahr für Hepatitis oder AIDS bestünde. Abfall sollte entsprechend den nationalen Richtlinien entsorgt werden.

5. PROBENENTNAHME, -BEHANDLUNG, -LAGERUNG UND VERDÜNNUNG

- Das Blut sollte in Röhrchen gesammelt werden, die entweder nichts enthalten oder Heparin oder EDTA.
- Trennen Sie Die Zellen vom Serum oder Plasma durch Zentrifugation.
- Serum- und Plasmaproben können bei 2-8°C gelagert werden, wenn der Assay innerhalb von 24h durchgeführt wird. Für eine längere Lagerung sollte die Probe aliquotiert und eingefroren werden (< -18°C).
- Wenn die Proben Konzentration über dem höchsten Kalibratorwert haben, müssen sie im Dissoziationpuffer verdünnt werden.

6. TESTDURCHFÜHRUNG

6.1 Präparation der Reagenzien

Die Reagenzien sollten Raumtemperatur haben.

6.1.1 Wiederaufnahme der Kalibrators und Kontrollen

Der Inhalt der Fläschchen wird mit einem auf dem Etikett angegebenen Volumen destilliertem Wassers wiederaufgenommen. Eine Wartezeit von 30 Minuten und leichtes Mischen sollten jegliches Schäumen vor dem Verteilen vermeiden. Die rekonstituierten Lösungen können bei 2-8 °C für eine Woche, oder aliquotiert bei <-18°C für eine längere Zeit, bis zum Verfallsdatum des Kits, gelagert werden.

6.1.2 Präparation der Waschlösung

Den Inhalt der Flasche in 950 mL destilliertes Wasser geben und homogenisieren. Die verdünnte Lösung ist bei 2-8°C bis zum Verfallsdatum haltbar.

6.2 Behandlung der Proben und Kontrollen

Kalibrators nicht behandeln

- Fügen Sie nacheinander 50 µL der Probe und 1 mL Dissoziationpuffer in Plastikröhrchen hinzu (Angaben für die Behandlung von 50 Proben; für die Behandlung von 100 Proben werden die Volumen halbiert: 25 µL Serum und 500 µL Puffer).
- Mischen Sie mit einem Vortex-type Mixer.
- Behandelte Proben können 48 Stunden lang bei 2-8°C gelagert werden; oder bei <-18°C für längere Lagerung.

6.3 Testdurchführung (Siehe Tafel auf der folgenden Seite).

7. ERGEBNISSE

Die Ergebnisse werden aus der Standardkurve mittels Interpolation ermittelt. Die Kurve kann für die Bestimmung der IGF-I-Konzentration in den Proben dienen, die zur gleichen Zeit wie die Standardkurve gemessen wurden.

7.1 Standardkurve

Die Ergebnisse in der Packungsbeilage wurden errechnet mittels einer semi-logarithmischen Kurvenanpassung ("spline" mode) mit B/T (%) oder B/Bmax (%) auf der y-Achse und den IGF-I-Konzentrationen der Kalibrators auf der x-Achse (ng/mL). Andere Datareduktions-Methoden können zu leicht abweichenden Ergebnissen führen.

Totalaktivität : 127559 cpm				
Kalibrators	IGF-I ng/mL	cpm (n=3)	B/T (%)	B/Bmax (%)
0	0	257	0.20	0.43
1	30	1138	0.89	1.93
2	100	4496	3.52	7.65
3	300	18620	14.59	31.72
4	600	39285	30.79	66.93
5	1200	58695	46.00	100

(Beispiel einer Standardkurve, nicht zur Berechnung benutzen)

7.2 Proben

Für jede Probe wird der B/T oder B/Bmax-Wert auf der y-Achse bestimmt und die entsprechende IGF-I-Konzentration auf der x-Achse abgelesen in ng/mL.

8. QUALITÄTSKONTROLLE

Zur Einhaltung der Laborgrundregeln sollten regelmäßig Kontrollproben benutzt werden, um die Qualität der Ergebnisse zu sichern. Diese Proben müssen in genau derselben Weise wie die Assayproben getestet werden, und die Analyse der Ergebnisse sollte mit angebrachten statistischen Methoden stattfinden.

Im Falle von Verpackungsschäden oder einer Leistungseinträchtigung des Produkts, kontaktieren Sie bitte Ihren lokalen Vertreter oder benutzen Sie die folgende e-mail: immuno-techsup@beckmancoulter.com

9. ERWARTETE WERTE

Jedes Labor sollte seinen eigenen Normalbereich in Gruppen von gesunden Testpersonen festlegen. Die hier angegebenen Werte dienen nur als Richtlinie.

Erwachsene

Alter (Jahren)	n	IGF-I (ng/mL)				
		Min.	5 th Perzentil	Median	95 th Perzentil	Max.
20-30	51	219	232	288	385	644
30-40	44	140	177	245	382	405
40-50	43	64	124	199	290	336
50-60	18	71	71	147	263	284
60-70	20	94	94	141	269	269
70-80	20	72	76	117	160	167

Kinder

Pubertäts-Stadium (Jahren)	n	IGF-I (ng/mL)			
		Durschnitt	Min.	Max.	
P1	0-4	5	114	49	171
	>4	27	250	76	499
P2		6	303	247	396
P3		7	414	249	642
P4-P5		7	400	271	550

Kleinwüchsige Kinder

Diese Kinder sind zwei Standardabweichungen oder mehr kleiner als der Durchschnitt mit einer GH Konzentration über 20 mIU/L nach Stimulation und normalen Wachstums.

Pubertäts-Stadium (Jahren)	n	IGF-I (ng/mL)			
		Durschnitt	Min.	Max.	
P1	0-4	13	114	98	180
	5-7	25	115	98	156
	8-9	21	129	76	186
	10-11	24	151	76	234
	>12	27	198	131	278
P2		20	258	163	502
P3		14	351	185	617
P4		9	423	272	540

10. LEISTUNGSDATEN

(für mehr Details vgl. den Anhang "APPENDIX")

10.1 Analytische Sensitivität: 2 ng/mL

10.2 Spezifität

Der in diesem Immunoassay verwendete Antikörper ist höchst spezifisch für IGF-I. Extrem niedrige Kreuzreaktionen wurden gegen einige verwandte Moleküle (insulin, proinsulin, IGF II, GH) gemessen.

10.3 Präzision

10.3.1 Intra-assay

Proben aus derselben Serie wurden 25 mal getestet. Der Variationskoeffizient war jeweils kleiner oder gleich 6.3%.

10.3.2 Inter-assay

Proben aus 25 verschiedenen Serien wurden als Doppelbestimmungen getestet. Der Variationskoeffizient war jeweils kleiner oder gleich 6.8%.

10.4 Genauigkeit

10.4.1 Verdünnungstest

Hoch konzentrierte Proben wurden mit Nullkalibrator verdünnt. Die ermittelte Wiederfindung lag zwischen 88% und 111%.

10.4.2 Wiederfindungstest

Schwach konzentrierte Proben wurden mit definierten IGF-I -Mengen vermischt. Die ermittelte Wiederfindung lag zwischen 91% und 103%.

10.5 Meßbereich (von der analytischen Sensitivität bis zum höchsten Kalibrator): 2 – 1200 ng/mL.

11. GRENZEN DES VERFAHRENS

Die Nichtbeachtung der Anweisungen in dieser Packungsbeilage kann die Ergebnisse signifikant beeinflussen. Die erhaltenen Ergebnisse sind vor dem Hintergrund der gesamten klinischen Situation des Patienten unter Berücksichtigung seiner klinischen Vorgeschichte, den Ergebnissen anderer Testergebnisse sowie weiteren vorliegenden Informationen zu interpretieren.

Bei Assays, die Antikörper nutzen, besteht die Möglichkeit einer Störung durch in der Patientenprobe enthaltene heterophile Antikörper. Patienten, die regelmäßig mit Tieren in Kontakt kommen oder sich immuntherapeutischen oder -diagnostischen Verfahren unter Einsatz von Immunglobulinen oder Immunglobulin-Fragmenten unterzogen haben, können Antikörper bilden (wie bspw. HAMA), welche die Immunoassays stören.

Derartige störende Antikörper können zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Die Ergebnisse von Patienten, bei denen das Vorliegen derartiger Antikörper zu vermuten ist, sind sorgfältig zu untersuchen.

6.3 TESTDURCHFÜHRUNG

Schritt 1 Zugabe	Schritt 2 Inkubation	Schritt 3 Messung
Serienweise Zugabe zu den beschichteten Röhrcchen in dieser reihenfolge. - 300 µL Tracer * , - 50 µL Kalibrator, Kontroll oder Probe, Mischen.	60 Minuten bei 18-25°C mit Schütteln (350 rpm).	Vorsichtig den Inhalt der Röhrcchen absaugen (außer den zwei Röhrcchen für die Totalaktivität). Zweimal mit 2mL Waschlösung waschen. Gebundene cpm (B) und Totalaktivität (T) bestimmen 1 Min.

* 300 µL Tracer in 2 zusätzliche Röhrcchen Hinzuzufügen um die Totalaktivität zu erhalten.



**KIT IMMUNORADIOMETRICO PER LA DETERMINAZIONE IN VITRO
DELL'INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR I IN SIERO E PLASMA UMANI**



1. PRINCIPIO DEL METODO

Il dosaggio immunoradiometrico dell' IGF-I è un metodo di tipo "sandwich". Sono utilizzati anticorpi monoclonali da topo, diretti contro due differenti epitopi di IGF-I e non in competizione fra loro. Per la liberazione dell' IGF-I dalle proteine leganti, è necessaria una prima fase di dissociazione. Campioni e calibratori vengono incubati in provette sensibilizzate con il primo anticorpo monoclonale insieme al secondo anticorpo marcato ¹²⁵I. Al termine dell'incubazione, il contenuto delle provette viene aspirato e la radioattività legata misurata. Le concentrazioni vengono ricavate per interpolazione sulla curva standard. La radioattività legata è direttamente proporzionale alla concentrazione di IGF-I nei campioni.

2. CONTENUTO DEL KIT

I reattivi, conservati a 2-8°C, sono stabili fino alla data di scadenza riportata sul kit. Le modalità di conservazione dei reattivi sono riportate nel paragrafo "Metodo del dosaggio".

- 2.1 Provette sensibilizzate con anticorpo anti-IGF-I : 2 x 50 provette** (pronte per l'uso)
- 2.2 Anticorpo monoclonale anti- IGF-I marcato ¹²⁵I : Un flacone 33 mL** (pronto per l'uso)
Il flacone contiene 370 kBq, alla data di marcatura, di immunoglobuline marcate con ¹²⁵I- in forma liquida, con BSA, sodio azide (<0,1%, vedi § "Precauzioni"), ed un colorante inerte.
- 2.3 Calibratori : Sei flaconi** (liofilizzati)
I flaconi contengono IGF-I, a concentrazioni comprese tra 0 e 1200 ng/mL in tampone con BSA e un conservante. L'esatta concentrazione degli calibratori è riportata sull'etichetta di ciascun flacone. Gli calibratori sono calibrati contro lo standard internazionale WHO 87/518.
- 2.4 Controllo : Un flacone** (liofilizzato)
Il flacone contiene IGF-I liofilizzato in BSA. L'intervallo dei valori attesi è riportato sull'etichetta del flacone.
- 2.5 Tampone di dissociazione : due flaconi (25 mL)** (pronti per l'uso)
Il flacone contiene BSA.
- 2.6 Soluzione di lavaggio (20x) : Un flacone 50 mL**
Soluzione concentrata da diluire prima dell'uso.

Nota : Le temperature di conservazione e le date di scadenza riportate sulle etichette di ciascun flacone si riferiscono alla conservazione dei reattivi stabilita in produzione, prima del loro inserimento nei kit.

3. MATERIALE RICHIESTO MA NON FORNITO

Oltre alla normale attrezzatura da laboratorio, è richiesto il materiale seguente:

- Micropipetta di precisione (50 µL).
- Pipette semi-automatiche (300 µL, 1 mL).
- Agitatore tipo vortex.
- Agitatore oscillante per provette (> 300 rpm).
- Sistema di aspirazione.
- Contatore gamma programmato per leggere ¹²⁵I.

4. PRECAUZIONI

4.1 Considerazioni generali

- Prima dell'uso lasciare equilibrare i reattivi a temperatura ambiente.
- Non utilizzare reattivi di lotti diversi.
- Inserire la curva standard in ogni esperimento.
- Per ottenere una migliore riproducibilità, è necessario programmare l'agitatore oscillante ogni volta alla stessa velocità.
- Eseguire il dosaggio in duplicato.
- Aggiungere i reattivi rigorosamente in ordine di successione.
- Le provette sono monouso.

4.2 Norme di radioprotezione

L'acquisto, la detenzione, l'utilizzo e il trasporto di materiale radioattivo sono soggetti a regolamentazione locale. Lo scrupoloso rispetto delle norme per l'uso di sostanze radioattive fornisce una protezione adeguata agli utilizzatori.

- Nei luoghi dove si usano sostanze radioattive non è consentito consumare cibi o bevande, fumare o usare cosmetici.
- Non pipettare materiale radioattivo con pipette a bocca.
- Usare sempre guanti e camici da laboratorio quando si manipola materiale radioattivo.
- Tutte le manipolazioni di sostanze radioattive devono essere fatte in posti appropriati, lontano da corridoi ed altri posti affollati.
- Le sostanze radioattive devono essere conservate in propri contenitori in appositi locali che devono essere interdetti alle persone non autorizzate.
- Deve essere tenuto un registro di carico e scarico del materiale radioattivo.
- Il materiale di laboratorio e la vetreria deve essere dedicato all'uso di isotopi specifici per evitare cross-contaminazioni.
- In caso di contaminazione o dispersione di materiale radioattivo, fare riferimento alle norme locali di radioprotezione.
- I rifiuti radioattivi devono essere smaltiti secondo le norme locali di radioprotezione.

4.3 Sodio azide

Alcuni reattivi contengono sodio azide come conservante, che può reagire con piombo, rame o ottone presenti nelle tubature di scarico per formare metallo-azidi esplosivi. Smaltire questi reattivi facendo scorrere abbondante acqua negli scarichi.

4.4 Siero umano

Manipolare tutti i campioni di sangue come potenziali fonti di infezioni. (Ad es. epatite o AIDS). Eliminare i rifiuti secondo le normative vigenti.

5. RACCOLTA, MANIPOLAZIONE E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

- Raccogliere i campioni in provette senza anticoagulante o con eparina o EDTA come anticoagulante.
- Separare per centrifugazione il siero o il plasma dalla parte corpuscolata.
- Il campione possono essere conservati fino a 24 ore a 2-8°C o, suddivisi in aliquote, a -18°C o a temperature inferiori per periodi più lunghi. Evitare ripetuti cicli di congelamento - scongelamento dei campioni.
- Diluire col tampone di diluizione i campioni a concentrazioni più elevate dell'ultimo calibratore.

6. METODO DEL DOSAGGIO

6.1 Preparazione dei reattivi

Portare i reattivi a temperatura ambiente.

6.1.1 Ricostituzione degli calibratori e dei controlli

Ricostituire il contenuto dei flaconi con il volume di acqua distillata riportato sull'etichetta di ciascun flacone. Lasciar riposare per almeno 30 minuti e controllare la completa dissoluzione del liofilizzato invertendo più volte i flaconi. I campioni ricostituiti sono stabili 1 settimana a 2-8°C e a -18°C o a temperature inferiori per periodi più lunghi.

6.1.2 Preparazione della soluzione di lavaggio

Diluire il contenuto del flacone con 950 mL di acqua distillata ed agitare con cura. La soluzione diluita è stabile a 2-8°C fino alla data di scadenza del kit.

6.2 Manipolazione dei campioni e controlli.

Non trattare gli calibratori.

- Aggiungere in successione alle provette di plastica 50 µL di campione e 1 mL di tampone di dissociazione (condizioni per il trattamento di 50 campioni; divisi gli volumi per due per trattare 100 campioni, cioè 25 µL di siero e 500 µL di tampone).
- Agitare con un agitatore di tipo vortex.
- I campioni trattati sono stabili fino a 48 ore conservati a 2-8°C, o a -18°C o a temperature inferiori per periodi più lunghi.

6.3 Schema del dosaggio (vedi tabella alla pagina seguente)

7. RISULTATI

Le concentrazioni di IGF-I in campioni e controlli vengono calcolate per interpolazione sulla curva standard. Campioni e controlli devono essere dosati insieme agli calibratori.

7.1 Curva standard

I risultati contenuti nelle istruzioni sono stati calcolati usando l'interpolazione semilogaritmica spline, con B/T% o B/Bmax% sull'asse verticale (asse delle ordinate) e la concentrazione di IGF-I negli calibratori (ng/mL) sull'asse orizzontale (asse delle ascisse). Altri metodi di interpolazione dati possono dare risultati leggermente differenti.

Attività totale : 127559 cpm				
Calibratori	IGF-I (ng/mL)	cpm (n=3)	B/T (%)	B/Bmax (%)
0	0	257	0,20	0,43
1	30	1138	0,89	1,93
2	100	4496	3,52	7,65
3	300	18620	14,59	31,72
4	600	39285	30,79	66,93
5	1200	58695	46,00	100

(Esempio di curva standard. Non usare per calcolare il valore dei propri campioni)

7.2 Campioni

Calcolare B/T (%) o B/Bmax (%) per ogni campione, riportarlo sull'asse delle ordinate e leggere le concentrazioni di IGF-I dei campioni in ng/mL sull'asse delle ascisse.

8. CONTROLLO DI QUALITÀ

Si consiglia ad ogni laboratorio di dosare regolarmente sieri di controllo per verificare la qualità dei risultati ottenuti. Questi campioni devono essere manipolati esattamente come i campioni in esame; i risultati devono essere analizzati con metodi statistici appropriati.

In caso il kit fosse danneggiato o i dati ottenuti mostrino un'alterazione della performance, si prega di contattare il distributore locale o di scrivere al indirizzo e-mail seguente: immuno-techsup@beckmancoulter.com

9. VALORI ATTESI

Ogni laboratorio deve stabilire i propri limiti di riferimento in campioni provenienti da soggetti caratterizzati clinicamente. Si prega di considerare solo come guida i valori sotto riportati.

Adulti

Età (anni)	n	IGF-I (ng/mL)				
		Min.	5 th percentile	Mediana	95 th percentile	Max.
20-30	51	219	232	288	385	644
30-40	44	140	177	245	382	405
40-50	43	64	124	199	290	336
50-60	18	71	71	147	263	284
60-70	20	94	94	141	269	269
70-80	20	72	76	117	160	167

Bambini

Stadio della pubertà (anni)	n	IGF-I (ng/mL)			
		Media	Min.	Max.	
P1	0-4	5	114	49	171
	>4	27	250	76	499
P2	6	303	247	396	
P3	7	414	249	642	
P4-P5	7	400	271	550	

Bambini di piccola costituzione fisica

Questi bambini hanno un'altezza inferiore di due deviazioni standard o di più dalla media con concentrazione di GH superiore a 20 mIU/L dopo stimolazione ed un tasso di crescita regolare.

Stadio della pubertà (anni)	n	IGF-I (ng/mL)			
		Media	Min.	Max.	
P1	0-4	13	114	98	180
	5-7	25	115	98	156
	8-9	21	129	76	186
	10-11	24	151	76	234
	>12	27	198	131	278
P2	20	258	163	502	
P3	14	351	185	617	
P4	9	423	272	540	

10. CARATTERISTICHE ANALITICHE

(Ulteriori dati sono riportati in "Appendix")

10.1 Sensibilità analitica: 2 ng/mL

10.2 Specificità

L'anticorpo utilizzato nel kit è altamente specifico per il IGF-I. Cross-reazioni molto ridotte sono state trovate con numerosi molecole correlate (insulina, proinsulina, IGF II, GH).

10.3 Precisione

10.3.1 Intra-saggio

Alcuni campioni sono stati analizzati 25 volte in uno stesso esperimento. È stato trovato un coefficiente di variazione del 6,3% o inferiore.

10.3.2 Inter-saggio

Alcuni campioni sono stati analizzati in duplicato in 25 esperimenti differenti. È stato trovato un coefficiente di variazione del 6,8% o inferiore.

10.4 Accuratezza

10.4.1 Test di diluizione

Alcuni campioni ad alta concentrazione di IGF-I sono stati diluiti con diluizioni seriali con lo calibratore zero. Il recupero è risultato essere compreso tra 88% e 111%.

10.4.2 Test di recupero

Quantità note di IGF-I sono state aggiunte a campioni a bassa concentrazione di IGF-I. Il recupero è risultato essere compreso tra 91% e 103%.

10.5 Campo di misura (è compreso tra la concentrazione della sensibilità analitica alla concentrazione del calibratore più elevato) : 2 – 1200 ng/mL.

11. LIMITI DEL METODO

Rispettare accuratamente le istruzioni d'uso per evitare risultati aberranti.

I risultati ottenuti con questo dosaggio devono essere interpretati alla luce del quadro clinico, insieme ai dati clinici e ad altri dati di laboratorio o strumentali.

Nei test anticorpali, esiste la possibilità di interferenza degli anticorpi eterofili presenti nei campioni dei pazienti. I pazienti regolarmente a contatto con animali o sottoposti a immunoterapia o a procedure diagnostiche a base di immunoglobuline o frammenti di immunoglobuline possono produrre anticorpi, p.e. HAMA, che interferiscono con gli immunodosaggi.

Tali anticorpi interferenti possono portare a risultati errati. Valutare attentamente i risultati di pazienti che potrebbero presentare questi anticorpi.

6.3 SCHEMA DEL DOSAGGIO

Fase 1 Dispensazione	Fase 2 Incubazione	Fase 3 Conteggio
<p>Aggiungere in successione alle provette sensibilizzate ed in ordine:</p> <ul style="list-style-type: none"> - 300 µL di marcato * - 50 µL di calibratore, controllo o campione, <p>Mescolare.</p>	<p>Incubare 60 minuti a 18-25°C in agitazione (350 rpm).</p>	<p>Aspirare con cura il contenuto delle provette (eccetto le 2 provette per l'attività totale).</p> <p>Lavare 2 volte con 2mL di soluzione di lavaggio.</p> <p>Contare la radioattività legata (B) e l'attività totale (T) per 1 min.</p>

* Aggiungere 300 µL di marcato a 2 provette non sensibilizzate per la determinazione dell'attività totale.

IVD

IRMA IGF-I

REF

A15729



**ENSAYO IMMUNORADIOMÉTRICO PARA LA DETERMINACIÓN, IN VITRO
DE LA INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR I EN SUERO HUMANO Y PLASMA**



1. PRINCIPIO DEL ENSAYO

El ensayo inmunoradiométrico de Insulin-like Growth Factor I (IGF-I) es un análisis de tipo sandwich. El equipo utiliza anticuerpos monoclonales de ratón dirigidos contra dos epitopos diferentes de la IGF-I y reaccionan sin competición. Con el fin de liberar IGF-I de sus proteínas enlazadas, es necesaria una primera reacción para disociarlas es necesaria. Las muestras y los calibradores se incuban en tubos recubiertos con el primer anticuerpo monoclonal en presencia del segundo anticuerpo monoclonal el cual está marcado con I¹²⁵. Después de la incubación se aspira el contenido en los tubos y se mide la radiactividad enlazada. Los valores desconocidos son determinados por interpolación con la ayuda de la curva estándar. La cantidad de radioactividad es directamente proporcional a la concentración de IGF-I en la muestra.

2. REACTIVOS PROPORCIONADOS

Todos los reactivos son estables entre 2 y 8°C hasta la fecha de caducidad del equipo, la cual se indica en la etiqueta de éste. Las condiciones de almacenamiento de los reactivos después de su reconstitución están indicadas en el apartado de Procedimiento del Análisis.

- 2.1 Tubos recubiertos con anticuerpo Anti-IGF-I : 2 x 50 tubos** (listos para su uso)
- 2.2 Anticuerpo monoclonal anti-IGF-I marcado con ¹²⁵I : un frasco de 33 mL** (listo para su uso)
El frasco contiene 370 kBq (en la fecha de fabricación) de inmunoglobulinas marcadas con ¹²⁵I en forma líquida con albúmina sérica bovina, azida de sodio (<0.1%, ver apartado de precauciones) y un colorante.
- 2.3 Calibradores : seis frascos** (liofilizados)
Los frascos de calibrador contienen entre 0 y 1200 ng/mL de IGF-I en un tampón con albúmina sérica bovina y un conservador. La concentración exacta se indica en la etiqueta de cada frasco. Los calibradores han sido calibrados de acuerdo con el estándar internacional WHO 87/518.
- 2.4 Muestras de control : un frasco** (liofilizados)
El frasco contiene IGF-I liofilizado en albúmina sérica bovina. Los valores esperados se sitúan en el intervalo de concentración indicado en la etiqueta del frasco.
- 2.5 Tampón de disociación : dos frascos de 25 mL** (listos para su uso)
El frasco contiene albúmina sérica bovina.
- 2.6 Solución de lavado (20x) : un frasco de 50 mL**
La solución concentrada debe diluirse antes de su uso.

Nota : Las temperaturas y fechas de caducidad impresas en las etiquetas de los Frascos, aplicables únicamente para periodos largos de almacenaje de reactivos solo son aplicables por el fabricante antes del ensamblaje del kit. No tener en cuenta.

3. MATERIAL REQUERIDO PERO NO PROPORCIONADO

Además del equipo normal de laboratorio se requiere lo siguiente:

- Micropipeta de precisión (50 µL).
- Pipetas semiautomáticas (300 µL, 1 mL).
- Mezclador tipo vórtex.
- Agitador con movimiento de vaivén horizontal y orbital (min. 300 rpm).
- Sistema de aspiración.
- Contador gamma calibrado para I¹²⁵.

4. PRECAUCIONES

4.1 Generales

- Permitir que los reactivos alcancen la temperatura ambiente antes de su uso.
- No mezclar los reactivos de lotes diferentes.
- Incluir una curva estándar en cada ensayo.
- La calibración correcta del agitador es muy importante para la reproducibilidad del análisis.
- Se recomienda realizar el ensayo por duplicado.
- Añadir los reactivos en el orden correcto.
- Cada tubo debe estar utilizado solamente una vez.

4.2 Seguridad radiológica

La compra, posesión, uso y transferencia de material radiactivo están sujetos de las disposiciones legales del país en el que se utiliza. El cumplimiento de las normas básicas de seguridad radiológica proporciona una protección adecuada.

- No se debe comer, beber, fumar o aplicarse cosméticos en presencia de materiales radiactivos.
- No pipetear las soluciones radiactivas con la boca.
- Evitar cualquier contacto con materiales radiactivos mediante el uso de guantes y bata de laboratorio.
- Toda manipulación de material radiactivo debe realizarse en el lugar adecuado, alejado de corredores y espacios ocupados.
- Los materiales radiactivos deben almacenarse en el contenedor aprobado en una zona especializada.
- Se debe llevar y conservar actualizado un registro de las entradas y almacenamiento de todos los productos radiactivos.
- El equipo y material de vidrio de laboratorio que son objeto de contaminación se deben separar para evitar la contaminación con otros radioisótopos.
- Cada caso de contaminación radiactiva, o de pérdida de materiales radiactivos se debe resolver de acuerdo con los procedimientos establecidos.
- El desecho radiactivo debe manipularse de acuerdo a las reglas establecidas por el país donde se utiliza.

4.3 Azida de sodio

Algunos reactivos contienen azida de sodio como conservante. La azida de sodio puede reaccionar con el plomo, el cobre y el bronce para formar azidas metálicas explosivas. Deseche los reactivos a través del sistema de drenaje mediante lavado con grandes cantidades de agua.

4.4 Suero humano

Todas las muestras de sangre deben manejarse como si fueran capaces de transmitir enfermedades (ej. hepatitis o SIDA). Los desperdicios deben eliminarse según los reglamentos nacionales actuales.

5. RECOLECCIÓN, PROCESAMIENTO Y ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS

- Recoger la sangre en tubos sin aditivos o que contengan heparina, o EDTA.
- Separar el suero o el plasma de las células mediante centrifugación.
- Las muestras séricas o plasmáticas pueden ser conservadas a 2-8°C si el ensayo se realiza en 24 horas. Si se requiere almacenar las muestras durante un periodo mayor, preparar alícuotas para evitar repitidas descongelaciones y congelaciones y almacenar las muestras a <-18°C.
- Aquellas muestras que presenten una concentración superior al calibrador de mayor concentración, se diluirán con el tampón de disociación.

6. PROCEDIMIENTO DEL ANÁLISIS

6.1 Preparación de los reactivos

Permita que todos los reactivos alcancen la temperatura ambiente.

6.1.1 Reconstitución de los calibradores y controles

El contenido de los frascos esta reconstituido con el volumen de agua destilada indicado en las etiquetas de los frascos. Esperar 30 minutos y agitar lentamente con el fin de que no se forma espuma antes de repartirlo en los tubos. Estas pueden guardarse por 1 semana a 2-8°C. Guardar en congelación (<-18°C) durante periodos largos de almacenamiento.

6.1.2 Preparación de la solución de lavado

Verter el contenido del frasco en 950 mL de agua destilada y homogeneizar. La solución diluida se puede conservar a 2 - 8°C hasta la fecha de caducidad del equipo.

6.2 Tratamiento de las muestras y de los controles

No tratar los calibradores

- Añadir sucesivamente en los tubos de plástico, 50 µl de la muestra y 1 mL de tampón de disociación (condiciones para el tratamiento de 50 muestras, dividir los volumen por dos para 100 muestras, pues 25 µL de suero y 500 µL de tampón).
 - Mezclar con un agitador de tipo vortex.
- Las muestras tratadas se conservan 48 h a 2-8°C; sino es preferible conservar las congeladas <-18°C.

6.3 Procedimiento del análisis (ver tabla a continuación)

7. RESULTADOS

Los resultados se obtienen por interpolación en la curva estándar. La curva sirve para la determinación de las concentraciones de IGF-I en las muestras medidas al mismo tiempo que los calibradores.

7.1 Curva estándar

Los resultados presentados en este folleto han sido calculados usando una curva lineal (modo "spline") donde B/T (%) o B/Bmax (%) han sido marcadas sobre el eje vertical y las concentraciones de la IGF-I de los calibradores (ng/mL) sobre el eje horizontal. La utilización de otros métodos de cálculo pueden dar resultados ligeramente diferentes.

Actividad total: 127559 cpm				
Calibradores	IGF-I (ng/mL)	cpm (n=3)	B/T (%)	B/Bmax (%)
0	0	257	0,20	0,43
1	30	1138	0,89	1,93
2	100	4496	3,52	7,65
3	300	18620	14,59	31,72
4	600	39285	30,79	66,93
5	1200	58695	46,00	100

(Ejemplo de curva estándar, no utilizar como modelo para realizar los cálculos)

7.2 Muestras

Marcar el valor B/T (%) o B/Bmax (%) sobre el eje vertical, luego el punto correspondiente a la curva estándar. Deducir la concentración de IGF-I de la muestra por la lectura sobre el eje horizontal, en ng/mL.

8. CONTROL DE CALIDAD

La obtención de unos resultados óptimos implica la utilización de los sueros control en cada serie de experimentos para asegurar la calidad de los resultados obtenidos. Dichos controles deben ser procesados de la misma manera que las muestras a analizar. Se recomienda que los resultados sean analizados utilizando los métodos estadísticos apropiados.

En caso de detectar un deterioro en el empaquete del producto ó que los resultados expresen una alteración en las características del mismo, contactar con el Distribuidor local ó notificar a la dirección de e-mail: immuno-techsup@beckmancoulter.com

9. VALORES ESPERADOS

Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia. Los valores que se muestran a continuación fueron obtenidos de sujetos sanos y deben de considerarse solo como orientativos.

Adultos

Edad (años)	n	IGF-I (ng/mL)				
		Min.	percentile 5 th	Mediana	percentile 95 th	Max.
20-30	51	219	232	288	385	644
30-40	44	140	177	245	382	405
40-50	43	64	124	199	290	336
50-60	18	71	71	147	263	284
60-70	20	94	94	141	269	269
70-80	20	72	76	117	160	167

Niños

Pubertad	(años)	n	IGF-I (ng/mL)		
			Promedio	Min.	Max.
P1	0-4	5	114	49	171
	>4	27	250	76	499
P2		6	303	247	396
P3		7	414	249	642
P4-P5		7	400	271	550

Niños de constitución pequeña

Estos niños tienen una talla más pequeña de dos desviaciones estándares o más que la media con una concentración de GH superior a 20 mIU/L después de una estimulación, y un índice de crecimiento regular.

Pubertad	(años)	n	IGF-I (ng/mL)		
			Promedio	Min.	Max.
P1	0-4	13	114	98	180
	5-7	25	115	98	156
	8-9	21	129	76	186
	10-11	24	151	76	234
	>12	27	198	131	278
P2		20	258	163	502
P3		14	351	185	617
P4		9	423	272	540

10. CARACTERISTICAS DE REDIMIENTO DEL ANALISIS (para mayores detalles ver la página de "APENDICES")

10.1 Sensibilidad Analítica: 2 ng/mL

10.2 Especificidad

El anticuerpo usado en el inmunoanálisis es altamente específico para la IGF-I. Las reactividades cruzadas que se obtuvieron frente a numerosas moléculas relacionadas (proinsulina, insulina, IGF-II, GH) fueron extremadamente bajas.

10.3 Precisión

10.3.1 Intra-análisis

Las muestras se evaluaron 25 veces en las mismas series. Los coeficientes de variación fueron iguales o por debajo de 6,3%.

10.3.2 Inter-análisis

Las muestras se evaluaron por duplicado en 25 series diferentes. Los coeficientes de variación fueron iguales o por debajo de 6,8%.

10.4 Precisión

10.4.1 Prueba de dilución

Las muestras altamente concentradas se diluyeron serialmente con el calibrador Cero. Los porcentajes recuperados fueron entre 88% y 111%.

10.4.2 Prueba de recuperación

Las muestras de baja concentración se regularon con cantidades conocidas de IGF-I. Los porcentajes de recuperación obtenidos fueron entre 91% y 103%.

10.5 Rango de medida (a partir de la sensibilidad analítica del calibrador más alto): 2 – 1200 ng/mL.

11. LIMITACION DEL METODO

El no respetar las instrucciones de uso puede afectar significativamente a los resultados. Los resultados deben ser interpretados con la luz de la presentación clínica total del paciente, incluyendo su historia clínica, los datos de pruebas adicionales y las otras informaciones apropiadas.

En los ensayos en los que se utilizan anticuerpos existe la posibilidad de que se produzcan interferencias debido a la presencia de anticuerpos heterófilos en la muestra del paciente. Los pacientes que hayan estado en contacto regularmente con animales o hayan recibido inmunoterapia o procedimientos diagnósticos con inmunoglobulinas o fragmentos de inmunoglobulinas pueden producir anticuerpos, p.ej. HAMA, que interfieren con los inmunoensayos.

Esos anticuerpos que crean interferencias pueden causar resultados erróneos. Evaluar cuidadosamente los resultados de los pacientes que se sospeche que puedan tener esos anticuerpos.

6.3 SCHEMA DEL DOSAGGIO

PASO 1 Adiciones	PASO 2 Incubación	PASO 3 Conteo
<p>En los tubos recubiertos, añadir sucesivamente en este orden :</p> <ul style="list-style-type: none"> - 300 µL del trazador * - 50 µL de calibrador, control o muestra, <p>Mezclar.</p>	<p>Incubar 60 minuti entre 18-25°C en movimiento (350rpm).</p>	<p>Aspirar cuidadosamente el contenido de los tubo (excepto el de los dos tubos de cpm total).</p> <p>Lavar dos veces con 2 mL de solución de lavado.</p> <p>Contar la cpm enlazadas (B) y las Totales (T) durante 1 minuto.</p>

*Añadir 300 µl de trazador a 2 tubos adicionales para obtener las cpm totales



**ΑΝΟΣΟΡΑΔΙΟΜΕΤΡΙΚΗ ΕΞΕΤΑΣΗ ΓΙΑ ΤΟΝ IN VITRO ΠΟΣΟΤΙΚΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ
ΤΗΣ ΑΥΞΗΤΙΚΟ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΙΝΣΟΥΛΙΝΗ ΙΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΟΡΟ ΚΑΙ ΤΟ ΠΛΑΣΜΑ**



1. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΕΞΕΤΑΣΗΣ

Η ανοσοραδιομετρική εξέταση του Αυξητικό Παράγοντα Ινσουλίνης I (IGF-I) είναι εξέταση τύπου "άντουνις". Χρησιμοποιούνται μονοκλωνικά αντισώματα ποντικού που κατευθύνονται κατά δύο διαφορετικών επίτρωτων του IGF-I και επομένως δεν είναι ανταγωνιστικά. Προκειμένου να απελευθερωθεί το IGF-I από τις προσδένουσες πρωτεΐνες του, ένα προγενέστερο βήμα διαχωρισμού είναι απαραίτητο. Τα δείγματα και τα βαθμονομητές επωάζονται σε σωληνάρια επιστρωμένα με πρώτο μονοκλωνικό αντίσωμα υπό την παρουσία ενός δεύτερου μονοκλωνικού αντισώματος, που είναι επισημασμένο με Ιώδιο 125. Μετά την επώαση αποχύνονται τα υγρά περιεχόμενα των σωληναρίων και μετράται η δεσμευμένη ραδιενέργεια. Οι άγνωστες τιμές προσδιορίζονται με παρεμβολή στην πρότυπη καμπύλη. Η δεσμευμένη ραδιενέργεια είναι ευθέως ανάλογη της συγκέντρωσης του IGF-I του δείγματος.

2. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΠΟΥ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ

Όλα τα αντιδραστήρια είναι σταθερά μέχρι την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στην ετικέτα του kit, όταν αποθηκεύονται σε θερμοκρασία 2-8°C. Οι συνθήκες αποθήκευσης των αντιδραστηρίων μετά από ανασύσταση ή αραιώση αναφέρονται στην παράγραφο Διαδικασία Εξέτασης.

2.1 Σωληνάρια επιστρωμένα με αντίσωμα κατά της IGF-I : 2 x 50 σωληνάρια (έτοιμα προς χρήση)

2.2 Αντίσωμα κατά του IGF-I επισημασμένο με ¹²⁵I : ένα φιαλίδιο των 33 mL (έτοιμο προς χρήση)

Το φιαλίδιο περιέχει, την ημέρα που παρασκευάζεται, 370 kBq επισημασμένης μελίδιο 125 ανοσοσφαιρίνης σε υγρή μορφή που περιέχει αλμπουμίνη βοδινού ορού, αζίδιο του Νατρίου (<0,1%, βλ. § Προφυλάξεις), και μια χρωστική.

2.3 Βαθμονομητές : 6 φιαλίδια (λυοφιλημένα)

Τα βαθμονομητές φιαλίδια περιέχουν IGF-I σε συγκέντρωση από 0 έως 1200 ng/mL σε ρυθμιστικό με αλμπουμίνη βοδινού ορού και συντηρητικά. Τα βαθμονομητές είναι βαθμονομημένα με βάση το διεθνές πρότυπο, WHO 87/518.

2.4 Δείγμα ελέγχου : ένα φιαλίδιο (λυοφιλημένα)

Το φιαλίδιο περιέχει λυοφιλημένο IGF-I σε αλμπουμίνη βοδινού ορού. Οι αναμενόμενες τιμές κυμαίνονται μεταξύ των συγκεντρώσεων που αναγράφονται στην ετικέτα του φιαλιδίου.

2.5 Ρυθμιστικό διαχωρισμού : φιαλίδιο του 25 mL (έτοιμο προς χρήση)

Το φιαλίδιο περιέχει αλμπουμίνη βοδινού ορού.

2.6 Διάλυμα πλύσης (20x) : 1 φιαλίδιο των 50 mL

Το συμπυκνωμένο διάλυμα πρέπει να αραιωθεί πριν από τη χρήση.

Σημείωση : Οι θερμοκρασίες και οι ημερομηνίες λήξης που αναγράφονται στις ετικέτες των φιαλιδίων, αφορούν αποκλειστικά στη μακροπρόθεσμη αποθήκευση των αντιδραστηρίων από τον κατασκευαστή, πριν από τη συναρμολόγηση του kit. Να μη λαμβάνονται υπόψη.

3. ΑΠΑΙΤΟΥΜΕΝΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ ΠΟΥ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΕΤΑΙ

Ο απαιτούμενος εργαστηριακός εξοπλισμός, επιπλέον του συνήθους, είναι ο εξής:

- Μικροπιπέτες ακριβείας (50 μL).
- Ημιαυτόματες πιπέτες (300 μL, 1 mL).
- Μίξερ τύπου vortex.
- Shaker με οριζόντια πλατφόρμα παλινδρόμησης ή με πλατφόρμα - ταλάντωσης (κατώτατο 300 rpm).
- Σύστημα απόχυσης.
- Gamma counter, σε τιμή Ιώδιο 125.

4. ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ

4.1 Γενικές παρατηρήσεις

- Αφήστε τα αντιδραστήρια να φτάσουν σε ισορροπία σε θερμοκρασία δωματίου πριν από τη χρήση.
- Μην ανακατεύετε αντιδραστήρια από διαφορετικές παρτίδες.
- Κάνετε ταυτόχρονα την πρότυπη καμπύλη και τον ποσοτικό προσδιορισμό των δειγμάτων.
- Η σωστή ρύθμιση του shaker είναι απαραίτητη για την αναπαραγωγισιμότητα του ποσοτικού προσδιορισμού.
- Σας συστήνεται να πραγματοποιείτε δύο φορές τον κάθε προσδιορισμό.
- Αυστηρά σεβαστείτε την σειρά στην οποία τα αντιδραστήρια πρόκειται να προστεθούν.
- Κάθε σωληνάριο πρέπει να χρησιμοποιηθεί μόνο μια φορά.

4.2 Προστασία από την ιονίζουσα ακτινοβολία

Η αγορά, η κατοχή, η χρήση και η μεταφορά του ραδιενεργού υλικού υπόκεινται στους κανονισμούς της χώρας στην οποία το υλικό αυτό χρησιμοποιείται. Η συμμόρφωση με τους βασικούς κανόνες ασφάλειας από την ακτινοβολία παρέχει επαρκή προστασία.

- Υπό την παρουσία ραδιενεργών υλικών, μην καταναλώνετε τρόφιμα ή ποτά, μην καπνίζετε και μη χρησιμοποιείτε καλλυντικά.
- Μη χρησιμοποιείτε το στόμα για να πιπιλέσετε τα ραδιενεργά υλικά.
- Αποφύγετε κάθε άμεση επαφή με τα ραδιενεργά υλικά, και χρησιμοποιείτε γάντια και εργαστηριακή ποδιά.
- Κάθε χειρισμός ραδιενεργού υλικού πρέπει να γίνεται σε κατάλληλο χώρο, μακριά από διαδρόμους και άλλα πολυσύχναστα μέρη.
- Τα ραδιενεργά προϊόντα πρέπει να φυλάσσονται στον προκαθορισμένο για τη χρήση αυτή χώρο.
- Το αρχείο παραλαβής και αποθήκευσης ραδιενεργών υλικών πρέπει να είναι πάντα ενημερωμένο.
- Ο εργαστηριακός εξοπλισμός ή τα υαλίνα σκεύη που έχουν μολυνθεί από ραδιενεργά υλικά πρέπει να απομονώνονται, προκειμένου να αποφευχθεί μόλυνση από διαφορετικά ραδιοϊσότοπα.
- Κάθε περίπτωση ραδιενεργής μόλυνσης ή απώλειας ραδιενεργού υλικού θα πρέπει να επιλύεται με βάση τις ισχύουσες διαδικασίες.
- Ο χειρισμός των ραδιενεργών αποβλήτων πρέπει να ακολουθεί τους κανονισμούς της χώρας στην οποία χρησιμοποιείται το ραδιενεργό υλικό.

4.3 Αζίδιο του Νατρίου

Κάποια αντιδραστήρια περιέχουν αζίδιο του Νατρίου ως συντηρητικό. Το αζίδιο του Νατρίου μπορεί να αντιδράσει με το χαλκό ή το μόλυβδο προς το σχηματισμό εκρηκτικών αζιδίων των μετάλλων. Η απόρριψη των αντιδραστηρίων πρέπει να γίνεται μέσα από το υδραυλικό σύστημα, χρησιμοποιώντας μεγάλες ποσότητες νερού.

4.4 Ανθρώπινος ορός

Όλα τα δείγματα ορού και πλάσματος πρέπει να τα χειρίζεστε ως ικανά να μεταδώσουν ηπατίτιδα ή AIDS. Τα απόβλητα πρέπει να απορριφθούν σύμφωνα με την εγχώρια νομοθεσία.

5. ΣΥΛΛΟΓΗ, ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ, ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ ΚΑΙ ΑΡΑΙΩΣΗ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

- Συλλέξτε το αίμα σε σωληνάρια είτε χωρίς προσθετικά είτε με ηπαρίνη, EDTA ή κιτρικό νάτριο.
- Διαχωρίστε τον ορό ή το πλάσμα από τα κύτταρα με φυγοκέντρηση.
- Τα δείγματα ορού ή πλάσματος μπορούν να διατηρηθούν στους 2-8°C, αν η εξέταση πρόκειται να γίνει μέσα σε 24 ώρες. Για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, διατηρήστε τα κατεψυγμένα (<-18°C).
- Αν τα δείγματα που έχουν αναλυθεί έχουν μεγαλύτερη συγκέντρωση από το βαθμονομητές με την υψηλότερη συγκέντρωση, πρέπει να αραιωθούν στο ρυθμιστικό διαχωρισμού.

6. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ

6.1 Προετοιμασία αντιδραστηρίων

Αφήστε όλα τα αντιδραστήρια να φθάσουν σε ισορροπία σε θερμοκρασία δωματίου.

6.1.1 Ανασύσταση των προτύπων και των δειγμάτων ελέγχου

Το περιεχόμενο των φιαλιδίων ανασύσταται με το όγκο αποσταγμένου νερού που αναγράφεται στην ετικέτα. Περιμένετε 30 λεπτά μετά την ανασύσταση και ανακατέψτε ελαφρά ώστε να μη δημιουργηθεί αφρός, πριν την διανομή στα σωληνάρια. Τα φιαλίδια μπορούν να διατηρηθούν για 1 εβδομάδα στους 2-8°C. Για μεγαλύτερη διάρκεια, είναι προτιμότερο να διατηρηθούν σε θερμοκρασία χαμηλότερη από -18°C μέχρι την ημερομηνία λήξης του kit. Μην επαναλάβετε κατάψυξη και απόψυξη για περισσότερες από τρεις φορές.

6.1.2 Προετοιμασία του διαλύματος πλύσης

Προσθέστε το περιεχόμενο του φιαλιδίου σε 950mL αποσταγμένου νερού και ομογενοποιήστε. Το αραιωμένο διάλυμα μπορεί να αποθηκευτεί στους 2-8°C μέχρι την ημερομηνία λήξης του kit.

6.2 Επεξεργασία των δειγμάτων και του ελέγχου

Μην επεξεργάζεστε τα βαθμονομητές.

- Στα πλαστικά σωληνάρια, προσθέστε διαδοχικά 50 μL δείγματος και 1 mL ρυθμιστικού αποσύνδεσης (αυτοί οι όροι επιτρέπουν να επεξεργάζεστε 50 δείγματα, διαιρέστε τους όγκους από δύο για να επεξεργάζεστε 100 δείγματα, δηλ. 25 μL ορού και 500 μL ρυθμιστικού).
- Ανακατέψτε με ένα ρυθμιστικό τύπου vortex.
- Τα επεξεργασμένα δείγματα μπορούν να διατηρηθούν για 48 ώρες στους 2-8°C; Για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα διατηρούνται σε θερμοκρασία χαμηλότερη των -18°C.

6.3 Διαδικασία εξέτασης (βλέπε τον πίνακα στην επόμενη σελίδα).

7. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματα των δειγμάτων υπολογίζονται με παρεμβολή στην πρότυπη καμπύλη. Η καμπύλη χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων IGF-I σε δείγματα που μετρώνται ταυτόχρονα με τα βαθμονομητές.

7.1 Πρότυπη καμπύλη

Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται σε αυτό το φυλλάδιο υπολογίστηκαν με τη χρήση γραμμικής καμπύλης προσαρμογής με τον λόγο B/T(%) ή B/Bmax (%) στον κάθετο άξονα, και τις συγκεντρώσεις IGF-I των προτύπων (ng/mL) στον οριζόντιο άξονα. Άλλες μέθοδοι αναγωγής δεδομένων μπορεί να οδηγήσουν σε ελαφρώς διαφορετικά αποτελέσματα.

Ολική ραδιενέργεια : 127559 cpm				
βαθμονομητές	IGF-I (ng/mL)	cpm (n=3)	B/T (%)	B/Bmax (%)
0	0	257	0,20	0,43
1	30	1138	0,89	1,93
2	100	4496	3,52	7,65
3	300	18620	14,59	31,72
4	600	39285	30,79	66,93
5	1200	58695	46,00	100

(Παράδειγμα πρότυπης καμπύλης, να μη χρησιμοποιηθεί σε υπολογισμούς).

7.2 Δείγματα

Σημειώστε τον λόγο B/T (%) ή B/Bmax (%) στον κάθετο άξονα της πρότυπης καμπύλης, και διαβάστε τη συγκέντρωση IGF-I του δείγματος στον οριζόντιο άξονα σε ng/mL.

8. ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ

Η σωστή εργαστηριακή πρακτική προϋποθέτει την τακτική χρήση δειγμάτων ελέγχου, προκειμένου να διασφαλίζεται η ποιότητα των αποτελεσμάτων. Η επεξεργασία των δειγμάτων αυτών πρέπει να γίνεται με τον ίδιο τρόπο με τον οποίο γίνεται η επεξεργασία των άγνωστων δειγμάτων. Επιπλέον, συστήνεται η ανάλυση των αποτελεσμάτων τους να γίνεται με τη βοήθεια των κατάλληλων στατιστικών μεθόδων.

Σε περίπτωση επιδείνωσης συσκευασίας ή εάν τα αποτελέσματα που προέκυψαν έχουν τροποποίηση απόδοσης, παρακαλώ ελάτε σε επαφή με τον τοπικό διανομέα σας ή χρησιμοποιήστε την ακόλουθη διεύθυνση ηλεκτρονικού ταχυδρομείου: immuno-techsup@beckmancoulter.com

9. ANAMENOMENES TIMES

Προτείνουμε το κάθε εργαστήριο να καθιερώσει τις δικές τους τιμές αναφοράς. Οι τιμές που ακολουθούν και που προέκυψαν από υγιή άτομα είναι απλώς ενδεικτικές.

Ενήλικες

Ηλικία (ετών)	n	IGF-I (ng/mL)				
		Min.	5 th ποσοστό	Κεντρική τιμή	95 th ποσοστό	Max.
20-30	51	219	232	288	385	644
30-40	44	140	177	245	382	405
40-50	43	64	124	199	290	336
50-60	18	71	71	147	263	284
60-70	20	94	94	141	269	269
70-80	20	72	76	117	160	167

Παιδιά

Εφηβεία (ετών)	n	IGF-I (ng/mL)			
		Μέσος όρος	Min.	Max.	
P1	0-4	5	114	49	171
	>4	27	250	76	499
P2	6	303	247	396	
P3	7	414	249	642	
P4-P5	7	400	271	550	

Παιδιά μορφολογικά μικρά

Αυτά τα παιδιά έχουν ένα ύψος που είναι χαμηλότερο από δύο τυπικές αποκλίσεις ή υψηλότερο από το μέσο όρο με συγκέντρωση GH μεγαλύτερη από 20 mIU/L μετά από το ερεθισμό, και ένα κανονικό ποσοστό αύξησης.

Εφηβεία (ετών)	n	IGF-I (ng/mL)			
		Μέσος όρος	Min.	Max.	
P1	0-4	13	114	98	180
	5-7	25	115	98	156
	8-9	21	129	76	186
	10-11	24	151	76	234
	>12	27	198	131	278
P2	20	258	163	502	
P3	14	351	185	617	
P4	9	423	272	540	

10. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΠΟΔΟΣΗΣ

(βλέπε τη σελίδα APPENDIX για περισσότερες λεπτομέρειες)

10.1 Ευαισθησία : 2 ng/mL

10.2 Εξειδίκευση

Το αντισώμα που χρησιμοποιείται σε αυτή την εξέταση είναι υψηλά εξειδικευμένο για την IGF-I. Εξαιρετικά χαμηλές διασταυρωτές αντιδραστικότητες βρέθηκαν με ορισμένα συγγενή μόρια (ινσουλίνη, προινσουλίνη, IGF II, GH).

10.3 Ακρίβεια

10.3.1 Intra-assay

Δείγματα εξετάστηκαν δύο φορές το καθένα σε 25 διαφορετικές σειρές. Οι συντελεστές απόκλισης που προέκυψαν ήταν μικρότεροι ή ίσοι με 6,3%.

10.3.2 Inter-assay

Δείγματα εξετάστηκαν δύο φορές το καθένα σε 25 διαφορετικές σειρές. Οι συντελεστές απόκλισης που προέκυψαν ήταν μικρότεροι ή ίσοι με 6,8%.

10.4 Ακρίβεια

10.4.1 Δοκιμή αραιώσης

Δείγματα υψηλής συγκέντρωσης αραιώθηκαν στο μηδενικό βαθμονομητής. Τα ποσοστά ανάκτησης κυμαίνονται μεταξύ 88% και 111%.

10.4.2 Δοκιμή ανάκτησης

Γνωστές ποσότητες IGF-I προστέθηκαν σε δείγματα χαμηλής συγκέντρωσης. Τα ποσοστά ανάκτησης κυμαίνονταν μεταξύ 91% και 103%.

10.5 Εύρος μέτρησης (από αναλυτική ευαισθησία έως τον υψηλότερο βαθμονομητή) : 2 – 1200 ng/mL.

11. ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η μη τήρηση των οδηγιών που περιέχονται στο έντυπο μπορεί να επηρεάσει σημαντικά τα αποτελέσματα. Τα αποτελέσματα πρέπει να ερμηνευθούν λαμβάνοντας υπόψη τη συνολική κλινική παρουσίαση της ασθενούς συμπεριλαμβανομένων της κλινικής ιστορίας, των δεδομένων από συμπληρωματικές εξετάσεις και άλλων κατάλληλων πληροφοριών.

Για προσδιορισμούς που χρησιμοποιούν αντισώματα, υπάρχει πιθανότητα παρεμβολής από ετερόφιλα αντισώματα στο δείγμα του ασθενούς. Οι ασθενείς που ήρθαν σε συχνή επαφή με ζώα ή έκαναν ανοσοθεραπεία ή διαγνωστικές επεμβάσεις με τη βοήθεια ανοσοσφαιρινών ή τμήματα ανοσοσφαιρίνης πιθανόν να παραγάγουν αντισώματα, π.χ. HAMA, που παρεμβάλλουν στους ανοσοπροσδιορισμούς.

Τα εν λόγω παρεμβάλλοντα αντισώματα πιθανόν να προκαλέσουν εσφαλμένα αποτελέσματα. Να αξιολογείτε προσεκτικά τα αποτελέσματα ασθενών που υποπτεύεστε ότι φέρουν αυτά τα αντισώματα.

6.3 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ

Βήμα 1 Προσθήκες	Βήμα 2 Επώαση	Βήμα 3 Μέτρηση
Στα επιστρωμένα σωληνάρια, προσθέστε διαδοχικά με αυτή τη σειρά: - 300 μL βαθμονομητές*, - 50 μL προτύπου, ελέγχου ή δείγματος, Ανακατέψτε.	Επώαστε 60 λεπτά στους 18-25°C με ανάδευση (350 rpm).	Αποχύστε προσεκτικά το περιεχόμενο των σωληναρίων (εκτός από τα 2 σωληνάρια «ολικές κρούσεις»). Πλύντε 2 φορές με 2 ml διαλύματος πλύσης. Μετρήστε τις δεσμευμένες (B) και τις ολικές (T) κρούσεις για 1 λεπτό.

* Προσθέστε 300 μL ιχνηθέτη στα 2 επιπλέον σωληνάρια για να βρείτε τις ολικές κρούσεις.

IVD

IRMA IGF-I

REF

A15729



certified

1. PRINCIP METODY

Imunoradiometrické stanovení IGF-I je založeno na metodě typu "sandwich". V soupravě jsou použity dvě monoklonální protilátky proti dvěma různým epitopům molekuly IGF-I které si vzájemně nekonkurují. Před stanovením je třeba nejprve uvolnit IGF-I z komplexu s jeho vazebnými proteiny. Vzorky nebo kalibrátory se pak inkubují ve zkumavkách potažených první monoklonální protilátkou společně roztokem druhé monoklonální protilátky značené ¹²⁵I. Po inkubaci se obsah zkumavek odsaje a změřit se vázaná radioaktivita. Koncentrace IGF-I v neznámých vzorcích se odečtou z kalibrační křivky. Naměřená radioaktivita je přímo úměrná koncentraci ve vzorku.

2. REAGENCIE

Všechny reagenty v soupravě jsou stabilní do data expirace, uvedeného na štítku krabice, jestliže jsou skladovány při 2-8 °C. Skladovací podmínky pro reagenty po rekonstituci nebo ředění jsou uvedeny v kapitole Postup stanovení.

- 2.1 Zkumavky potažené protilátkou proti IGF-I : 2 x 50 zkumavek** (připraveny k použití)
- 2.2 ¹²⁵I-anti-IGF-I značená protilátka : 1 lahvička 33 mL** (připravena k použití)
Lahvička obsahuje ke dni výroby 370 kBq ¹²⁵I -značeného imunoglobulinu v roztoku s hovězím sérovým albuminem, azidem sodným (<0,1%, viz kap. Upozornění) a barvivem.
- 2.3 Kalibrátory : 6 lahviček** (lyofilizované)
Lahvičky obsahují IGF-I o koncentracích od 0 do 1200 ng/mL v tlumivém roztoku s hovězím sérovým albuminem a s konzervovány. Přesné koncentrace jsou uvedeny na štítcích lahviček. Kalibrátory jsou kalibrovány na mezinárodní standard WHO 87/518.
- 2.4 Kontrolní vzorek : 1 lahvička** (lyofilizát)
Lahvička obsahuje IGF-I lyofilizovaný v hovězím sérovém albuminu. Rozsah očekávaných koncentrací je uveden na štítku lahvičky.
- 2.5 Uvolňovací pufr : 2 lahvičky 25 mL** (připravené k použití)
Lahvička obsahuje hovězí sérový albumin.
- 2.6 Promývací roztok (20x) : 1 lahvička 50 mL**
Koncentrovaný roztok musí být před použitím zředěn.

Poznámka : Teploty skladování a data expirací uvedené na štítcích jednotlivých složek se vztahují pouze k dlouhodobému skladování u výrobce před komplectací souprav. Neberte na ně tedy, prosím, ohled.

3. ZAŘÍZENÍ A POTŘEBNÝ MATERIÁL

Kromě obvyklého laboratorního zařízení je pro analýzu potřebné následující vybavení:

- Přesná mikropipeta (50 µL).
- Poloautomatická pipeta (300 µL, 1 mL).
- Vibrační míchadlo.
- Horizontální nebo orbitální třepačka (>300 kmitů/min.).
- Vývěva.
- Gama-čítač, nastavený na ¹²⁵I.

4. UPOZORNĚNÍ A BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ

4.1 Obecné poznámky:

- Nechte reagenty před pipetací vytemperovat na laboratorní teplotu.
- Nemíchejte substance ze souprav různých šarží.
- Pro každou novou sérii analýz je nutné provést novou kalibraci.
- Správné nastavení třepačky je velmi důležité pro reprodukovatelnost stanovení.
- Doporučuje se provádět stanovení v duplikátech.
- Při přidávání reagentů dodržujte uvedené pořadí.
- Zkumavky jsou pouze na jedno použití.

4.2 Základní pravidla radiacní bezpečnosti

Tento radioaktivní materiál mohou přijímat, skladovat a používat pouze pracovníci, která splňují platné zákonné předpisy upravující podmínky pro bezpečné nakládání s otevřenými radionuklidovými zářiči.

Při práci s radioaktivními látkami dodržujte následující pravidla:

- Všechny radioaktivní látky musí být skladovány v původním balení a jen na místech k tomu určených.
- Příjem a spotřeba radioaktivních látek musí být evidována.
- Práce s radioaktivními látkami musí být prováděny pouze ve vyhrazených prostorách.
- Pipetování nesmí být prováděno ústy.
- V laboratořích určených k práci s radioaktivními látkami je zakázáno jíst, pít, kouřit, líčit se a pod.,
- Obalový materiál, který není kontaminován, je možno odložit do běžného odpadu pouze po odstranění varovných nápisů a značek.
- Povrch pracovních stolů, který by mohl být kontaminován, je třeba pravidelně kontrolovat. Všechno laboratorní sklo, které bylo použito pro práci s radioaktivními látkami, musí být řádně dekontaminováno a proměřeno před dalším použitím.
- V případě kontaminace nebo úniku radioaktivního materiálu postupujte podle stanovených předpisů.
- Radioaktivní odpad likvidujte v souladu s platnými zákony a předpisy.

4.3 Azid sodný

Některé substance jsou konzervovány azidem sodným. Azid sodný může reagovat s olovem, mědí nebo mosazí za vzniku příslušných výbušných azidů. Proto likvidované reagenty splachujte velkým množstvím vody.

4.4 Lidské sérum

Se všemi vzorky séra a plazmy musí být manipulováno, jako s potenciálně infekčními (hepatitis, nebo AIDS). Veškerý vzniklý odpad je třeba likvidovat podle platných předpisů.

5. SBĚR A PŘÍPRAVA, SLADOVÁNÍ A ŘEDĚNÍ VZORKŮ

- Odebírejte vzorky krve do zkumavek bez aditiv nebo s heparinem, nebo EDTA.
- Centrifugací oddělte od buněk frakci séra nebo plazmy.
- Vzorky séra a plazmy lze uchovávat při 2-8°C, jestliže bude stanovení provedeno do 24 hodin. Při delším uchovávání je nutno vzorky zamrazit při (<-18°C), nejlépe v alikvotech, aby se předešlo opakovanému rozmrazování a zmrazování.
- Vzorky, v nichž je koncentrace IGF-I vyšší než v nejvyšším kalibrátoru, je nutno zředit disociačním pufrům.

6. POSTUP STANOVENÍ

6.1 Příprava reagentů

Vytemperujte všechny reagenty na laboratorní teplotu.

6.1.1 Příprava kalibrátorů a kontrolního vzorku

Obsah lahviček se rozpustí v destilované vodě, jejíž objem je uveden na štítku lahvičky. Po přidání vody nechejte lyofilizát volně rozpouštět 30 minut a potom lehce bez napěnění promíchejte. Roztoky je možno skladovat při 2-8°C jeden týden nebo rozdělené na alikvoty zamrazené při <-18°C do data expirace soupravy.

6.1.2 Příprava promývacího roztoku

Obsah lahvičky přidejte k 950 mL destilované vody a promíchejte. Zředěný roztok může být skladován při 2-8°C do data expirace soupravy.

6.2 Příprava vzorků a kontrolního vzorku

Neupravujte (neředte) kalibrátory.

- Do polypropylénových zkumavek přidejte postupně 50 µL vzorku a 1 mL disociačního pufru (takto upravíte 50 vzorků; smícháním polovičních množství tj. 25 µL vzorku a 500 µL pufru, ošetříte 100 vzorků).
- Promíchejte na vibračním míchadle.
- Připravené vzorky lze skladovat při 2-8 °C do 48 hodin. Při delším uchovávání je nutno vzorky zamrazit při <-18 °C.

6.3 Schéma postupu (viz tabulka na následující straně)

7. VÝSLEDKY

Výsledky se získají interpolací z kalibrační křivky, která slouží pouze pro analýzu těch vzorků, které byly inkubovány společně s kalibrátory.

7.1 Kalibrační křivka

Výsledky uvedené v návodu byly získány v semi-logaritmickém zobrazení (s použitím funkce "spline") vynesemím B/T (%) nebo B/Bmax (%) na osu y, a koncentrací IGF-I v kalibrátorech na osu x (ng/mL). Jiné vyhodnocovací metody mohou poskytovat trochu odlišné výsledky.

Total cpm: : 127559 cpm				
Kalibrátor	IGF-I (ng/mL)	cpm (n=3)	B/T (%)	B/Bmax (%)
0	0	257	0,20	0,43
1	30	1138	0,89	1,93
2	100	4496	3,52	7,65
3	300	18620	14,59	31,72
4	600	39285	30,79	66,93
5	1200	58695	46,00	100

(Příklad typického stanovení, nepoužívejte pro výpočet.)

7.2 Vzorky

Najděte pro každý kontrolní nebo neznámý vzorek hodnotu B/T(%) nebo B/Bmax (%) na ose y a odečtěte odpovídající koncentrace IGF-I na ose x v ng/mL.

8. KONTROLA KVALITY

Správná laboratorní praxe předpokládá řádné a pravidelné používání kontrolních vzorků, aby mohla být zajištěna kontrola kvality stanovených výsledků. Kontrolní vzorky musí být stanoveny naprosto stejným způsobem jako neznámé vzorky a k vyhodnocení výsledků se mají použít vhodné statistické metody.

V případě závažného poškození obalu, nebo jestliže získané výsledky nejsou ve shodě s analytickými parametry stanovení (viz kap. 10), kontaktujte prosím naše odborné pracovníky. Tel.:+420 272 017 391; fax:+420 272 017 385; e-mail: imunochem@beckmancoulter.com

9. OČEKÁVANÉ HODNOTY

Každá laborator by si měla stanovit vlastní rozmezí referenčních hodnot. Následující hodnoty byly získány u zdravých jedinců a jsou zde uvedeny pro informaci.

Dospělí

Věk (let)	n	IGF-I (ng/mL)				
		Min.	Limity pro 5% populace	Medián	Limity pro 95% populace	Max.
20-30	51	219	232	288	385	644
30-40	44	140	177	245	382	405
40-50	43	64	124	199	290	336
50-60	18	71	71	147	263	284
60-70	20	94	94	141	269	269
70-80	20	72	76	117	160	167

Děti

Stadium puberty (let)	n	IGF-I (ng/mL)			
		Průměr	Min.	Max.	
P1	0-4	5	114	49	171
	>4	27	250	76	499
P2	6	303	247	396	
P3	7	414	249	642	
P4-P5	7	400	271	550	

Děti s konstitučně malým vzrůstem

Tyto děti mají výšku, která je minimálně o dvě směrodatné odchylky nižší než průměr, po stimulaci mají hladinu GH vyšší než 20 mIU/L a pravidelnou rychlost růstu.

Stadium puberty (let)	n	IGF-I (ng/mL)			
		Průměr	Min.	Max.	
P1	0-4	13	114	98	180
	5-7	25	115	98	156
	8-9	21	129	76	186
	10-11	24	151	76	234
	>12	27	198	131	278
P2	20	258	163	502	
P3	14	351	185	617	
P4	9	423	272	540	

10. ANALYTICKÉ PARAMETRY STANOVENÍ

(podrobnosti jsou uvedeny v příloze "APPENDIX")

10.1 Analytická citlivost: 2 ng/mL

10.2 Specifita

Protilátka použitá v systému je vysoce specifická pro IGF-I. Ostatní příbuzné molekuly (insulin, proinsulin, IGF-II, GH) dávají extrémně nízkou zkříženou reakci.

10.3 Přesnost

10.3.1 Intra-assay

Vzorky byly analyzovány 25x v jednom stanovení. Nalezené hodnoty variačních koeficientů nepřesáhly 6,3%.

10.3.2 Inter-assay

Vzorky byly stanoveny v duplikátech v 25 různých stanoveních. Nalezené hodnoty variačních koeficientů nepřesáhly 6,8%.

10.4 Správnost

10.4.1 Dilution test

Sérové vzorky s vysokou koncentrací byly postupně ředěny nulovým kalibrátorem. Procento recovery se pohybovalo mezi 88% a 111%.

10.4.2 Recovery test

Známa množství IGF-I byla přidávána k sérovým vzorkům s nízkou koncentrací IGF-I. Procento recovery se pohybovalo mezi 91% a 103%.

10.5 Rozsah stanovení (od analytické citlivosti do nejvyššího kalibrátoru) : 2 – 1200 ng/mL.

11. OMEZENÍ METODIKY

Nedodržení instrukcí uvedených v tomto návodu může vést k nesprávným výsledkům. Výsledky stanovení by měly být interpretovány ve světle celkového klinického obrazu pacienta včetně anamnézy, údajů z dalších testů a jiných vhodných informací.

U stanovení využívajících protilátky existuje možnost interference heterofilních protilátek přítomných v pacientském vzorku. Pacienti, kteří byli pravidelně ve styku se zvířaty nebo podstoupili imunoterapii nebo diagnostické procedury využívající imunoglobuliny nebo fragmenty imunoglobulinů, mohou produkovat protilátky jako například HAMA (Human Anti-Mouse Antibodies - lidské protilátky proti myším proteinům), které interferují při imunologických stanoveních.

Takové interferující protilátky mohou vést k chybným výsledkům. Výsledky pacientů, u nichž existuje podezření na přítomnost takovýchto protilátek, posuzujte s opatrností.

6.3 SCHEMA POSTUPU STANOVENÍ

Krok 1 Pipetace	Krok 2 Inkubace	Krok 3 Měření
<p>Do potažených zkumavek přidejte v uvedeném pořadí:</p> <ul style="list-style-type: none"> - 300 µL radioindikátoru * - 50 µL kalibrátoru, kontrolního nebo neznámého vzorku, <p>Promíchejte.</p>	<p>Inkubujte 60 minut při 18-25°C za stálého třepání (350 kmitů/min).</p>	<p>Opatrně odsajte obsah každé zkumavky (s výjimkou 2 zkumavek pro T).</p> <p>2 x promyjte 2 mL promývacího roztoku a odsajte.</p> <p>Měřte po dobu 1 min. vázanou aktivitu (B) a celkovou aktivitu (T).</p>

* Připravte si odděleně dvě zkumavky a napipetujte do nich po 300 µL radioindikátoru pro určení celkové aktivity (T).



IN VITRO IMUNORÁDIOMETRICKÉ STANOVENIE

INZULÍNU PODOBNÉHO RASTOVÉHO FAKTORA-I V ĽUDSKOM SÉRE A PLAZME



1. PRINCÍP METÓDY

Imunorádiometrické stanovenie IGF-I je založené na metóde typu "sandwich". V súprave sú použité dve monoklonálne protilátky proti dvom rôznym epitopom molekuly IGF-I, ktoré si navzájom nekonkurujú. Pred stanovením treba najprv uvoľniť IGF-I z komplexu s jeho väzobnými proteínmi. Vzorky alebo kalibrátory sa potom inkubujú v skúmavkách potiahnutých prvou monoklonálnou protilátkou spoli s roztokom druhej monoklonálnej protilátky označenej ¹²⁵I. Po inkubácii sa obsah skúmaviek odsaje a zmeria sa naviazaná rádioaktivita. Koncentrácie v neznámych vzorkách sa odčítajú z kalibračnej krivky. Koncentrácia IGF-I vo vzorkách je priamo úmerná nameranej aktivite.

2. REAGENCIE

Všetky reagencie v súprave sú stabilné do dátumu expirácie, uvedeného na štítku krabice, ak sú skladované pri 2-8 °C. Skladovacie podmienky pre reagencie po rekonštitúcii alebo riedení sú uvedené v kapitole Postup stanovenia.

- 2.1 Skúmavky potiahnuté protilátkou proti IGF-I : 2x 50 skúmaviek** (pripravené na použitie)
- 2.2 Monoklonálna protilátka proti IGF-I označená ¹²⁵I : 1 fľaštička 33 mL** (pripravená na použitie)
Fľaštička obsahuje ku dňu výroby 370 kBq ¹²⁵I označeného imunoglobulínu v roztoku s hovädzím sérovým albumínom, azidom sodným (<0,1%, vid' kap. Upozornenie) a farbivom.
- 2.3 Kalibrátory : 6 fľaštičiek** (lyofilizované)
Fľaštičky obsahujú IGF-I s koncentraciami od 0 do 1200 ng/mL v tlmivom roztoku s hovädzím sérovým albumínom a konzervované. Presné koncentrácie sú uvedené na štítkoch fľaštičiek. Kalibrátory sú kalibrované na medzinárodný štandard WHO 87/518.
- 2.4 Kontrolná vzorka : 1 fľaštička** (lyofilizát)
Fľaštička obsahuje IGF-I lyofilizovaný v hovädzom sérovom albumíne. Koncentračné rozsahy očakávaných hodnôt sú uvedené na štítku fľaštičky.
- 2.5 Uvoľňovací pufo** : 2 fľaštičky 25 mL (pripravené na použitie)
Fľaštička obsahuje hovädzi sérový albumín.
- 2.6 Premývací roztok (20x) : 1 fľaštička 50 mL**
Konzentrovateľný roztok sa musí pred použitím zriediť.

Poznámka : Teploty skladovania a dátumy expirácií uvedené na štítkoch jednotlivých zložiek sa vzťahujú iba na dlhodobé skladovanie u výrobcu pred kompletizáciou súprav. Neberte na ne, prosím, ohľad.

3. ZARIADENIE A POTREBNÝ MATERIÁL

Okrem obvyklého laboratórneho zariadenia je pre analýzu potrebné nasledujúce vybavenie:

- Presná mikropipeta (50 µL).
- Poloautomatická pipeta (300µL, 1mL).
- Vibračné miešadlo.
- Výveva.
- Horizontálna alebo orbitálna trepačka (>300 kmitov/min.).
- Gama-merač kalibrovaný na ¹²⁵I.

4. UPOZORNENIA A BEZPEČNOSTNÉ OPATRENIA

4.1 Všeobecné poznámky:

- Nechajte reagencie pred pipetovaním vyteperovať na laboratórnu teplotu.
- Nemiešajte substancie zo súprav rôznych šarží.
- Pre každú novú sériu analýz treba urobiť novú kalibráciu.
- Správne nastavenie trepačky je veľmi dôležité pre reprodukovateľnosť stanovení.
- Doporučuje sa robiť stanovenia v duplikátoch.
- Pri pridávaní reagencií dodržujte poradie.
- Skúmavky sú iba na jedno použitie.

4.2 Základné pravidlá radiáčnej bezpečnosti

Tento rádioaktívny materiál môžu prijímať, skladovať a používať iba pracovníci, ktorí spĺňajú platné zákonné predpisy upravujúce podmienky pre bezpečné nakladanie s otvorenými rádionuklidovými zariadeniami.

Pri práci s rádioaktívnymi látkami dodržujte nasledujúce pravidlá:

- Všetky rádioaktívne látky sa musia skladovať v pôvodnom balení a iba na miestach k tomu určených.
- Prijem a spotreba rádioaktívnych látok musia byť evidované.
- Práce s rádioaktívnymi látkami sa musia robiť iba vo vyhradených priestoroch.
- Nesmie sa pipetovať ústami.
- V laboratóriách určených na prácu s rádioaktívnymi látkami je zakázané jesť, piť, fajčiť, líčiť sa a pod.
- Obalový materiál, ktorý nie je kontaminovaný, možno odložiť do bežného odpadu až po odstránení výstražných nápisov a značiek.
- Povrch pracovných stolov, ktorý by mohol byť kontaminovaný, treba pravidelne kontrolovať.
- V prípade kontaminácie alebo úniku rádioaktívneho materiálu postupujte podľa stanovených predpisov.
- Rádioaktívny odpad likvidujte v súlade s platnými zákonmi a predpismi.

4.3 Azid sodný

Niektoré substancie sú konzervované azidom sodným. Azid sodný môže reagovať s olovom, meďou alebo mosadzou za vzniku príslušných výbušných azidov. Preto likvidované reagencie splachujte veľkým množstvom vody.

4.4 Ľudské sérum

So všetkými krvnými vzorkami sa musí manipulovať ako s potenciálne infekčnými (hepatitis alebo AIDS). Všetok vzniknutý odpad treba likvidovať podľa platných predpisov.

5. ZBER A PRÍPRAVA, SKLADOVANIE A RIEDENIE VZORIEK

- Odoberajte vzorky krvi do skúmaviek bez aditív alebo s heparínom, alebo EDTA.
- Centrifugáciou oddelte od buniek frakciu séra alebo plazmy.
- Vzorky séra a plazmy sa môžu skladovať pri 2-8 °C, ak sa stanovenie urobí do 24 hodín. Pri dlhšom skladovaní treba vzorky zmraziť pri <-18°C, najlepšie v alikvótoch, aby sa zabránilo opakovanému zmrazovaniu a rozmrazovaniu.
- Ak majú vzorky vyššiu koncentráciu PTH ako je koncentrácia najvyššieho kalibrátora, treba ich zriediť disociačným pufo.

6. POSTUP STANOVENIA

6.1. Príprava reagencií

Vyteperujte všetky reagencie na laboratórnu teplotu.

6.1.1 Príprava kalibrátorov a kontrolnej vzorky

Obsah fľaštičiek sa rozpustí v objeme destilovanej vody, ktorý je uvedený na štítku fľaštičky. Po pridaní vody nechajte lyofilizáty voľne sa rozpúšťať 30 minút a potom ich ľahko, bez napenenia, premiešajte. Roztoky možno skladovať pri 2-8 °C jeden týždeň, alebo zmrazené v alikvótoch pri <-18°C do dátumu expirácie súpravy.

6.1.2 Príprava premývacieho roztoku

Obsah fľaštičky pridajte k 950 mL destilovanej vody a premiešajte. Zriedený roztok sa môže skladovať pri 2-8 °C do dátumu expirácie súpravy.

6.2 Príprava vzoriek a kontrolnej vzorky

Neupravujte (neriedte) kalibrátory

- Do polypropylénových skúmaviek pridajte postupne 50 µL vzorky a 1 mL disociačného pufru (takto upravíte 50 vzoriek; zmiešaním polovických množstiev, t.j. 25 µL vzorky a 500 µL pufru upravíte 100 vzoriek).
- Premiešajte na vibračnom miešadle.
- Pripravené vzorky sa môžu skladovať pri 2-8 °C do 48 hodín. Pri dlhšom skladovaní treba vzorky zmraziť pri <-18°C.

6.3 Schéma postupu (vid' tabuľka na nasledujúcej strane)

7. VÝSLEDKY

Výsledky sa získajú interpoláciou z kalibračnej krivky, ktorá sa používa iba pre analýzu tých vzoriek, ktoré sa inkubovali spolu s kalibrátormi.

7.1 Kalibračná krivka

Výsledky uvedené v návode sa získali v semi-logaritmickej zobrazení (s použitím funkcie "spline") vynesím hodnot B/T (%) alebo B/B_{max} (%) na os y a koncentrácií IGF-I v kalibrátoroch na os x (ng/mL). Iné vyhodnocovacie metódy môžu poskytovať trochu odlišné výsledky.

Total cpm: 127559cpm				
Kalibrátor	IGF-I (ng/mL)	cpm (n=3)	B/T (%)	B/B _{max} (%)
0	0	257	0,20	0,43
1	30	1138	0,89	1,93
2	100	4496	3,52	7,65
3	300	18620	14,59	31,72
4	600	39285	30,79	66,93
5	1200	58695	46,00	100

(Príklad kalibračnej krivky, nepoužívajte pre vyhodnotenie.)

7.2 Vzorky

Nájdite pre každú kontrolnú alebo neznámu vzorku hodnotu B/T (%) alebo B/B_{max}(%) na osi y a odčítajte odpovedajúce koncentrácie IGF-I na osi x v pg/mL.

8. KONTROLA KVALITY

Správna laboratórna prax predpokladá riadne a pravidelné používanie kontrolných vzoriek, aby mohla byť zaistená kontrola kvality stanovených výsledkov. Kontrolné vzorky sa musia stanoviť úplne rovnakým spôsobom ako neznáme vzorky a na vyhodnotenie výsledkov sa majú použiť vhodné štatistické metódy.

V prípade závažného poškodenia obalu, alebo ak získané výsledky nie sú v zhode s analytickými parametrami stanovenia (viď kap. 10), kontaktujte prosím našich odborných pracovníkov.

Tel.:+421 2 54774306; fax:+421 2 54774930;

e-mail: beckman.sk@beckmancoulter.com

9. OČAKÁVANÉ HODNOTY

Každé laboratórium by si malo stanoviť vlastný rozsah referenčných hodnôt. Uvádzané hodnoty sa získali od zdravých jedincov a sú iba informačné.

Dospelí

Vek (rokov)	n	IGF-I (ng/mL)				
		Min.	Limity pre 5% populácie	Medián	Limity pre 95% populácie	Max.
20-30	51	219	232	288	385	644
30-40	44	140	177	245	382	405
40-50	43	64	124	199	290	336
50-60	18	71	71	147	263	284
60-70	20	94	94	141	269	269
70-80	20	72	76	117	160	167

Deti

Stádium puberty (roky)	n	IGF-I (ng/mL)			
		Priemer	Min.	Max.	
P1	0-4	5	114	49	171
	>4	27	250	76	499
P2	6	303	247	396	
P3	7	414	249	642	
P4-P5	7	400	271	550	

Deti s konštitučne malým vzrastom

Tieto deti majú výšku, ktorá je minimálne o dve smerodajné odchytky nižšia ako priemer, po stimulácii majú hladinu GH vyššiu než 20 mIU/L a pravidelnú rýchlosť rastu.

Stádium puberty (roky)	n	IGF-I (ng/mL)			
		Priemer	Min.	Max.	
P1	0-4	13	114	98	180
	5-7	25	115	98	156
	8-9	21	129	76	186
	10-11	24	151	76	234
	>12	27	198	131	278
P2	20	258	163	502	
P3	14	351	185	617	
P4	9	423	272	540	

10. ANALYTICKÉ PARAMETRE STANOVENIA

(podrobnosti sú uvedené v prílohe "APPENDIX")

10.1 Analytická citlivosť: 2 ng/mL

10.2 Špecifita

Protilátka použitá v systéme je vysoko špecifická pre IGF-I. Ostatné príbuzné molekuly (inzulín, proinzulín, IGF-II, GH) dávajú extrémne nízke skrížené reakcie.

10.3 Presnosť

10.3.1 Intra-assay

Vzorky sa analyzovali 25x v jednom stanovení. Nájdene hodnoty variačných koeficientov nepresiahli 6,3%.

10.3.2 Inter-assay

Vzorky sa stanovovali v duplikátoch v 25 rôznych stanoveniach. Nájdene hodnoty variačných koeficientov nepresiahli 6,8%.

10.4 Správnosť

10.4.1 Test riedenia

Sérové vzorky s vysokou koncentráciou sa postupne riedili nulovým kalibrátorom. Percento recovery sa pohybovalo medzi 88% a 111%.

10.4.2 Recovery test

Známe množstvá IGF-I sa pridávali k sérovým vzorkám s nízkou koncentráciou IGF-I. Percento recovery sa pohybovalo medzi 91% a 103%.

10.5 Rozsah merania (od analytickej citlivosti po najvyšší kalibrátor) : 2 – 1200 ng/mL.

11. OBMEDZENIE METODIKY

Nedodržanie inštrukcií uvedených v tomto návode môže viesť k nesprávnym výsledkom. Výsledky stanovenia by sa mali interpretovať v súlade s celkovým klinickým obrazom pacienta vrátane anamnézy, údajov z ďalších testov a iných vhodných informácií.

Pri stanoveniach využívajúcich protilátky existuje možnosť interferencie heterofilných protilátok prítomných v patientskej vzorke. Pacienti, ktorí pravidelne prichádzali do kontaktu so zvieratami alebo užívali imunoterapiu, prípadne podstúpili diagnostické procedúry využívajúce imunoglobulíny alebo fragmenty imunoglobulínov, môžu produkovať protilátky, napríklad ľudské protilátky proti myšim proteínom (HAMA), ktoré interferujú pri imunologických stanoveniach.

Také interferujúce protilátky môžu mať za následok chybné výsledky. Výsledky pacientov, u ktorých existuje podozrenie na prítomnosť takýchto protilátok, posudzujte s opatnosťou.

6.3 POSTUP STANOVENIA

Krok 1 Pipetácia	Krok 2 Inkubácia	Krok 3 Meranie
Do potiahnutých skúmaviek pridajte v uvedenom poradí: - 300 µL rádioindikátora* a - 50 µL kalibrátora, kontrolnej alebo neznámej vzorky. Premiešajte.	Inkubujte 60 minút pri 18-25°C za stáleho trepania (350 kmitov/min.)	Pozorne odsajte obsah každej skúmavky (s výnimkou 2 skúmaviek T). 2x premyte 2 mL premývacieho roztoku a odsajte. Merajte 1 minútu viazanú aktivitu (B) a celkovú aktivitu (T)

* Napipetujte po 300 µL rádioindikátora do 2 nepotiahnutých skúmaviek na zistenie celkovej aktivity (T).



**НАБОР ДЛЯ ИММУНОРАДИОМЕТРИЧЕСКОГО IN VITRO ОПРЕДЕЛЕНИЯ
ИНСУЛИНОПОДОБНОГО ФАКТОРА РОСТА I В СЫВОРОТКЕ И ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА**



1. ПРИНЦИП МЕТОДА

Иммунорадиометрическое определение IGF-I относится к анализам типа "сэндвич", в котором используется пара мышиных моноклональных антител к различным эпитопам его молекулы. Для высвобождения IGF-I из комплексов со связывающими белками предварительно проводится стадия диссоциации. Анализируемые образцы, контрольные и калибровочные пробы инкубируют в пробирках, покрытых одним видом моноклональных антител, в присутствии второго вида моноклональных антител, меченных йодом ¹²⁵I. Затем удаляют содержимое пробирок и измеряют связанную активность ¹²⁵I. Концентрацию IGF-I, прямо пропорциональную связанной активности, определяют методом интерполяции по калибровочной кривой.

2. РЕАГЕНТЫ, ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ НАБОРА

Все реагенты стабильны при 2-8°C до окончания срока годности набора. Условия хранения компонентов набора после их растворения или разбавления указаны в разделе "Процедура анализа".

- 2.1 Пробирки, покрытые антителами к IGF-I : 2x50 шт.** (готовы к использованию)
- 2.2 Метка, антитела к IGF-I, меченные ¹²⁵I : 1 флакон, 33 мл** (готова к использованию)
На дату изготовления флакон содержит не более 370 кБк ¹²⁵I-иммуноглобулинов в буфере с бычьим сывороточным альбумином, азидом натрия (<0,1%, см. п. Меры предосторожности) и красителем.
- 2.3 Калибровочные пробы : 6 флаконов** (лиофилизированные препараты)
Калибровочные пробы содержат IGF-I в диапазоне концентраций от 0 до 1200 нг/мл в буфере с бычьим сывороточным альбумином и консервантами. Точные концентрации, калиброванные по международному стандарту WHO 87/518, указаны на этикетках флаконов.
- 2.4 Контрольная сыворотка : 1 флакон** (лиофилизированный препарат)
Флакон содержит известное количество IGF-I, лиофилизованного в буфере с бычьим сывороточным альбумином. Ожидаемый диапазон концентраций указан на этикетке флакона.
- 2.5 Буфер для диссоциации : 2 флакона по 25 мл** (готовы к использованию)
Препарат содержит бычий сывороточный альбумин
- 2.6 Промывочный раствор (20x) : 1 флакон, 50 мл.**
Концентрированный раствор должен быть разведен перед использованием.

Внимание : Температура и сроки годности, указанные на этикетках флаконов с реагентами, относятся только к их хранению в производственных условиях вплоть до момента комплектации набора и не распространяются на полученную пользователем продукцию.

3. ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Помимо стандартного лабораторного оборудования необходимо иметь следующее:

- микропипетка (50 мкл)
- полуавтоматическая пипетка (300 мкл, 1 мл)
- вихревой смеситель типа vortex
- горизонтальный или орбитальный встряхиватель (не менее 300 осц./мин.)
- водоструйный насос
- гамма-счетчик для измерения активности ¹²⁵I.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- 4.1 Общие замечания:**
 - Перед использованием довести реагенты до комнатной температуры.
 - Не смешивать реагенты из наборов разных серий.
 - Анализ калибровочных проб должен проводиться одновременно с исследуемыми образцами.
 - Для получения воспроизводимых результатов очень важно соблюдать рекомендуемые условия встряхивания пробирок.
 - Анализ рекомендуется проводить в дубликатах.
 - Необходимо строго соблюдать порядок внесения реагентов.
 - Пробирки только для одноразового применения.
- 4.2 Основные правила обращения с радиоактивными веществами.**
Получение, использование и транспортировка радиоактивных материалов должны происходить в соответствии с принятыми в данной стране нормами радиационной безопасности и санитарными правилами работы с радиоактивными веществами.

- В лабораториях запрещается принимать пищу, курить, пользоваться косметикой.
- Не пипетировать растворы радиоактивных веществ ртом.
- Для ограничения контакта с радиоактивными материалами рекомендуется использовать разовые перчатки и лабораторную спецодежду.
- Все манипуляции с радиоактивными веществами следует проводить в специально оборудованных для этого помещениях, удаленных от мест постоянного пребывания людей.
- Радиоактивные вещества следует хранить с использованием контейнеров в специально отведенных для этого местах.
- Необходимо регистрировать поступление и расход радиоактивных материалов.
- Лабораторное оборудование и посуду следует хранить отдельно, чтобы предотвратить их загрязнение радиоактивными изотопами.
- Любой случай радиоактивного загрязнения или исчезновения радиоактивного материала должен рассматриваться в соответствии с законодательством.
- Утилизация радиоактивных отходов должна осуществляться в соответствии с законодательством.

4.3 Азид натрия

Некоторые компоненты набора содержат азид натрия в качестве консерванта. Вступая в реакцию со свинцом, медью и латунью, азид натрия образует взрывоопасные азиды металлов. Отработанные реагенты следует разбавлять большим количеством водопроводной воды, после чего их можно сливать в канализацию.

4.4 Сыворотка крови

С исследуемыми образцами сыворотки или плазмы крови следует обращаться как с потенциально инфекционным материалом, могущим содержать вирусы СПИД и гепатита. Весь использованный материал должен быть уничтожен по действующим государственным правилам и инструкциям.

5. ПОЛУЧЕНИЕ, ОБРАБОТКА, ХРАНЕНИЕ И РАЗВЕДЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

- Собрать кровь в чистые сухие пробирки, или в пробирки с добавлением гепарина, ЭДТА или цитрата натрия.
- Отделить сыворотку/плазму от клеток крови центрифугированием.
- Образцы сыворотки и плазмы можно хранить при 2-8°C в течение 24 часов. Для более длительного хранения их необходимо разделить на аликвоты и заморозить при температуре < -18°C. Избегать повторного замораживания-оттаивания проб.
- Если концентрация IGF-I в анализируемом образце превышает максимальную калибровочную пробу, его следует развести буфером для диссоциации и провести анализ повторно.

6. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

6.1 Подготовка реагентов

Довести все реагенты до комнатной температуры.

6.1.1 Растворение калибровочных проб и контрольных сывороток

Растворить содержимое флаконов в объеме дистиллированной воды, указанной на этикетках. Через 30 минут аккуратно перемешать, избегая образования пены. Подготовленные к работе калибровочные и контрольные пробы можно хранить при 2-8°C, в течение недели, или разделенные на аликвоты при <-18°C до окончания срока годности набора.

6.1.2 Подготовка промывочного раствора

Тщательно смешать содержимое флакона с концентратом и 950 мл дистиллированной воды. Подготовленный к работе промывочный раствор можно хранить при 2-8°C до окончания срока годности набора.

6.2 Подготовка анализируемых проб и контрольных образцов

Калибровочные пробы не обрабатывать (не разводить).

- В полипропиленовые пробирки внести последовательно 50 мкл образца и 1 мл буфера для диссоциации (таким образом можно обработать 50 проб; для обработки 100 проб необходимо 25 мкл образца и 500 мкл буфера).
- Перемешать содержимое на вихревом смесителе.
- Подготовленные к анализу образцы можно хранить при 2-8°C в течение 48 часов, или при <-18°C в течение длительного времени.

6.3 Процедура анализа (см. таблицу на следующей странице)

7. РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты рассчитывают методом интерполяции по калибровочной кривой, полученной одновременно с анализом неизвестных образцов.

7.1 Калибровочная кривая

Результаты, приведенные в этой инструкции, получены при построении калибровочной кривой в полулогарифмических координатах ("сплайн" функция) с соотношением В/Т (%) или В/Вмакс. (%) по вертикальной оси и концентрацией IGF-I (нг/мл) по горизонтальной оси калибровочного графика. Другие методы обсчета могут давать несколько отличающиеся результаты.

Общий счет : 127559 имп./мин.				
Кал. пробы	IGF-I (нг/мл)	Имп./мин. (n=3)	В/Т (%)	В/Вмакс. (%)
0	0	257	0,20	0,43
1	30	1138	0,89	1,93
2	100	4496	3,52	7,65
3	300	18620	14,59	31,72
4	600	39285	30,79	66,93
5	1200	58695	46,00	100

(Пример типичной калибровочной кривой. Не использовать для обсчета результатов.)

7.2 Образцы

Для каждого образца найти на вертикальной оси калибровочного графика соотношение В/Т (%) или В/Вмакс. (%), а на горизонтальной оси соответствующую концентрацию IGF-I в пг/мл.

8. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

В соответствии с требованиями Good laboratory practices для контроля качества проводимых исследований следует регулярно использовать контрольные образцы, которые должны проходить те же стадии анализа, что и анализируемые пробы. Результаты контроля качества рекомендуется обрабатывать с помощью специальных статистических методов.

В случае серьезного повреждения упаковки, или в случае несоответствия полученных результатов аналитическим характеристикам (см.п.10) обратитесь, пожалуйста, к нашим специалистам: Тел.: +420 272 017 391; Факс: +420 272 017 385; e-mail: imunochem@beckmancoulter.com. Тел.: +7 495 937 1664; Факс: +7 495 254 64 07; e-mail: beckman.ru@beckmancoulter.com.

9. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

В каждой лаборатории рекомендуется установить собственные уровни IGF-I, соответствующие нормальным. Приведенные ниже значения являются ориентировочными.

Взрослые

Возраст (лет)	n	IGF-I (нг/мл)				Максимум
		Минимум	Пограничные значения для 5% популяции	Медиана	Пограничные значения для 95% популяции	
20-30	51	219	232	288	385	644
30-40	44	140	177	245	382	405
40-50	43	64	124	199	290	336
50-60	18	71	71	147	263	284
60-70	20	94	94	141	269	269
70-80	20	72	76	117	160	167

Дети

Стадия полового развития (лет)	n	IGF-I (нг/мл)			
		Среднее значение	Минимум	Максимум	
P1	0-4	5	114	49	171
	>4	27	250	76	499
P2	6	303	247	396	
P3	7	414	249	642	
P4-P5	7	400	271	550	

Дети с замедленным конституционным развитием

Данные дети имеют рост на два и более стандартных отклонения ниже, чем средний рост в контрольной группе, концентрацию СТГ после стимулирующего теста, превышающую 20 мМЕ/л, и постоянную скорость роста.

Стадия полового развития (лет)	n	IGF-I (нг/мл)			
		Среднее значение	Минимум	Максимум	
P1	0-4	13	114	98	180
	5-7	25	115	98	156
	8-9	21	129	76	186
	10-11	24	151	76	234
	>12	27	198	131	278
P2	20	258	163	502	
P3	14	351	185	617	
P4	9	423	272	540	

10. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

(более подробная информация приведена в разделе APPENDIX)

10.1 Чувствительность : 2 нг/мл

10.2 Специфичность

Антитела, используемые в данном наборе, имеют высокую специфичность к IGF-I. Перекрестная реакция с рядом близкородственных соединений (инсулин, проинсулин, IGF II, СТГ) очень мала.

10.3 Воспроизводимость

10.3.1 Внутри анализа

Образцы анализировали в 25 репликатах в одной серии определений. Коэффициент вариации измеренного уровня IGF-I в сыворотке крови не превышал 6,3%.

10.3.2 Между анализами

Анализ образцов в дубликатах проводили в 25 различных сериях определений. Коэффициент вариации измеренного уровня IGF-I в сыворотке крови не превышал 6,8%.

10.4 Точность

10.4.1 Тест на разведение

Образцы сыворотки крови с высокой концентрацией IGF-I разводили нулевой калибровочной пробой. Процент "открытия" составил 88% - 111%.

10.4.2 Тест на "открытие"

Известные количества IGF-I добавляли к образцам сыворотки крови с низкой его концентрацией. Измеренная величина "открытия" составляла 91% - 103%.

10.5 Диапазон определений (от аналитической чувствительности до значения наивысшей калибровочной пробы) : 2 – 1200 нг/мл.

11. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

Нарушение методики проведения анализа может привести к искажению результатов исследования. Результаты определения должны быть интерпретированы в свете общей клинической картины пациента, включая анамнез, данные других тестов и подходящую иную информацию.

При выполнении анализов с использованием антител возможна интерференция гетерофильными антителами в пробе пациента. У пациентов, имеющих постоянный контакт с животными или проходивших иммунотерапию или диагностические процедуры с использованием иммуноглобулинов или их фрагментов, могут вырабатываться антитела (т.е. НАМА), которые влияют на результаты иммунного анализа.

Влияние этих антител может привести к получению ошибочных результатов. Тщательно проверяйте результаты анализов пациентов с подозрением на наличие этих антител.

6.3 ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

Стадия 1 Внесение реагентов	Стадия 2 Инкубация	Стадия 3 Измерение результатов
<p>В покрытые антителами пробирки последовательно внести:</p> <ul style="list-style-type: none"> - 300 мкл метки*, - 50 мкл калибровочных, контрольных и анализируемых проб, <p>Перемешать.</p>	<p>Инкубировать 60 минут при 18-25°C и постоянном встряхивании (350 осц./мин.)</p>	<p>Тщательно удалить содержимое пробирок (кроме проб Т).</p> <p>Промыть пробирки 2 раза по 2 мл промывочного раствора.</p> <p>Измерить связанную (В) и общую (Т) активность ¹²⁵I (имп./мин.) в течение 1 минуты.</p>

* В две дополнительные пробирки внести по 300 мкл метки для оценки общей активности ¹²⁵I (пробы «Т»).



**IMMUNORADIOMETRYCZNA METODA DO OZNACZANIA IN VITRO
I INSULINOPODOBNEGO CZYNNIKA WZROSTU W LUDZKIEJ SUROWICY I OSOCZU**



1. ZASADA METODY

Metoda radioimmunometryczna do oznaczania insulino podobnego czynnika wzrostu 1 (IGF-1) jest metodą „kanapkową”. W zestawie użyto dwa monoklonalne mysie przeciwciała skierowane przeciw dwóm różnym epitopom IGF-1, a więc nie kompetycyjne. Pierwszym etapem jest dysocjacja, w celu uwolnienia IGF-1 z białka wiążącego. Próbkę i kalibratory są inkubowane w probówkach pokrytych pierwszym przeciwciałem monoklonalnym w obecności drugiego przeciwciała monoklonalnego znakowanego ¹²⁵J. Po inkubacji zawartość płynna próbek jest usuwana, a związana radioaktywność jest oznaczana w liczniku gamma. Stężenie IGF-1 w danej próbce jest odczytywane z krzywej standardowej. Jego stężenie w próbce jest wprost proporcjonalne do jej radioaktywności.

2. ODCZYNNIKI W ZESTAWIE

Wszystkie odczynniki zestawu są stabilne zgodnie z datą ich ważności umieszczoną na opakowaniu, pod warunkiem przechowywania ich w temperaturze 2-8°C. Warunki przechowywania odczynników odtworzonych lub rozcieńczonych są podane w paragrafie Procedura Oznaczania.

2.1 Probówki pokryte przeciwciałami monoklonalnymi przeciw IGF-1: 2 x 50 probówek (gotowy do użycia)

2.2 Znakowane ¹²⁵J przeciwciało monoklonalne przeciw IGF-1: 1 fiołka 33 mL (gotowy do użycia)

Fiołka zawiera 370 kBq, w dniu produkcji, znakowanej ¹²⁵J immunoglobuliny w płynnej formie z albuminą bydlęcej surowicy i z azydem sodu (<0.1%; patrz § Środki Ostrożności) oraz z barwnik.

2.3 Kalibratory : 6 fiołek (liofilizat)

Fiołki z kalibratorami zawierają od 0 do 1200 ng/mL IGF-1 w buforze zawierającym z albuminą bydlęcej surowicy i azydem sodu (<0.1%; patrz § Środki Ostrożności). Właściwe stężenia są podane na etykiecie znajdującej się na każdej fiołce. Kalibratory są kalibrowane według międzynarodowego referencyjnego standardu WHO 87/518.

2.4 Surowice kontrolne: 1 fiołka (liofilizat)

Fiołki zawierają liofilizowane IGF-1 w bydlęcej surowicy. Oczekiwany zakres wartości stężeń podano na etykiecie fiołek.

2.5 Bufor do dysocjacji: 2 fiołki po 25 mL (gotowe do użycia)

Roztwór zawiera albuminę bydlęcej surowicy.

2.6 Płyn do płukania (20x): 1 fiołka, 50 mL

Koncentrat musi być rozcieńczony przed użyciem.

Uwaga: Temperatury i daty ważności są wydrukowane tylko na etykietach fiołek z przedłużonym okresem przechowywania składników przez producenta. Nie należy brać ich pod uwagę.

3. MATERIAŁY WYMAGANE ALE NIE DOSTARCZANE

Poza standardowym wyposażeniem laboratorium wymagane są następujące urządzenia:

- Dokładna mikropipeta (50 µL).
- Półautomatyczna pipeta (300 µL; 1 mL).
- Mieszadło wirowe („vortex”).
- Pozioma lub orbitalna wytrząsarka (min. 300 rpm).
- System odciągający.
- Licznik gamma do ¹²⁵J.

4. ŚRODKI OSTROŻNOŚCI

4.1 Ogólne uwagi

- Wszystkie odczynniki przed pipetowaniem należy doprowadzić do temperatury pokojowej.
- Nie należy mieszać odczynników z różnych serii produkcyjnych.
- Krzywa standardowa musi być wykonana podczas każdego oznaczania.
- Właściwe nastawienie wytrząsarki jest bardzo ważne dla powtarzalności wyników.
- Zalecane jest wykonywanie oznaczeń w duplikatach
- Każda próbka może być użyta tylko raz.
- Kategorycznie należy przestrzegać właściwej kolejności dodawania odczynników.

4.2 Podstawowe zasady bezpieczeństwa podczas postępowania z promieniowaniem

Wejście w posiadanie, używanie, utylizacja i transfer materiałów radioaktywnych powinno być zgodne z prawem obowiązującym w kraju użytkownika. Przestrzeganie podstawowych zasad bezpieczeństwa przy stosowaniu materiałów radioaktywnych powinno zapewnić odpowiednią ochronę:

- Nie jeść, nie pić, nie palić wyrobów tytoniowych, nie aplikować kosmetyków w obecności materiałów radioaktywnych.

- Nie pipetować radioaktywnych rozтворów przy użyciu ust.
- Unikać wszelkiego kontaktu z materiałami radioaktywnymi poprzez stosowanie rękawic i ubrań ochronnych
- Wszystkie czynności przy użyciu materiałów radioaktywnych powinny być wykonywane w przeznaczonym do tego celu miejscu, znajdującym się w odpowiedniej odległości od korytarzy i innych pomieszczeń.
- Materiały radioaktywne powinny być przechowywane w zabezpieczonym pojemniku.
- Należy zapisać datę przyjęcia radioaktywnych produktów, a czas ich przechowywania powinien być zgodny z odpowiednim terminem.
- Sprzęt laboratoryjny i naczynia, które uległy kontaminacji powinny być oddzielone od pozostałych, aby nie spowodować kontaminacji krzyżowej różnymi radioizotopami
- W sytuacji zanieczyszczenia radioizotopami i/lub zgubieniu radioaktywnego materiału powinno być powzięte postępowanie zgodne z prawem obowiązującym w kraju użytkownika.
- Radioaktywne odpady powinny być przechowywane zgodnie z przepisami obowiązującymi w kraju użytkownika.

4.3 Azydek sodu

Niektóre odczynniki zawierają azydek sodu jako środek konserwujący. Azydek sodu wchodzi w reakcje z ołowiem, miedzią lub mosiądzem, tworząc wybuchowe metale azydki. W związku z tym odczynniki zawierające azydek sodu powinny być rozcieńczane dużą ilością wody przed wylaniem ich do kanalizacji.

4.4 Ludzka surowica

Wszystkie surowice i osocza należy tak traktować jakby były materiałem do zakażenia hepatitis lub AIDS, a niszczenie odpadów powinno być przeprowadzone zgodnie z przepisami obowiązującymi w kraju użytkownika.

5 ZBIERANIE PRÓB, PRZYGOTOWYWANIE, ROZCIEŃCZANIE I PRZECHOWYWANIE

- Krew pobierać do probówek suchych lub zawierających heparynę lub EDTA.
- Oddzielić surowce lub osocze od komórek poprzez wirowanie.
- Próbkę surowicy mogą być przechowywane w 2-8°C, jeżeli oznaczenie zostanie przeprowadzone w ciągu 24 godzin. Jeżeli oznaczenie będzie przeprowadzone później, to należy i przechowywać odozowane zamrożone próbki w <-18 °C, aby nie powtarzać zamrażania i rozmrażania tej samej próbki.
- Próbkę mające stężenie większe od najwyższego kalibratora rozcieńczyć buforem do dysocjacji.

6. PROCEDURA OZNACZANIA

6.1. Przygotowanie odczynników

Wszystkie odczynniki należy doprowadzić do temperatury pokojowej.

6.1.1 Odtwarzanie kalibratorów i kontroli

Zawartość fiołek odtworzyć w objętości wody destylowanej podanej na etykiecie fiołki. Odczekać 30 minut i delikatnie zamieszać, aby uniknąć spienienia przed pipetowaniem. Odtworzone próbki można przechowywać w 2-8°C do 1 tygo-dnie lub rozdozowane w <-18 °C przez dłuższy czas, zgodnie z datą ważności zestawu

6.1.2 Przygotowanie płynu do płukania

Umieścić zawartość fiołki w 950 mL wody destylowanej i zamieszać. Płyn może być przechowywany w 2-8 °C, zgodnie z datą ważności zestawu.

6.2 Przygotowanie próbek i kontroli

NIE ROZCIEŃCZAĆ KALIBRATORÓW

- Do plastikowych probówek dodać kolejno 50 µL próbki i 1 mL buforu do dysocjacji (warunki pozwalają na przygotowanie 50 próbek, podzielonej objętość na dwie porcje, tak aby dodać do 100 prób, np.: 25 µL surowicy i 500µL buforu).
- Zamieszać każdą próbkę z buforem wirowo.
- Tak przygotowane próby mogą być przechowywane 48 godzin w 2-8°C; w celu dłuższego przechowywania zamrozić w <-18 °C.

6.3 PROCUDRA OZNACZANIA (patrz tabela)

7. WYNIKI

Wyniki należy odczytać z krzywej standardowej. Krzywa standardowa służy do oznaczania stężenia IGF-1 w próbkach mierzonych w tym samym czasie co kalibratory.

7.1. Krzywa standardowa

Zestawienie wyników jest przygotowane w oparciu o krzywą półlogarytmiczną przystosowaną („spline” mode) z zaznaczeniem B/T (%) lub B/B_{max} (%) na osi pionowej i stężenia IGF-1 w kalibratorach na osi poziomej (ng/mL). Zastosowanie innych metod do opracowania danych może dać nieco różne rezultaty.

Całkowita aktywność: 127559 cpm				
Kalibratory	IGF-1 (ng/mL)	cpm (n=3)	B/T (%)	B/ B _{maks} (%)
0	0	257	0.20	0.43
1	30	1138	0.89	1.93
2	100	4496	3.52	7.65
3	300	18620	14.59	31.72
4	600	39285	30.79	66.93
5	1200	58695	46.00	100

(Przykładowe wartości do krzywej wzorcowej, nie do zastosowania)

7.2 Próbkę

Odnajdź wartość B/T (%) lub B/B_{maks} (%) dla każdej próbki na osi pionowej i odczytaj odpowiadające tej wartości stężenie IGF-1, znajdujące się na osi poziomej ng/mL.

8. KONTROLA JAKOŚCI

Dobrze funkcjonujące laboratorium dla swej wiarygodności stosuje regularnie wewnętrzną kontrolę jakości otrzymanych wyników. Te próbki muszą być przygotowywane i oznaczane zgodnie z procedurą. Ich przydatność do oceny każdego zestawu będzie właściwa przy zastosowaniu odpowiedniej analizy statystycznej.

W przypadku uszkodzenia paczki lub, jeżeli opracowanie otrzymanych wyników sprawia trudności proszę się kontaktować z miejscowym dystrybutorem lub pod adresem: E-mail: imunochem@beckmancoulter.com

9 OCZEKIWANE WARTOŚCI

Sugeruje się, aby w każdym laboratorium ustalono własne wartości normalne. Poniższe wartości otrzymano tylko od osób zdrowych i są one jedynie wskazówką:

Dorośli

Wiek (lata)	n	IGF-1 (ng/mL)				
		Min.	5-ty percentyl	Mediana	95-ty percentyl	Maks.
20 – 30	51	219	232	288	385	644
30 – 40	44	140	177	245	382	405
40 – 50	43	64	124	199	290	336
50 – 60	18	71	71	147	263	284
60 – 70	20	94	94	141	269	269
70 – 80	20	72	76	117	160	167

Dzieci

Stadium dojrzałości (lata)	n	IGF-1 (ng/mL)		
		Średnia	Min.	Maks.
P1	0-4	114	49	171
	>4	250	76	499
P2	6	303	247	396
P3	7	414	249	642
P4-P5	7	400	271	550

Dzieci o drobnej konstrukcji

Te dzieci mają prawidłowe tempo wzrostu oraz średnie stężenie GH większe niż 20 mIU/L po stymulacji, przy wzroście o dwukrotnie lub więcej niższym odchyleniu standardowym niż średnia.

Stadium dojrzałości (lata)	n	IGF-1 (ng/mL)		
		Średnia	Min.	Maks.
P1	0-4	114	98	180
	5-7	115	98	156
	8-9	129	76	186
	10-11	151	76	234
	>12	198	131	278
P2	20	258	163	502
P3	14	351	185	617
P4-P5	9	423	272	540

10. PRZEDSTAWIENIE CHRAKTERYSTYK

(Po więcej wiadomości zajrzyj do zestawu danych w "DODATKU")

10.1 Analalityczna czułość: 2 ng/mL

10.2 Specyficzność

Przeciwciała użyte w zestawie jest wysoce specyficzne w stosunku do IGF-1. Otrzymano niezwykle niską reaktywność krzyżową w stosunku do kilku pokrewnych cząsteczek (insulina, proinsulina, IGFII, GH).

10.3 Kontrola precyzji

10.3.1 Wewnątrz zestawu

Próbki z tej samej serii były oznaczane 25 razy. Współczynniki wariacji były poniżej lub równe wartości do 6.3%.

10.3.2 Między zestawami

Próbki były oznaczane w duplikatach w 25 różnych seriach. Współczynniki wariacji były poniżej lub równały się wartości do 6.8%.

10.4 Kontrola dokładności

10.4.1 Test rozcieńczenia

Próbki o wysokim stężeniu były seryjnie rozcieńczone kalibratorem zero. Procentowe odzyski otrzymano między 88% i 111%.

10.4.2 Test odzysku

Próbki o niskim stężeniu były dodawane do próbek o znanej zawartości IGF-1. Procentowe odzyski otrzymano między 91% i 103%.

10.5 Zakres pomiarowy (od czułości analitycznej testu do stężenia najwyższego kalibratora): 2 – 1200 ng/mL.

11. OGRANICZENIA PROCEDURE

Niestosowanie się do instrukcji załączonej do zestawu może znacznie wpływać na wyniki

Wyniki powinny być interpretowane w oparciu o całość stanu klinicznego pacjenta, włącznie z historią choroby, danymi z dodatkowych testów i innymi informacjami.

W przypadku oznaczeń z wykorzystaniem przeciwciał istnieje możliwość zakłóceń spowodowanych przez obce przeciwciała w próbce pacjenta. Pacjenci, którzy byli regularnie wystawieni na kontakt ze zwierzętami lub byli poddawani immunoterapii lub zabiegom diagnostycznym z użyciem immunoglobulin lub fragmentów immunoglobulin, mogą wytworzyć przeciwciała (np. HAMA) zakłócające wyniki oznaczeń immunologicznych.

Takie przeciwciała zakłócające mogą prowadzić do uzyskania błędnych wyników. Należy starannie przeanalizować wyniki u pacjentów z podejrzeniem obecności tych przeciwciał.

6.3 PROCEDURA OZNACZANIA

1. Etap Dodawanie	2. Etap Etap Inkubacja	3. Etap Zliczanie
Do pokrytych probówek dodać w następującej kolejności: - 300 µL znacznika* - 50 µL kalibratorów, kontroli lub próbek. Zamieszać.	Inkubować 60 minut w 18-25 °C z wytrząsaniem (350 rpm).	Odciągnąć dokładnie zawartość probówek (z wyjątkiem 2 „całkowite cpm”) Przepłukać dwukrotnie 2 mL płynu do płukania. Zliczać związane cpm (B) i całkowite cpm (T) 1 min.

*Dodaj 300 µL znacznika do 2 dodatkowych probówek, aby otrzymać całkowite cpm.



**RINKINYS RADIOIMUNINIAM IGF-I
NUSTATYMI IN VITRO ŽMOGAUS KRAUJO SERUME IR PLAZMOJE**



1. METODO PRINCIPAS

Panašaus į insuliną augimo faktoriaus I (IGF-I) imunoradiometrinis tyrimas yra "sumuštinio" tipo tyrimas. Rinkinyje naudojami pelės monokloniniai antikūniai, nukreipti prieš du skirtingus IGF-I epitopus ir todėl tarpusavyje nekonkuruojantys. Norint atpalaiduoti IGF-I nuo jį surišančių baltymų, reikalingas išankstinis ekstragavimas rūgščių etanolu. Ėminiai, ekstraguoti rūgščių etanolu, ir kalibravimo mėginiai yra inkubuojami vamzdeliuose, padengtuose pirmu monokloniniu antikūniu, esant antrajam, ¹²⁵I pažymėtam antikūniui. Po inkubacijos vamzdelių turinys pašalinamas ir matuojamas surištas radioaktyvumas. Nežinomi dydžiai yra nustatomi interpoliuojant iš standartinės kreivės. Surištas radioaktyvumas yra tiesiogiai proporcingas IGF-I koncentracijai ėminyje.

2. PATEIKIAMŲ REAGENTŲ

Visi rinkinio reagentai yra stabilūs, kol nepasibaigęs jų galiojimo laikas, nurodytas rinkinio etiketėje, saugant juos 2-8 °C temperatūroje. Reagentų saugojimo sąlygos po atgaminimo ar praskiedimo yra nurodyti paragrafe Tyrimo procedūra.

2.1 Anti-IGF-I antikūniu padengti vamzdeliai: 2x50 vamzdelių (paruošti naudojimui).

2.2 ¹²⁵I pažymėti monokloniniai anti-IGF-I antikūniai: 1 buteliukas, 33 mL (paruoštas naudojimui).

Pagaminimo metu buteliukas talpina 370 kBq ¹²⁵I pažymėtų imunoglobulinų skystoje formoje, turinčio jaučio serumo albumino, natrio azido (<0.1%, žr. sk. Atsargumo priemonės) ir dažo.

2.3 Kalibravimo mėginiai: 6 buteliukai (liofilizuoti). Kalibravimo mėginiuose buteliukuose yra nuo 0 iki 1200 ng/mL IGF-I buferyje su jaučio albumino serumu natrio azidu (<0.1%, žr. sk. Atsargumo priemonės). Tikslia koncentracija yra nurodyta ant kiekvieno buteliuko etiketės. Kalibravimo mėginiai kalibruoti pagal tarptautinį standartą WHO 87/518.

2.4 Kontrolinis ėminys: 1 buteliukas (liofilizuotas). Buteliuke yra jaučio serumo albumine liofilizuotas IGF-I. Laukiami dydžiai įeina į koncentracijos diapazoną, nurodytą ant buteliuko etiketės.

2.5 Atskyrimo buferis: 2 buteliukai po 25 ml (paruošti naudojimui). Preparate yra jaučio serumo albuminas.

2.6 Plovimo tirpalas (20x): vienas 50 ml buteliukas. Koncentruotą tirpalą prieš naudojimą reikia praskiesti.

Pastaba: Temperatūros ir galiojimo datos, atspausdintos komponentų buteliukų etiketėse, taikytinos tik ilgalaikiam saugojimui pas gamintoją iki surenkant rinkinį. Nekreipkite į tai dėmesio.

3. REIKALINGOS, BET NEPATEIKIAMOS MEDŽIAGOS

Be standartinės laboratorinės įrangos, papildomai reikia:

- Mikropipetų (50 µl)
- Pusiau automatinį pipetų (300 µl, 1ml)
- Siurbimo sistemos
- Sūkurinio vortex tipo maišytuvo
- Horizontalaus ar orbitalinio purtytuvo (min. 300 aps./min.)
- Gama skaitiklis ¹²⁵I nustatymui

4. ATSARGUMO PRIEMONĖS

4.1 Bendros pastabos

- Prieš pipetavimą padėk visus reagentus į kambario temperatūrą.
- Nemaišyk skirtingų rinkinių partijų reagentus.
- Kalibruojančių bandinių ir tiriamų ėminių analizė atliekama vienu metu.
- Kad gauti tinkamus rezultatus, svarbu atsižvelgti į rekomenduojamas purtymo sąlygas.
- Rekomenduojama atlikti bandinį du kartus.
- Svarbu laikytis reagentų sudėjimo į mėgintuvėlius tvarkos.
- Kiekvienas mėgintuvėlis turi būti panaudotas tik vieną kartą.

4.2 Pagrindinės radiacinės saugos taisyklės

- Radioaktyvių medžiagų pirkimas, turėjimas, utilizacija ir perdavimas atliekamas pagal šalies taisykles.
- Pagrindinių radiacinės saugos taisyklių laikymasis turi užtikrinti adekvačią apsaugą:
- Šalia radioaktyviųjų medžiagų negalima valgyti, gerti, rūkyti ar taikyti kosmetikos priemonės
- Negalima pipetuoti radioaktyviųjų tirpalų burna.

- Venkite bet kokio kontakto su radioaktyviomis medžiagomis, mūvėdami pirštineis ir vilkėdami laboratorinius chalatus.
- Visos manipuliacijos su radioaktyviomis medžiagomis turi būti vykdomos tinkamoje vietoje, toli nuo koridorių ir kitų judrių vietų.
- Radioaktyvios medžiagos turi būti saugomos konteineryje tam skirtoje vietoje.
- Turi būti vedama savalaikė visų radioaktyviųjų produktų gavimo ir saugojimo registracija.
- Laboratorinė įranga ir stikliniai indai, kurie gali būti užteršti, turėtų būti atskirti, siekiant išvengti kryžminio užteršimo skirtingais radioizotopais.
- Kiekvienas radioaktyvaus užteršimo ar radioaktyvios medžiagos praradimo atvejis turi būti tvarkomas pagal nustatytas procedūras.
- Radioaktyvios atliekos turi būti tvarkomos pagal šalyje nustatytas taisykles.

4.3 Natrio azidas

Kai kurių reagentų sudėtyje yra natrio azido, atliekančio konservanto vaidmenį. Natrio azidas gali reaguoti su švinu, variu ar žvalviu ir sudaryti sprogius metalų azidus. Reagentus pašalinkite per santechninę sistemą, nuplaudami gausiu kiekiu vandens.

4.4 Žmogaus serumas

Su visais serumo ir plazmos ėminiais reikėtų elgtis, kaip su galinčiais perduoti hepatitą ar AIDS atliekos turi būti pašalinamos, vadovaujantis valstybės nustatyta tvarka.

5. MĖGINIŲ ĖMIMAS, PARUOŠIMAS, LAIKYMAS IR PRASKIEDIMAS

- Paimkite kraują į sausus vamzdelius, turinčius EDTA ar heparino.
- Atskirkite serumą ar plazmą nuo forminių elementų centrifuguojant.
- Serumo ir plazmos ėminius galima laikyti 2-8 °C temperatūroje, jeigu tyrimas bus atliktas per 24 val. Ilgesniam saugojimui laikykite juos užšaldytus (prie <-18 °C), kad galima būtų išvengti pakartotino sušaldymo ir atšildymo.
- Jeigu ėminių turi koncentracijos yra didesnės negu aukščiausias standartas, juos reikia praskiesti rūgštaus etanolo tirpalu.

6. TYRIMO PROCEDŪRA

6.1 Reagentų paruošimas

Palaikykite visus reagentus į kambario temperatūrą.

6.1.1 Kalibruojančių ir kontrolinių mėginių skiedimas:

Buteliukų turinys atskiedžiamas, pripilant nurodytą etiketėje distiliuoto vandens tūrį. Palaukite 30 min. ir po to švelniai, kad nesusidarytų putos, permaišykite. Parengtus darbiui tirpalus galima saugoti 2-8°C temperatūroje iki rinkinio galiojimo pabaigos datos. Norint laikyti ilgesnį laiką, turinį padalinti į atskiras dalis ir laikyti <-18°C temperatūroje.

6.1.2 Praplovimo tirpalo paruošimas.

Supilkite buteliuko turinį į 950 ml distiliuoto vandens ir išmaišykite. Praskiestą tirpalą galima sugoti 2-8°C temperatūroje, kol nesibaigs rinkinio galiojimo laikas.

6.2 Analizuojamų mėginių ir kontrolinių pavyzdžių paruošimas

Neapdorokite kalibravimo mėginių (neskiesti)

- Į polipropileno mėgintuvėlį paeiliui pridėkite 50 µl ėminio ir 1 ml atskyrimo buferio (tokiu būdu galima apdoroti 50 mėginių; 100 mėginių apdorojimui reikalinga 25 µl ėminio ir 500 µl buferio).
- Išmaišyti turinį sūkuriniame maišytuve.
- Paruoštus analizei mėginius galima saugoti 2-8°C temperatūroje ne daugiau kaip 48 valandas, arba ilgesnį laiką <-18°C temperatūroje.

6.3 Tyrimo procedūra (žiūr. lentelę kitame lape)

7. REZULTATAI

Rezultatai gaunami interpoliuojant standartinę kreivę, gautą kartu tiriant nežinomus mėginius.

7.1 Kalibravimo kreivė

Rinkinio kokybės kontrolės rezultatai, pateikti šioje instrukcijoje, buvo apskaičiuoti sudarant kreivę pusiau logaritminių koordinatų sistemoje („splain“ funkcija), atitinkančią B/T(%) ar B/Bmax(%) ant vertikalios ašies ir kalibravimo mėginių IGF-I koncentraciją ant horizontalios grafiko ašies (ng/mL). Kiti duomenų redukcijos metodai gali duoti truputį skirtingus rezultatus.

Bendras aktyvumas: 127599 cpm				
Kalibravimo mėginiai	IGF-I (ng/ml)	cpm (n=3)	B/T (%)	B/Bmax. (%)
0	0	257	0.20	0.43
1	30	1138	0.89	1.93
2	100	4496	3.52	7.65
3	300	18620	14.59	31.72
4	600	39285	30.79	66.93
5	1200	58695	46.00	100

(Standartinės kreivės pavyzdys, nenaudok apskaičiavimui)

7.2 Ėminiai

Ant standartinės kreivės vertikaliai ašies surask santykį B/T ar B/Bmax, ant horizontalios ašies - atitinkamą IGF-I koncentraciją ng/mL.

8. KOKYBĖS KONTROLĖ

„Gera laboratorinė praktika“ suprantama taip, kad reguliariai naudojami kontroliniai ėminiai gautų rezultatų kokybei užtikrinti. Šiuos ėminius reikia paruošti lygiai taip pat, kaip ir tyrimo ėminius. Rekomenduojama jų rezultatus analizuoti panaudojant atitinkamus statistinius metodus.

Tuo atveju, kai pakuotė rimtai pažeista arba gauti rezultatai nesutampa su tyrimų charakteristikomis (žr. 10 skyrių), prašome kreiptis į mūsų specialistus:

Tel.: +420 272 017 391; Faksas: +420 272 017 385;

Elektroninis paštas: imunochem@beckmancoulter.com

9. LAUKIAMŲ DYDŽIAI

Rekomenduojama kiekvienai laboratorijai nusistatyti savo normos dydžius. Žemiau pateikti iš sveikų asmenų gauti dydžiai yra tik indikatyvūs.

Suaugę

Amžius (metai)	n	IGF-I				
		Min.	Penkta percentilė	Vidurkis	95-ta percentilė	Maks.
20-30	51	219	232	288	385	644
30-40	44	140	177	245	382	405
40-50	43	64	124	199	290	336
50-60	18	71	71	147	263	284
60-70	20	94	94	141	269	269
70-80	20	72	76	117	160	167

Vaikai

Brendimo stadijos (metai)	n	IGF-I (ng/ml)		
		Vidutinis	Minimalus	Maksimalus
P1 0-4	5	114	49	171
>4	27	250	76	499
P2 6	6	303	247	396
P3 7	7	414	249	642
P4-P5 7	7	400	271	550

Pagal konstituciją maži vaikai

Šių vaikų ūgis yra mažesnis negu du standartiniai nukrypimai ar daugiau nuo vidurkio su augimo hormono koncentracija didesne, negu 20 mIU/l po stimuliacijos ir reguliariu augimo greičiu.

Brendimo stadijos (metai)	n	IGF-I (ng/ml)		
		Vidutinis	Minimalus	Maksimalus
P1 0-4	13	114	98	180
5-7	25	115	98	156
8-9	21	129	76	186
10-11	24	151	76	234
>12	27	198	131	278
P2 20	20	258	163	502
P3 14	14	351	185	617
P4 9	9	423	272	540

10. VEIKLOS CHARAKTERISTIKOS

(detalesnė informacija pateikiama skyriuje „APPENDIX“)

10.1 Analitinis jautrumas: 2 ng/mL

10.2 Specifiškumas

Imunotyrimo naudojamas antikūnas yra ypatingai specifinis IGF-I. Kryžminė reakcija su eile giminingų junginių (insulinu, proinsulinu, IGF-II, GH) labai maža.

10.3 Preciziškumas

10.3.1 Bandymų eigoje

Serumo ėminiai buvo tiriami 25 kartus toje pačioje serijoje. Išmatuotas IGF-I kraujo serume lygio variacijos koeficientas neviršija 6.3%.

10.3.2 Tarp bandimų

Dublujančių pavyzdžių analizė atlikta 25 skirtingų serijų nustatymuose. Išmatuotas IGF-I kraujo serume lygio variacijos koeficientas neviršija 6.8%.

10.4 Tikslumas

10.4.1 Praskiedimo testas

Aukštos IGF-I koncentracijos kraujo serume bandinys praskiedė nulinio kalibravimo bandiniu. „Atsidarymo“ procentas buvo tarp 78% ir 111%.

10.4.2 „Atsidarymo“ testas

Žemos IGF-I koncentracijos ėminiai buvo papildomi žinomais IGF-I kiekiais. Gautas „atsidarymo“ procentas buvo tarp 91% ir 103%.

10.5 Nustatymo ribos (nuo analitinio jautrumo iki aukščiausios kalibravimo mėginio reikšmės): 2 – 1200 ng/ml.

11. METODO APRIBOJIMAI

Tyrimo metodikos nepaisymas gali iškreipti tyrimo rezultatus.

Nustatymo rezultatai turi būti interpretuojami atsižvelgiant į bendrą paciento klinikinę būklę, įskaitant anamnezę, kitų testų duomenis ir kitą tinkamą informaciją.

Tyrimams, kuriuose naudojami antikūnai, gali trukdyti paciento mėginyje esantys heterofiliniai antikūnai. Pacientai, nuolat kontaktuojantys su gyvūnais arba tie, kuriems taikyta imunoterapija arba diagnostinės procedūros naudojant imunoglobulinus ar imunoglobulinų fragmentus, gali sintetinti antikūnus, pvz., HAMA, trukdančius atlikti imuninius tyrimus.

Tokie trukdantys antikūnai gali lemti klaidingus rezultatus. Pacientų, kurie įtariami turintys šių antikūnų, rezultatus reikia vertinti atsargiai.

6.3 TYRIMO PROCEDURA

I žingsnis Užpildymas komponentais*	II žingsnis Inkubacija	III žingsnis Rezultatų matavimas
Padengtus antikūnais vamzdelius pripildyti tokia tvarka: -300µL žymens* ir -50µL kalibruojančio, kontrolinio ir tiriamo bandinio. Sumaišyk.	Inkubuok 60 min. prie 18-25°C, pastoviai purtant (350 aps./min.)	Kruopščiai išpilk mėgintuvėlių turinius (išskyrus " T "). Du kartus praplauk su 2mL praplovimo tirpalo. Išmatuok (B) ir bendrą ¹²⁵ I aktyvumą (T) (imp./min.) 1 min. bėgyje.

* Bendro (T) nustatymui į du papildomus mėgintuvėlius pridėk po 300µL žymens.



IVD

IRMA IGF-I

REF

A15729



IMMUNORADIOMETRIC ASSAY FOR THE IN VITRO DETERMINATION OF
INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR I IN HUMAN SERUM AND PLASMA



Performance characteristics

A. Specificity

The specificity of the assay was determined by measuring the apparent IGF-I value given by high concentrations of related compounds in the absence (cross-reactivity) or presence (interference) of IGF-I.

A.1 Cross-reactivity

Related molecules	Concentration	IGF-I concentration measured	
	nM	ng/mL	nM
GH	40	0	0
Insulin	20	0	0
Proinsulin	40	0	0
IGF-II	650	0	0

A.2 Interferences

Spiking	IGF-I concentration expected		IGF-I concentration measured	
	ng/mL	nM	ng/mL	nM
GH (40 nM) + IGF-I	270	35.3	274	35.6
Insulin (25 nM) + IGF-I	270	35.3	273	35.6
Proinsulin (20 nM) + IGF-I	270	35.3	266	34.8
IGF-II (650 nM) + IGF-I	294	38.5	278	36.1

B. Accuracy

B.1 Dilution test

Three samples containing IGF-I were treated with the dissociation buffer following the procedure indicated in the insert. The treated samples were then diluted using the dissociation buffer.

Sample	Dilution factor	IGF-I (ng/mL)		Recovery (%) measured/expected
		measured	expected	
1	Undiluted	917	-	-
	1/2	415	459	90.4
	1/4	203	229	88.6
	1/8	113	115	98.3
	1/16	57	57	100
2	Undiluted	918	-	-
	1/2	440	459	95.8
	1/4	223	230	96.9
	1/8	115	115	100
	1/16	60	57	105.3
3	Undiluted	779	-	-
	1/2	386	390	99.0
	1/4	192	195	98.5
	1/8	99	97	102.1
	1/16	54	49	110.2

B.2 Recovery test

IGF-I was added to serum samples and assayed according to the procedure of the kit.

Sample (ng/mL)	IGF-I (ng/mL)		Recovery measured/expected (%)
	measured	expected	
1 (61)	530	561	94.5
	313	311	100.6
	192	186	103.2
	139	136	102.2
2 (109)	557	609	91.5
	347	359	96.7
	224	234	95.7
	180	184	97.8
3 (79)	525	579	90.7
	314	329	95.4
	195	202	96.5
	157	154	101.9

C. Precision

Samples	Intra-assay (n=25)				Inter-assays (n=25)			
	A	B	C	D	E	F	G	H
Mean value (ng/mL)	40	81	229	575	25	82	129	244
CV (%)	3.2	6.3	2.4	3.8	6.8	5.7	5.3	6.8

D. Drift

The choice of optimal conditions for the immunoassay has minimized drift. A 30-minutes lag between the addition of the tracer and addition of the samples does not affect the assay.

E. Hook effect

No hook effect was observed up to a concentration of IGF-I of approximately 7,000 ng/mL.

F. Effect of anti-coagulants

The effect of differences in collection of blood were tested on samples of normal individuals. The mode of collecting sample does not affect assay.

Samples	IGF-I ng/mL							Ratio Dry tubes / others
	1	2	3	4	5	6	7	
Dry	191	239	213	150	269	203	146	100%
with gel	185	245	216	167	272	207	144	101%
with heparin	185	239	183	200	287	204	138	101%
with EDTA	184	229	163	179	256	204	135	95%
with Citrate	159	223	149	160	220	183	125	87%

$T_{1/2} (^{125}\text{I}) = 1443 \text{ h} = 60.14 \text{ d}$

¹²⁵ I	E (MeV)	%
γ	0.035	
X	0.027	114
	0.032	25



Use by / Utiliser jusqu'à / Verwendbar bis / Utilizzare entro / Use antes de / Ημερομηνία λήξης / Použitelné do / Použitelné do / Užyc do / Felhasználható / Naudoti iki / Использовать до

IVD

In Vitro diagnostic Device / Diagnostic in Vitro / In Vitro Diagnostikum / Diagnostico in vitro / Diagnostico in Vitro / In Vitro Διαγνωστικό Ιατροτεχνολογικό προϊόν / Pro diagnostiku in vitro / Pre diagnostiku in vitro / Do diagnostyki in vitro / In vitro diagnosztikum / In vitro diagnostikai / Для ин vitro диагностики

REF

Catalogue Number / Référence catalogue / Bestellnummer / Numero di catalogo / Numero de catalogo / Αριθμός καταλόγου / Katalogové číslo / Katalógové číslo / Numer katalogowy / Katalógusszám / Katalogo Nr. / Καταложный №

LOT

Batch code / Numéro de lot / Chargenbezeichnung / Coddice del lotto / Código de lote / Αριθμός Παρτίδας / Číslo šarže / Číslo šarže / Numer serii / Lot szám / Serijos Nr. / № серии



Caution, see instructions for use / Attention, consulter la notice d'utilisation / Achtung, Gebrauchsanweisung beachten / Attenzione vedere le istruzioni per l'uso / Προειδοποίηση, συμβουλευτείτε τα συνοδά έντυπα / Pozor, čtěte pozorně návod / Pozor, čítajte návod rozorne / Uwaga, patrz instrukcja użycia / Figyelem, olvassa el a használati utasítást / Dėmesio, atidžiai perskaitykite instrukciją / Внимание, читайте тщательно инструкцию



Consult Instructions for Use / Consulter la notice d'utilisation / Gebrauchsanweisung beachten / Leggere le istruzioni per l'uso / Consulte las instrucciones de uso / Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης / Viz návod / Vid návod / Patrz instrukcja użycia / Olvassa el a használati utasítást / Žiūrėti instrukciją / Смотри инструкцию



Temperature limitation / Limites de température / Temperaturgrenzen / Limiti di temperatura / Limites de temperatura / Περιορισμοί θερμοκρασίας / Rozmezi skladovacích teplot / Rozsahy skladovacích teplôt / Ograniczenie temperatury / Hőmérséklethatárok / Saugojimo temperatūrų intervalas / Диапазон температур хранения



Radioactive / Radioactif / Radioattivo / Radioaktiv / Radioactivo / Ραδιενεργός / Radioaktivní / Rádioaktívne / Radioaktywność / Radioaktív / Radioaktyvus / Радиоактивный



For XX tests / Pour XX dosages / Für XX Bestimmungen / Per XX dosaggi / Para XX ensayos / Περιεχόμενο επαρκές για XX εξετάσεις / Lze použít pro XX testů / Určené na XX testov / Zawartość na XX testów / Tartalma XX teszt elvégzésére elegendő / Pakanka XX testui atlikti / Предназначен для XX тестов



Manufacturer / Fabricant / Hersteller / Fabbicante / Fabricante / Κατασκευαστής / Výrobce / Výrobca / Producent / Gyártó / Gamintojas / Производитель

