



IVD

CE

# Glucagon - RIA

*RB310*

---

Version : 230123

Date of issue : 23/01/2023

Revision date: 23/01/2023

# History

---

## Summary of change:

<b>Current Version:</b>
<b>230123</b>
New logo



en

Read entire protocol before use.

## Glucagon RIA

### I. INTENDED USE

Radioimmunoassay for the *in vitro* quantitative measurement of glucagon in human plasma.

### II. GENERAL INFORMATION

- A. Proprietary name : DIAsource Glucagon RIA
- B. Catalog number : RB310 : 100 tests
- C. Manufactured by : DIAsource ImmunoAssays S.A.  
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

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

### III. CLINICAL BACKGROUND

#### A. Biological activities

Glucagon is a 29 amino acids straight chain peptide produced in the pancreatic  $\alpha$ -cells (1,2). Glucagon is cleaved out from preproglucagon with 159 amino acids. The amino acid sequence of glucagon is found in glicentin, a 69 amino acid peptide (3). Glicentin has been proposed to be a biosynthetic intermediate for pancreatic and gut glucagon.

Increases in the plasma glucagon level affect glucose production first by stimulating a transient phase of glycogenolysis and then a prolonged period of glycogenesis (4,5).

A sustained increase in the glucagon level continues to modulate hepatic glucose production (6).

Glucagon also plays a role in the amino acid metabolism. Elevation of glucagon in plasma decreases amino acids whereas glucagon deficiency increases amino acids (7,8,9). The amino acid sequence of human pancreatic glucagon: His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr.

#### B. Clinical application

Glucagon is involved in carbohydrate, fat and protein metabolism. Basal amounts of glucagon are essential for the maintenance of normoglycemia and a physiological role for glucagon is to prevent hypoglycemia.

Pancreatectomy do not cause totally glucagon deficiency. However, the concentrations in plasma are significantly lower than in normals (7,10).

Since glucagon in diabetics has been found elevated absolutely or relatively to insulin, it has been proposed that glucagon contributes essentially to the development of the hyperglycemia and keto acidosis found in diabetes (11,12,13). Elevated levels of glucagon in plasma are found in patients with A-cell tumors (8).

The test should not be relied upon as the sole basis of decisions on clinical therapy, but should be used in combination with clinical symptoms and the results of other available tests.

#### IV. PRINCIPLES OF THE METHOD

Glucagon in plasma is assayed by the competitive radioimmunoassay using a rabbit antiserum raised against a glucagon-albumin conjugate. Glucagon in calibrators and samples compete with  $^{125}\text{I}$ -labelled glucagon in binding to the antibodies in a two steps incubation.

$^{125}\text{I}$ -glucagon binds in a reverse proportion to the concentration of glucagon in calibrators and samples. Antibody-bound  $^{125}\text{I}$ -glucagon is separated from the unbound fraction using double antibody solid phase. The radioactivity of the bound fraction is measured in a gamma counter.

The antiserum used in this assay shows less than 0.1% cross reaction with gut-GLI (14).

For professional use within a laboratory.

#### V. REAGENTS PROVIDED

Reagents	100 Tests Kit	Colour Code	Reconstitution
[Ab]			
Anti-glucagon : Rabbit antiserum raised against porcine glucagon, conjugated to human serum albumin in glycine buffer with sodium azide and aprotinin.	1 vial lyophilised	Blue	<b>Add 52 ml</b> distilled water
Ag $^{125}\text{I}$	1 vial lyophilised 28 kBq	Red	<b>Add 52 ml</b> distilled water
TRACER: $^{125}\text{I}$ odine labelled glucagon in glycine buffer with human serum albumin, sodium azide and aprotinin.			
[DASP]	1 vial 11 mL	Green	<b>Ready for use</b>
Double antibody solid phase : Anti-rabbit-Ig coupled to cellulose particles in phosphate buffer with human serum albumin, NaCl, NaN <sub>3</sub> , EDTA and Tween 80.			
[ASS BUF]	1 vial 50 mL	Black	<b>Ready for use</b>
Assay diluent : glycine buffer containing human serum albumin, sodium azide and aprotinin. To be used for the preparation of glucagon working calibrators and instead of antiserum in non-specific binding control tubes.			
[CAL]	1 vial lyophilised	Yellow	<b>Reconstitute with</b> distilled water by the volume stated on vial label
Glucagon calibrator in glycine buffer containing human serum albumin, sodium azide (<0.1%) and aprotinin.			
[CONTROL N]	2 vials lyophilised	Silver	<b>Add 2 mL</b> distilled water
Controls - N = 1 or 2 Contains sodium azide (<0.1%).			

#### VI. SUPPLIES NOT PROVIDED

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

1. Distilled water
2. Disposable test tubes of polystyrene: 11-13x55 mm
3. Pipettes with disposable tips: 200 and 500  $\mu\text{L}$
4. Pipettes 1 mL and 5 mL (for calibrator preparation)
5. Vortex mixer
6. Centrifuge, refrigerated, giving a minimum of 1700 x g.
7. Gamma counter

#### VII. REAGENT PREPARATION

- Anti-Glucagon :** Reconstitute with 52 mL of distilled water. Store at 2-8°C.
- $^{125}\text{I}$ -Glucagon :** Reconstitute with 52 mL of distilled water. Store at -18°C or lower if reused.
- Double antibody solid phase :** Ready for use. Stir continuously during pipetting this reagent. Store at 2-8°C.
- Assay diluent :** Ready for use. Store at 2-8°C.

**E. Glucagon calibrator :** Reconstitute with distilled water by the volume stated on vial label. Store at -18°C or lower if reused.

**F. Controls :** Reconstitute with 2.00 mL distilled water. Store at -18°C or lower if reused.

#### VIII. STORAGE AND EXPIRATION DATING OF REAGENTS

Store all reagents at 2-8°C before reconstitution and use.

The water used for reconstitution of the lyophilized reagents should be distilled in an all-glass apparatus or be of corresponding purity. Dissolve the contents in the vials by gentle inversion and avoid foaming.

The stability for each reagent is found on the label of the vial. For the lyophilized reagents the expiry date is valid for the unreconstituted reagents. The reconstituted reagents are stable for 10 weeks (or to the expiry date for the labelled glucagon) when stored.

#### IX. SPECIMEN COLLECTION

Vein blood is collected in tubes containing EDTA and aprotinin. The sample is cooled in an ice-bath immediately. Plasma is separated by centrifugation (refrigerated centrifuge is preferred). The plasma should be frozen within 2 hours and stored at -18°C or lower until assayed. Repeated freezing and thawing must be avoided.

#### X. PROCEDURE

##### A. Handling notes

Reconstitute the reagents as specified. Accuracy in all pipetting steps is essential. All tests (calibrators, samples and controls) should be performed in duplicate.

A complete assay includes:

**Calibrator :** 7 concentrations: 0, 4.7, 9.4, 18.8, 37.5, 75, 150 pmol/L ( $= 0, 16.3, 32.6, 65.3, 131, 261, 522 \text{ pg/mL}$ ).

**Controls :** Two controls with known concentrations of glucagon for quality control.

##### Sample

Tubes for determination of the *non-specific binding*

Tubes for determination of the *total radioactivity* added

##### B. Procedure

1. Reconstitute the reagents according to the instructions.
2. Prepare the glucagon working calibrators by dilution of the 300 pmol/L calibrator with the assay diluent according to the following:  
 a/ 1.00 mL calibrator 300 pmol/L + 1.00 mL assay diluent = 150 pmol/L  
 b/ 1.00 mL calibrator 150 pmol/L + 1.00 mL assay diluent = 75 pmol/L  
 c/ 1.00 mL calibrator 75 pmol/L + 1.00 mL assay diluent = 37.5 pmol/L  
 d/ 1.00 mL calibrator 37.5 pmol/L + 1.00 mL assay diluent = 18.8 pmol/L  
 e/ 1.00 mL calibrator 18.8 pmol/L + 1.00 mL assay diluent = 9.4 pmol/L  
 f/ 1.00 mL calibrator 9.4 pmol/L + 1.00 mL assay diluent = 4.7 pmol/L  
 g/ Assay diluent = 0 pmol/L  
 Store the calibrator solutions a-g and the 300 pmol/L calibrator at -18°C or lower if reused.
3. Pipette 200  $\mu\text{L}$  of the calibrators a-g, samples and controls in their respective tubes (duplicates).
4. Pipette 200  $\mu\text{L}$  of the assay diluent in the NSB-tubes for calibrator.
5. Pipette 500  $\mu\text{L}$  anti-glucagon in all tubes except the NSB- and TOT-tubes.
6. Pipette 500  $\mu\text{L}$  assay diluent in the NSB-tubes.
7. Vortex-mix and incubate for 20-24 hours at 2-8°C.
8. Pipette 500  $\mu\text{L}$   $^{125}\text{I}$ -Glucagon in all tubes. The TOT-tubes are sealed and kept aside.
9. Vortex-mix and incubate for 20-24 hours at 2-8°C.
10. Add 100  $\mu\text{L}$  double antibody solid phase to all tubes except the TOT-tubes. Stir continuously during pipetting this reagent.
11. Vortex-mix and incubate for 30-60 minutes at 2-8°C.
12. Centrifuge the tubes for 15 minutes at +4°C (1700 x g).  
**Note:** The correct centrifugation force is important for accurate performance.
13. Decant the liquid immediately after centrifugation.  
**Note:** The accurateness and coherency in handling of supernatants are crucial for the assay precision.
14. Count the radioactivity of the pellets in a gamma counter. The counting time should be at least 2 minutes.

#### XI. CALCULATION OF RESULTS

1. Subtract the average count rate (CPM) of the non-specific binding tubes for calibrator from the count rate (CPM) of the replicates of the calibrator tubes, the sample tubes and control tubes.
2. A calibration curve is generated by plotting the bound CPM (in CPM or % B/TOT) against the concentration of the glucagon calibrators.

3. Interpolate the glucagon concentrations in the samples and controls from the generated calibration curve.
4. The calibration curve and the calculation of the concentrations of the samples can be done by a suitable computer program. A spline algorithm may be used.

## XII. TYPICAL DATA

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

Tube no	Type of tube	Concentration pmol/L	CPM (raw)	$\frac{B}{TOT} \times 100$
1	NSBst	-	684	5.5%
2	"	-	653	5.3%
3	TOT	-	12301	$\frac{B-NSB}{TOT-NSB} \times 100$
4	"	-	12347	
5	Cal	0.0	6253	50.7%
6	"	"	6203	50.3%
7	Cal	4.7	5827	47.3%
8	"	"	5775	46.9%
9	Cal	9.4	5267	42.7%
10	"	"	5384	43.7%
11	Cal	18.8	4661	37.8%
12	"	"	4729	38.4%
13	Cal	37.5	3379	27.4%
14	"	"	3310	26.9%
15	Cal	75	1777	14.4%
16	"	"	1760	14.3%
17	Cal	150	1050	8.5%
18	"	"	1081	8.8%

### Control parameters

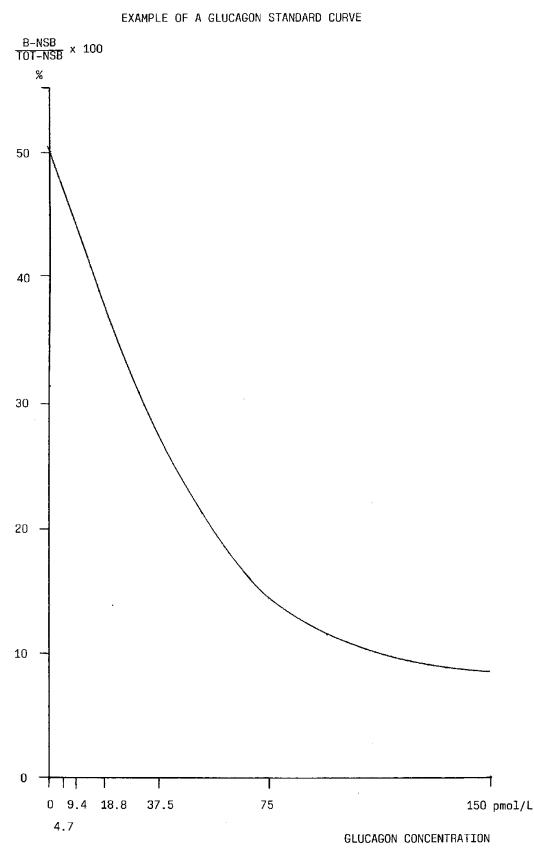
$$\frac{Bo}{TOT} \times 100 : 48.0 \%$$

$$\frac{NSB}{TOT} \times 100 : 5.4 \%$$

$$ED\ 80 : 14.5 \text{ pmol/L}$$

$$ED\ 50 : 39.8 \text{ pmol/L}$$

$$ED\ 20 : 100 \text{ pmol/L}$$



## XIII. PERFORMANCE AND LIMITATIONS

### A. Sensitivity

The lowest detectable concentration in the assay is 3 pmol/L. This figure corresponds to a decrease in binding of  $2 \times SD$  of the bound radioactivity in the zero-calibrator.

### B. Precision

#### Intra assay variation:

Level	Coefficient of variation (%CV)	N
16.4 pmol/L	8.1	30
60.1 pmol/L	4.5	30

#### Total variation (sum of intra- and inter assay variation):

Level	Coefficient of variation (%CV)	N
25.4 pmol/L	6.8	6
22.0 pmol/L	7.4	6
23.0 pmol/L	8.3	5
73.9 pmol/L	3.9	6
97.9 pmol/L	5.6	6

### C. Accuracy

The recovery was 97.6% when known amounts of glucagon were added to plasma samples.

### D. Specificity

The following cross reactions have been found:

Peptide	Cross reaction
Glucagon, pancreatic, human	100.0%
Gut GLI	<0.1%
Secretin	<0.02%
Cholecystokinin -39	<0.02%
Vasoactive intestinal peptide	<0.02%
Gastric inhibitory peptide	<0.02%
GLP1	<0.1%
Oxyntomodulin	<0.1%

**E. Correlation**

Glucagon assay correlates with WHO 69/194 calibrator.

**F. Interference**

Samples displaying cloudiness, hemolysis, hyperlipemia or containing fibrin may give inaccurate results.

**XIV. INTERNAL QUALITY CONTROL**

In order to enable the laboratory to completely monitor the consistent performance of the assay, the following important factors should be checked.

**1. The found concentrations of the controls**

The found concentrations of the controls should be within the limits given on the labels of the vials.

**2. Total counts**

Counts obtained should approximate the expected CPM when adjusted for counter efficiency and radioactive decay. The content of  $^{125}\text{I}$ -glucagon in this kit will give 10.500 CPM (-5, +30%) at the reference date (counting efficiency: 80%).

**3. Maximum binding (Bo/TOT)**

Calculate for each assay the % bound radioactivity in the zero-calibrator:

$$\frac{\text{Bo}}{\text{TOT}} \times 100$$

TOT

**4. Non-specific binding (NSB/TOT)**

Calculate for each assay the % non-specific binding:

$$\frac{\text{NSB}}{\text{TOT}} \times 100$$

TOT

The non-specific binding should be less than 6%.

**5. Slope of calibration curve**

For example, monitor the 80, 50 and 20% points of the calibration curve for run to run reproducibility.

**XV. REFERENCE INTERVALS**

Normal level of glucagon in plasma after 12 hours fasting: <60 pmol/L (obtained with this method). It is recommended that users establish reference ranges for the populations served by their own laboratories.

**XVI. PRECAUTIONS AND WARNINGS****Safety**

For in vitro diagnostic use only.

As the regulations may vary from one country to another, it is essential that the person responsible for the laboratory is familiar with current local regulations, concerning all aspects of radioactive materials of the type and quantity used in this test.

This kit contains components of human origin. They have been tested by immunoassay for hepatitis B surface antigen, antibodies to HCV and for antibodies to HIV-1 and HIV-2 and found to be negative. Nevertheless, all recommended precautions for the handling of blood derivatives, should be observed.

This kit contains  $^{125}\text{I}$  (half-life: 60 days), emitting ionizing X (28 keV) and  $\gamma$  (35.5 keV) radiations. Steps should be taken to ensure the proper handling of the radioactive material, according to local and/or national regulations. Only authorized personnel should have access to the reagents.

The following precautions should be observed when handling radioactive materials:

- Radioactive material should be stored in specially designed areas, not normally accessible to unauthorized personnel.
- Handling of radioactive material should be conducted in authorized areas only.
- Care should be exercised to prevent ingestion and contact with the skin and clothing.
- Do not pipette radioactive solutions by mouth.
- Drinking, eating or smoking should be prohibited where radioactive material is being used.
- Hands should be protected by gloves and washed after using radioactive materials.
- Work should be carried out on a surface covered by disposable absorbing material.
- Spills of radioactive material should be removed immediately, and all contaminated materials disposed as radioactive waste. Contaminated surfaces should be cleaned with a detergent.

The reagents in this kit contain sodium azide. Contact with copper or lead drain pipes may result in the cumulative formation of highly explosive azide deposits. On disposal of the reagents in the sewerage, always flush with copious amounts of water, which prevents metallic azide formation. Plumbing suspected of being contaminated with these explosive deposits should be rinsed thoroughly with 10% sodium hydroxide solution.

**XVII. BIBLIOGRAPHY**

1. Bromer, W.W., Staub, A., Sinn, L.G. and Behrens, O.K. I. Am. Chem. Soc. 79:2801, 1957.
2. Ferner, H. Am. J. Dig. Dis. 20:301, 1953.
3. Thim, L. and Moody, A.J. Peptides Q1 (suppl. 2):37, 1981.
4. Cherrington, A.D., Williams, P.E., Liljenquist, J.E. and Lacy, W.W. In: Endocrine pancreas and diabetes. (Ed. J. Pierluissi), pp. 172-191. Excerpta Medica, Amsterdam and Oxford.
5. Sherwin, R., Tamborlane, D., Hendler, R., Saccà, L., De Fronzo, R. and Felig, P. J. Clin. Endocrinol. Metab. 45:1104-1107, 1977.
6. Gerich, J., Rizza, R., Haymond, M., Miles, J., Verdonk, C. and Cryer, P. In: Current views of hypoglycemia and glucagon (ed. D. Andreani, P.J. Lefebvre and V. Marks), pp. 117-126. Academic Press, London 1980.
7. Boden, G., Master, R.W., Rezvani, I., Palmer, J.P., Lobe, T.E. and Owen, O.E. J. Clin. Invest 65:706-716, 1980.
8. Mallinson, C.N., Bloom, S.R., Warin, P.R., Salmon, P.R. and Cox, B. Lancet 2:1-5, 1974.
9. Müller, W.A., Berger, M., Suter, P., Coppers, H.J., Reiter, J., Wyss, T., Berchtold, P., Schmidt, F.H., Assal, J.P. and Renold, A.E. J. Clin. Invest 63:820-827, 1979.
10. Von Schenck, H., Vasquez, B. and Unger, R.H. Horm. Metab. Res 14:69-71, 1982.
11. Unger, R.H. and Orci, L. Lancet 1:14-16, 1975.
12. Gerich, J., Lorenzi, M., Bier, D., Schneider, V., Tsalikian, E., Karam, J. and Forsham, P. N Engl. J. Med. 292:985-989, 1975.
13. Unger, R.H. Metabolism 27:1691-1709, 1978.
14. Von Schenck, H. In: Methods in diabetes Research, Vol. I, Laboratory Methods, part B (Ed. Joseph Larner and Stephen Pohl).

**XVIII. SUMMARY OF THE PROTOCOL**

	Total count	NSB	Calibrator (0-6)	Controls	Samples			
Calibrator	-	-	200 $\mu\text{l}$	-	-			
Controls	-	-	-	200 $\mu\text{l}$	-			
Samples	-	-	-	-	200 $\mu\text{l}$			
Anti-glucagon	-	-	500 $\mu\text{l}$					
Assay diluent	-	700 $\mu\text{l}$	-	-	-			
Vortex-mix and incubate for 20-24 hours at 2-8°C.								
$^{125}\text{I}$ Tracer			500 $\mu\text{l}$					
Vortex-mix and incubate for 20-24 hours at 2-8°C.								
Double antibody solid phase	-		100 $\mu\text{l}$					
Vortex-mix and incubate for 30-60 min at 2-8°C.								
Centrifuge 15 min (1700 g; 4°C)								
Decant and count the radioactivity of the precipitates								

Other translations of this Instruction for Use can be downloaded from our website: <https://www.diasource-diagnostics.com/>

Lire entièrement le protocole avant utilisation.

## Glucagon RIA

### I. BUT DU DOSAGE

Trousse de dosage radio-immunologique pour la mesure quantitative *in vitro* du glucagon dans le plasma humain.

### II. INFORMATIONS GENERALES

A. Nom du produit : DIAsource Glucagon RIA

B. Numéro de catalogue : RB310 : 100 tests

C. Fabriqué par : DIAsource ImmunoAssays S.A.  
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

Pour une assistance technique ou une information sur une commande :

Tel: +32 (0) 10 84.99.11

Fax: +32 (0) 10 84.99.91

### III. CONTEXTE CLINIQUE

#### A. Activités biologiques

Le glucagon est une chaîne peptidique droite de 29 acides aminés produite dans les cellules  $\alpha$ -pancréatiques (1,2). Le glucagon est issu du clivage du préproglucagon avec 159 acides aminés. La séquence en acides aminés du glucagon se retrouve dans la glicentine, polypeptide de 69 acides aminés (3). La glicentine a été suggérée comme intermédiaire biosynthétique du glucagon pancréatique et intestinal.

Le glucagon contribue au métabolisme des glucides, lipides et protéines. Des quantités minimales de glucagon sont essentielles dans le maintien de la normoglycémie et l'un des rôles physiologiques du glucagon consiste à prévenir l'hypoglycémie. L'augmentation du niveau de glucagon plasmatique influence la production de glucose, en stimulant tout d'abord une phase transitoire de glycogénolyse, puis une période prolongée de glyconéogenèse (4,5).

Une augmentation soutenue du niveau de glucagon continue à moduler la production de glucose hépatique (6).

Le glucagon joue également un rôle dans le métabolisme des acides aminés. La hausse du glucagon plasmatique fait diminuer les acides aminés alors qu'une déficience de glucagon les fait augmenter (7,8,9). La séquence en acides aminés du glucagon pancréatique humain est la suivante : His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr.

#### B. Application clinique

Le glucagon contribue au métabolisme des glucides, lipides et protéines. Des quantités minimales de glucagon sont essentielles dans le maintien de la normoglycémie et l'un des rôles physiologiques du glucagon consiste à prévenir l'hypoglycémie.

La pancréatectomie n'implique pas une déficience totale en glucagon. Cependant, les concentrations plasmatiques sont substantiellement inférieures à celles des sujets normaux (7,10).

Il a été constaté que le glucagon des diabétiques est absolument ou relativement élevé par rapport à l'insuline, ce qui suggère que le glucagon contribue essentiellement au développement de l'hyperglycémie et de l'acidocétose présentes dans le diabète (11,12,13). On trouve des niveaux élevés de glucagon plasmatique chez les patients atteints de tumeurs des cellules A (8).

Il n'est pas prudent de se fier uniquement à ce test pour prendre des décisions thérapeutiques cliniques. Il devra plutôt être utilisé en parallèle avec les symptômes cliniques et les résultats d'autres analyses disponibles.

#### IV. PRINCIPE DU DOSAGE

Ces réactifs sont indiqués pour le dosage du glucagon dans le plasma humain. Le glucagon plasmatique est analysé par un dosage radio-immunologique compétitif intégrant un antisérum de lapin dirigé contre un conjugué de glucagon-albumine. Le glucagon des standards et des échantillons entre en concurrence avec le glucagon marqué  $^{125}\text{I}$  pour se lier aux anticorps dans une incubation à deux étapes. Le glucagon marqué  $^{125}\text{I}$  se lie en proportion inverse à la concentration de glucagon des standards et des échantillons. Le glucagon  $^{125}\text{I}$  lié à l'anticorps est séparé de la fraction non liée par une méthode de phase solide à double anticorps. La radioactivité de la fraction liée est mesurée par compteur de rayons gamma. L'antisérum utilisé dans ce dosage indique une réaction croisée avec les GLI intestinales inférieure à 0,1% (14).

À usage professionnel en laboratoire.

#### V. REACTIFS FOURNIS

Réactifs	100 Tests	Code couleur	Reconstitution
[Ab] Anti-glucagon : Antisérum de lapin dirigé contre le glucagon porcin, conjugué à de l'albumine sérique humaine dans un tampon de glycine contenant de l'albumine sérique humaine, de l'azide de sodium et de l'aprotinine.	1 flacon lyophilisé	Bleu	Ajouter 52 ml d'eau distillée
Ag $^{125}\text{I}$ TRACEUR : glucagon marqué à l' $^{125}\text{I}$ odine dans un tampon glycine avec de l'albumine sérique humaine, de l'azide de sodium et de l'aprotinine.	1 flacon lyophilisé 28 kBq	Rouge	Ajouter 52 ml d'eau distillée
[DASP] Phase solide à double anticorps: Anti-Ig de lapin couplée à des particules de cellulose avec du tampon phosphate contenant de l'albumine sérique humaine, du NaCl, du NaN <sub>3</sub> , de l'EDTA et du Tween 80.	1 flacon 11 mL	Vert	Prêt à l'emploi
[ASS BUF] Diluant d'immuno dosage : tampon de glycine contenant de l'albumine sérique humaine, de l'azide de sodium et de l'aprotinine. À utiliser dans la préparation des standards de travail de glucagon et en substitution de l'antisérum dans des tubes de témoin à liaison non-spécifique.	1 flacon 50 mL	Vert	Prêt à l'emploi
[CAL] Standard de glucagon synthétique humain. Lyophilisé dans un tampon de glycine contenant de l'albumine sérique humaine, de l'azide de sodium (<0.1%) et de l'aprotinine.	1 flacon lyophilisé	Jaune	Reconstituer avec de l'eau distillée selon le volume indiqué sur l'étiquette du flacon
[CONTROL N] Contrôle - N = 1 ou 2 Contient de l'azide de sodium. (<0.1%).	2 flacons lyophilisés	Gris	Ajouter 2 ml d'eau distillée

#### VI. MATERIEL NON FOURNI

Le matériel mentionné ci-dessous est requis mais non fourni avec la trousse:

1. Eau distillée
2. Tubes à essai jetables en polystyrène : 11-13x55 mm
3. Pipettes à embouts jetables : 200 et 500 µl
4. Pipettes de 1 mL et 5 mL (pour la préparation du standard)
5. Agitateur vortex
6. Centrifugeuse réfrigérée débit minimum 1700 x g.
7. Compteur de rayons gamma

#### VII. PREPARATION DES REACTIFS

- A. **Anti-Glucagon :** Reconstituer dans 52 ml d'eau distillée. Entreposer entre 2 et 8°C.
- B.  **$^{125}\text{I}$ -Glucagon :** Reconstituer dans 52 ml d'eau distillée. Entreposer à -18°C ou à une température inférieure en cas de réutilisation.
- C. **Phase solide à double anticorps :** Prêt à l'emploi. Agiter continuellement pendant le pipetage de ce réactif. Entreposer entre 2 et 8°C.
- D. **Diluant d'immuno dosage :** Prêt à l'emploi. Entreposer entre 2 et 8°C.
- E. **Calibrateur de glucagon :** Reconstituer avec de l'eau distillée selon le volume indiqué sur l'étiquette du flacon. Entreposer à -18°C ou à une température inférieure en cas de réutilisation.
- F. **Contrôles :** Reconstituer avec 2 mL d'eau distillée. Entreposer à -18°C ou à une température inférieure en cas de réutilisation.

#### VIII. STOCKAGE ET DATE D'EXPIRATION DES REACTIFS

Entreposer tous les réactifs à une température comprise entre 2 et 8°C avant reconstitution et emploi.

L'eau utilisée pour la reconstitution des réactifs lyophilisés devra être distillée dans des matériels tout en verre ou être d'une pureté équivalente. Dissoudre le contenu des flacons en les agitant doucement par renversement et éviter toute formation de mousse.

La stabilité de chaque réactif figure sur l'étiquette du flacon. Pour ce qui est des réactifs lyophilisés, la date de péremption est valable à l'état non-reconstitué. Les réactifs reconstitués sont stables pendant 10 semaines (ou jusqu'à la date de péremption du glucagon étiqueté) dans des conditions d'entreposage conformes aux instructions.

#### IX. COLLECTE DES ECHANTILLONS

Le sang des veines est recueilli dans des tubes contenant de l'EDTA et de l'aprotinine. L'échantillon est immédiatement refroidi dans un bain de glace. Le plasma est séparé par centrifugation (de préférence par centrifugeuse réfrigérée). Le plasma doit être gelé dans les 2 heures qui suivent et entreposé à -18°C ou une température inférieure jusqu'au dosage. Éviter de congeler et décongeler à répétition.

#### X. MODE OPERATOIRE

##### A. Notes de manipulation

Reconstituer les réactifs selon les indications fournies. La précision est essentielle sur toutes les étapes du pipetage. Tous les tests (standards, échantillons et contrôles) devront être effectués en duplicate.

Un dosage complet comprend :

Standard (St-tubes) : 7 concentrations: 0; 4,7; 9,4; 18,8; 37,5; 75; 150 pmol/l (= 0; 16,3; 32,6; 65,3; 131; 261; 522 pg/ml).

Contrôles (C-tubes) : Deux contrôles avec des concentrations de glucagon connues pour le contrôle qualité.

Échantillons (S-tubes)

Tubes pour la détermination de la liaison non-spécifique (NSB-tubes)

Tubes pour la détermination de la radioactivité totale ajoutée (TOT-tubes)

##### B. Procédure

1. Reconstituer les réactifs conformément aux instructions.
2. Préparer les standards de travail de glucagon en diluant le standard de 300 pmol/l avec le diluant d'immuno dosage conformément aux indications suivantes :
  - a/ 1,00 mL de standard de 300 pmol/l + 1,00 mL de diluant d'immuno dosage = 150 pmol/l
  - b/ 1,00 mL de standard de 150 pmol/l + 1,00 mL de diluant d'immuno dosage = 75 pmol/l
  - c/ 1,00 mL de standard de 75 pmol/l + 1,00 mL de diluant d'immuno dosage = 37,5 pmol/l
  - d/ 1,00 mL de standard de 37,5 pmol/l + 1,00 mL de diluant d'immuno dosage = 18,8 pmol/l
  - e/ 1,00 mL de standard de 18,8 pmol/l + 1,00 mL de diluant d'immuno dosage = 9,4 pmol/l
  - f/ 1,00 mL de standard de 9,4 pmol/l + 1,00 mL de diluant d'immuno dosage = 4,7 pmol/l
- g/ Diluant d'immuno dosage = 0 pmol/l
- Entreposer les solutions de standard a-g et le standard à 300 pmol/l à -18°C ou à des températures inférieures en cas de réutilisation.
3. Pipeter 200 µL des standards a-g, échantillons et contrôles dans leur tubes respectifs (duplicates).
4. Pipeter 200 µL du diluant d'immuno dosage dans les tubes NSB (liaison non-spécifique) pour le standard.
5. Pipeter 500 µL d'anti-glucagon dans tous les tubes à l'exception des tubes NSB et TOT-tubes.
6. Pipeter 500 µL du diluant d'immuno dosage dans les tubes NSB.

7. Vortexer et incuber pendant 20-24 heures à 2-8° C.
  8. Pipeter 500 µl de glucagon 125I dans tous les tubes. Les TOT-tubes sont hermétiquement fermés et mis de côté.
  9. Vortexer et incuber pendant 20-24 heures à 2-8° C.
  10. Ajouter 100 µl de phase solide à double anticorps à tous les tubes à l'exception des TOT-tubes. Agiter continuellement pendant le pipetage de ce réactif.
  11. Vortexer et incuber pendant 30-60 minutes à 2-8° C.
  12. Centrifuger les tubes pendant 15 minutes à +4° C (1700 x g).
- Remarque :** Il est nécessaire d'utiliser une force de centrifugation correcte pour obtenir des résultats exacts.
13. Décanter le liquide immédiatement après la centrifugation.
  14. Remarque : Il est indispensable de faire preuve de précision et de cohérence dans la manipulation des surnageants afin de garantir l'exactitude du dosage.
  15. Compter la radioactivité des granules avec un compteur de rayons gamma. Le temps de comptage doit être d'au moins 2 min.

## XI. CALCUL DES RESULTATS

1. Soustraire le taux de comptage moyen (CPM) des tubes de liaison non-spécifique pour le standard du taux de comptage (CPM) des réplicats des tubes de standard, des tubes d'échantillon et des tubes de contrôles.
2. Une courbe standard est produite en reportant le tracé du CPM lié (en coups par minute ou % B/TOT) par rapport à la concentration des standards de glucagon.
3. Interpoler les concentrations de glucagon dans les échantillons et contrôles à partir de la courbe standard produite.
4. La courbe standard et le calcul des concentrations des échantillons peuvent être effectués par un programme informatique approprié. Un algorithme de spline cubique peut être utilisé.

## XII. DONNEES TYPES

Les données représentées ci-dessous sont données pour information et ne peuvent jamais être utilisées à la place d'une courbe de calibration.

Numéro du tube	Type de tube	Concentration pmol/L	CPM (brut)	$\frac{B\_x\ 100}{TOT}$
1	NSBst	-	684	5.5%
2	"		653	5.3%
3	TOT	-	12301	$\frac{B-NSB}{TOT-NSB} \times 100$
4	"		12347	
5	St	0.0	6253	50.7%
6	"	"	6203	50.3%
7	St	4.7	5827	47.3%
8	"	"	5775	46.9%
9	St	9.4	5267	42.7%
10	"	"	5384	43.7%
11	St	18.8	4661	37.8%
12	"	"	4729	38.4%
13	St	37.5	3379	27.4%
14	"	"	3310	26.9%
15	St	75	1777	14.4%
16	"	"	1760	14.3%
17	St	150	1050	8.5%
18	"	"	1081	8.8%

## Paramètres de contrôle

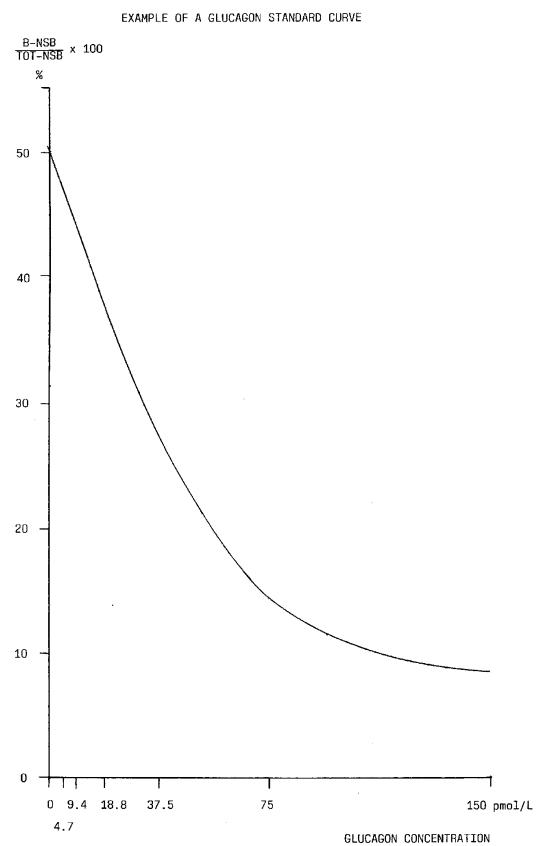
$\frac{Bo}{TOT} \times 100 : 48.0 \%$

$\frac{NSB}{TOT} \times 100 : 5.4 \%$

ED 80 : 14.5 pmol/L

ED 50 : 39.8 pmol/L

ED 20 : 100 pmol/L



## XIII. PERFORMANCE ET LIMITES DU DOSAGE

### A. Sensibilité

La plus faible concentration détectable du dosage est de 3 pmol/l. Cette valeur correspond à une baisse de la liaison de 2 x S de la radioactivité liée dans le standard d'étalonnage zéro.

### B. Précision

Variation inter-dosages :

Niveau	Coefficient de variation (%CV)	N
16.4 pmol/L	8.1	30
60.1 pmol/L	4.5	30

Variation totale (somme de la variation intra-dosage et de la variation inter-dosages) :

Niveau	Coefficient de variation (%CV)	N
25.4 pmol/L	6.8	6
22.0 pmol/L	7.4	6
23.0 pmol/L	8.3	5
73.9 pmol/L	3.9	6
97.9 pmol/L	5.6	6

### C. Exactitude

Le rendement était de 97,6% lorsque des quantités connues de glucagon avaient été ajoutées à des échantillons de plasma.

### D. Spécificité

On a trouvé les réactions croisées suivantes :

Peptide	Réaction croisée
Glucagon pancréatique humain	100.0%
GLI intestinale	<0.1%
Sécrétine	<0.02%
Cholécystokinine -39	<0.02%
Peptide intestinal vasoactif	<0.02%
Peptide inhibiteur gastrique	<0.02%
GLP-1	<0.1%
Oxyntomoduline	<0.1%

#### E. Correlation

Le dosage du Glucagon est conforme à la norme 69/194 de l'OMS.

#### F. Interference

Les échantillons présentant un trouble, une hémolyse, une hyperlipémie ou contenant de la fibrine peuvent donner des résultats inexacts.

### XIV. CONTROLE QUALITE INTERNE

Afin de permettre au laboratoire de surveiller complètement la performance du dosage sur une période continue, il sera nécessaire de contrôler les facteurs importants suivants :

#### 1. Les concentrations trouvées dans les contrôles

Les concentrations trouvées dans les contrôles devront se situer dans les limites figurant sur les étiquettes des flacons.

#### 2. Coups totaux

Les coups obtenus doivent correspondre environ au CPM prévu une fois ajusté relativement à l'efficacité du compteur et à la décroissance radioactive. Le contenu de glucagon<sup>125</sup>I de ce kit produira 10 500 CPM (-5, +30%) à la date de référence (efficacité de comptage : 80%).

#### 3. Liaison maximale (Bo/TOT)

Calculer pour chaque dosage le % de radioactivité liée dans le standard d'étalonnage zéro :

$$\frac{\text{Bo}}{\text{Bo} + \text{TOT}} \times 100$$

TOT

#### 4. Liaison non-spécifique (NSB/TOT)

Calculer pour chaque dosage le % de liaison non-spécifique :

$$\frac{\text{NSB}}{\text{NSB} + \text{TOT}} \times 100$$

TOT

La liaison non-spécifique doit être inférieure à 6%.

#### 5. Pente de la courbe standard

Par exemple, surveiller les points 80, 50 et 20% de la courbe pour la reproductibilité inter-séries.

### XV. VALEURS ATTENDUES

Niveau normal de glucagon plasmatique après 12 heures à jeûn: <60 pmol/l (issu de cette méthode).

Il est conseillé aux utilisateurs de fixer des plages de référence correspondant aux populations servies par leur laboratoire.

### XVI. PRECAUTIONS ET AVERTISSEMENTS

#### Sécurité

À usage exclusif en diagnostic in vitro.

La réglementation étant susceptible de varier d'un pays à l'autre, il est essentiel que la personne responsable du laboratoire soit complètement informée sur la réglementation locale relative aux genres et aux quantités de matières radioactives utilisés dans ce test.

Ce kit contient des composants d'origine humaine. Ils ont été testés par immunodosage et se sont révélés négatifs à l'antigène de surface du virus de l'hépatite B, aux anticorps du virus de l'hépatite C et aux anticorps anti-VIH1 et anti-VIH 2. Il n'en reste pas moins que toutes les précautions recommandées pour la manipulation des dérivés sanguins devront être observées.

Ce kit contient <sup>125</sup>I (demi-vie : 60 jours) émetteur de rayonnements ionisants X (28 keV) et γ (35,5 keV). Il sera indispensable de prendre des mesures assurant la bonne manipulation de la matière radioactive conformément à la réglementation locale et/ou nationale. L'accès aux réactifs sera exclusivement réservé au personnel autorisé.

Les précautions suivantes devront être prises lors de la manipulation des matières radioactives:

- Il sera nécessaire d'entreposer la matière radioactive dans des zones spécialement conçues à cet effet, et de manière générale, non accessibles au personnel non-autorisé.
- La manipulation de la matière radioactive sera exclusivement effectuée dans les zones autorisées.
- Prendre soin d'éviter son ingestion et son contact avec la peau et les vêtements.  
Ne pas pipetter les solutions radioactives à la bouche.
- Il sera interdit de boire, manger ou fumer dans les endroits où la matière radioactive est utilisée.
- Les mains devront être protégées à l'aide de gants et lavées après l'utilisation de matières radioactives.
- Le travail devra être effectué sur une surface recouverte d'un tissu absorbant jetable.
- Les déversements de matière radioactive devront être immédiatement essuyés et tous les matériaux contaminés éliminés comme étant des déchets radioactifs. Les surfaces contaminées seront nettoyées à l'aide d'un détergent.

Les réactifs contenus dans ce kit contiennent de l'azoture de sodium. Leur contact avec les canalisations en cuivre ou en plomb est susceptible de provoquer l'accumulation de dépôts d'azoture hautement explosifs. Au moment de jeter les réactifs au tout-à-l'égout, toujours les faire évacuer avec de grandes quantités d'eau afin de prévenir la formation d'azotures métalliques. Les canalisations susceptibles d'avoir été contaminées avec ces dépôts explosifs devront être soigneusement rincées à l'aide d'une solution de 10% d'hydroxyde de sodium.

### XVII. BIBLIOGRAPHIE

1. Bromer, W.W., Staub, A., Sinn, L.G. and Behrens, O.K. I. Am. Chem. Soc. 79:2801, 1957.
2. Ferner, H. Am. J. Dig. Dis. 20:301, 1953.
3. Thim, L. and Moody, A.J. Peptides Q1 (suppl. 2):37, 1981.
4. Cherrington, A.D., Williams, P.E., Liljenquist, J.E. and Lacy, W.W. In: Endocrine pancreas and diabetes. (Ed. J. Pierluissi), pp. 172-191. Excerpta Medica, Amsterdam and Oxford.
5. Sherwin, R., Tamborlane, D., Hendlir, R., Sacca, L., De Fronzo, R. and Felig, P. J. Clin. Endocrinol. Metab. 45:1104-1107, 1977.
6. Gerich, J., Rizza, R., Haymond, M., Miles, J., Verdonk, C. and Cryer, P. In: Current views of hypoglycemia and glucagon (ed. D. Andreani, P.J. Lefebvre and V. Marks), pp. 117-126. Academic Press, London 1980.
7. Boden, G., Master, R.W., Rezvani, I., Palmer, J.P., Lobe, T.E. and Owen, O.E. J. Clin. Invest 65:706-716, 1980.
8. Mallinson, C.N., Bloom, S.R., Warin, P.R., Salmon, P.R. and Cox, B. Lancet 2:1-5, 1974.
9. Müller, W.A., Berger, M., Suter, P., Coppers, H.J., Reiter, J., Wyss, T., Berchtold, P., Schmidt, F.H., Assal, J.P. and Renold, A.E. J. Clin. Invest 63:820-827, 1979.
10. Von Schenck, H., Vasquez, B. and Unger, R.H. Horm. Metab. Res 14:69-71, 1982.
11. Unger, R.H. and Orci, L. Lancet 1:14-16, 1975.
12. Gerich, J., Lorenzi, M., Bier, D., Schneider, V., Tsalikian, E., Karam, J. and Forsham, P. N Engl. J. Med. 292:985-989, 1975.
13. Unger, R.H. Metabolism 27:1691-1709, 1978.
14. Von Schenck, H. In: Methods in diabetes Reserach, Vol. I, Laboratory Methods, part B (Ed. Joseph Larner and Stephen Pohl).

**XVIII.****RESUME DU PROTOCOLE**

	Coups totaux	NSB	Standard (0-6)	Contrôles	Echantillons				
Standard	-	-	200 µl	-	-				
Contrôles	-	-	-	200 µl	-				
Echantillons	-	-	-	-	200 µl				
Anti-glucagon	-	-	500 µl						
Diluant d'immunodoage	-	700 µl	-	-	-				
Vortexer et incuber pendant 20-24 heures à 2-8°C.									
125I Traceur	500 µl								
Vortexer et incuber pendant 20-24 heures à 2-8°C.									
Phase solide à double anticorps	-	100 µl							
Vortexer et incuber pendant 30-60 mn à 2-8° C.									
Centrifuger 15 min ( 1700 g; 4°C )									
Décanter et compter la radioactivité des précipités.									



es

Lea todo el protocolo antes del uso.

## Glucagon RIA

### I. INDICACIONES

Radioinmunoensayo para la medición cuantitativa *in vitro* del glucagón en plasma humano.

### II. INFORMACIÓN GENERAL

- A. Nombre comercial : DIAsource Glucagon RIA
- B. Número de catálogo : RB310 : 100 pruebas
- C. Fabricado por : DIAsource ImmunoAssays S.A.  
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Bélgica.

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

Tel.: +32 (0) 10 84.99.11                      Fax: +32 (0) 10 84.99.91

### III. ANTECEDENTES CLÍNICOS

#### A. Actividades biológicas

El glucagón es un péptido de cadena recta compuesto por 29 aminoácidos producido en las células pancreáticas  $\alpha$ (1,2). El glucagón se segmenta a partir del preproglucagón, compuesto por 159 aminoácidos. La secuencia de aminoácidos del glucagón se halla en la glicentina, un péptido compuesto por 69 aminoácidos (3). La glicentina se ha propuesto como intermediario biosintético del glucagón pancreático e intestinal.

El incremento del nivel de glucagón en plasma repercute sobre la producción de glucosa, primero estimulando la fase transitoria de glucogenólisis y después un período prolongado de gluconeogénesis (4,5). Un incremento sostenido del nivel de glucagón permite modular la producción de glucosa hepática (6).

El glucagón también participa en el metabolismo de los aminoácidos. El incremento del nivel de glucagón en plasma reduce los aminoácidos, mientras que la deficiencia de glucagón los aumenta (7,8,9). La secuencia de aminoácidos del glucagón pancreático humano es: His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr.

#### B. Aplicación clínica

El glucagón está implicado en el metabolismo de los hidratos de carbono, las grasas y las proteínas. Los niveles basales de glucagón son esenciales para el mantenimiento de la normoglucemia, y una de las labores fisiológicas del glucagón es prevenir la hipoglucemia.

Una pancreatectomía no causa una deficiencia total de glucagón. Sin embargo, las concentraciones de glucagón en plasma serán significativamente más bajas de lo normal (7,10).

Puesto que se ha observado que en los diabéticos el glucagón presenta niveles absolutos o relativos elevados en comparación con la insulina, se ha propuesto que el glucagón contribuye de forma esencial al desarrollo de la hiperglucemia y la cetoacidosis propias de la diabetes (11,12,13). En los pacientes con tumores en las células A, se han detectado niveles elevados de glucagón en plasma (8).

Esta prueba no debe ser la única base para tomar decisiones sobre el tratamiento clínico, sino que debe utilizarse junto con los síntomas clínicos y los resultados de otras pruebas disponibles.

#### IV. PRINCIPIOS DEL MÉTODO

El glucagón en plasma se evalúa mediante un radioinmunensayo competitivo en el que se utiliza un antisero de conejo que se enfrenta a un glucagón conjugado con albúmina. El glucagón de los calibradores y muestras compite con el glucagón marcado con I<sup>125</sup>en la fijación a los anticuerpos en una incubación en dos pasos.

El glucagón I<sup>125</sup>se fija en proporción inversa a la concentración de glucagón de los calibradores y muestras. El glucagón I<sup>125</sup>fijado a los anticuerpos se separa de la fracción no fijada mediante una fase sólida de doble anticuerpo. La radiactividad de la fracción fijada se mide con un contador gamma.

El antisero utilizado en este ensayo muestra una reacción cruzada inferior al 0,1% con la GLI intestinal (14).

Para uso profesional dentro del laboratorio.

#### V. REACTIVOS PROPORCIONADOS

Reactivos	Kit de 100 pruebas	Código de color	Reconstitución
[Ab]			
Antiglucagón : Antisero de conejo enfrentado a glucagón porcino, conjugado con albúmina de suero humano en tampón glicina con azida sódica y aprotinina.	1 vial liofilizado	Azul	Añadir 52 ml de agua destilada
Ag <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">125I</span>	1 vial Liofilizado 18 kBq	Rojo	Añadir 52 ml de agua destilada
TRAZADOR: Glucagón marcado con yodo <sup>125</sup> en tampón glicina con albúmina de suero humano, azida sódica y aprotinina.			
[DASP]	1 vial 11 ml	Verde	Listo para usar
Fase sólida de doble anticuerpo: Anti Ig de conejo unido a partículas de celulosa en tampón fosfato con albúmina de suero humano, NaCl, NaN <sub>3</sub> , EDTA y Tween 80.			
[ASS BUF]	1 vial 50 ml	Negro	Listo para usar
Diluyente del ensayo: tampón glicina que contiene albúmina de suero humano, azida sódica y aprotinina. Se usa para la preparación de los calibradores de trabajo del glucagón y en lugar del antisero en tubos de control de fijación no específica.			
[CAL]	1 vial liofilizado	Amarillo	Reconstituir con agua destilada según el volumen indicado en la etiqueta del vial
Calibrador de glucagón en tampón glicina que contiene albúmina de suero humano, azida sódica (<0,1%) y aprotinina.			
[CONTROL N]	2 viales liofilizado	Plateado	Añadir 2 ml de agua destilada
Controles - N = 1 o 2 Contiene azida sódica(<0,1%).			

#### VI. SUMINISTROS NO PROPORCIONADOS

Los siguientes materiales son necesarios pero no se proporcionan con el kit:

1. Agua destilada
2. Tubos de ensayo de poliestireno desechables: 11-13 x 55 mm
3. Pipetas con puntas desechables: 200 y 500 µl
4. Pipetas de 1 ml y 5 ml (para la preparación de calibradores)
5. Agitador
6. Centrifuga refrigerada, con un mínimo de 1700 x g.
7. Contador gamma

#### VII. PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

- A. **Antiglucagón :** Reconstituir con 52 ml de agua destilada. Conservar a 2-8 °C.
- B. **Glucagón I<sup>125</sup> :** Reconstituir con 52 ml de agua destilada. Conservar a -18° C o temperatura inferior en caso de reutilización.
- C. **Fase sólida de doble anticuerpo :** Listo para usar. Agitar continuamente el reactivo mientras se pipetea. Conservar a 2-8 °C.

- D. **Diluyente del ensayo :** Listo para usar. Conservar a 2-8 °C.
- E. **Calibrador de glucagón :** Reconstituir con agua destilada según el volumen indicado en la etiqueta del vial. Conservar a -18 °C o temperatura inferior en caso de reutilización.
- F. **Controles :** Reconstituir con 2,00 ml de agua destilada. Conservar a -18 °C o temperatura inferior en caso de reutilización.

#### VIII. ALMACENAMIENTO Y FECHA DE CADUCIDAD DE LOS REACTIVOS

Conservar todos los reactivos a 2-8 °C antes de reconstituirlos y usarlos. El agua utilizada para la reconstitución de los reactivos liofilizados debe destilarse en un aparato que sea enteramente de vidrio o que tenga la pureza correspondiente. Disolver el contenido en los viales invirtiéndolos con suavidad y evitando que se forme espuma.

La estabilidad de los reactivos figura en las etiquetas de los viales. En lo que respecta a los reactivos liofilizados, la fecha de caducidad es válida para los reactivos no reconstituidos. Los reactivos reconstituidos son estables durante 10 semanas (o hasta la fecha de caducidad del glucagón) cuando se almacenan.

#### IX. RECOGIDA DE MUESTRAS

La sangre venosa se recoge en tubos que contienen EDTA y aprotinina. La muestra se enfriá inmediatamente en un baño de hielo. El plasma se separa por centrifugación (se recomienda centrifugación refrigerada). El plasma debe congelarse en un plazo máximo de 2 horas y conservarse a -18 °C o a temperatura inferior hasta ser analizado. Se debe evitar la congelación y descongelación repetida de las muestras.

#### X. PROCEDIMIENTO

##### A. Manipulación

Reconstituir los reactivos tal como se especifica. La precisión es fundamental en todos los pasos que implican pipetear. Todas las pruebas (calibradores, muestras y controles) deben hacerse por duplicado.

Un ensayo completo incluye:

**Calibrador :** 7 concentraciones: 0, 4,7, 9,4, 18,8, 37,5, 75, 150 pmol/l (= 0, 16,3, 32,6, 65,3, 131, 261, 522 pg/ml).

**Controles :** Dos controles con concentraciones conocidas de glucagón para el control de calidad.

##### Muestra

Tubos para la determinación de la *fijación no específica*

Tubos para la determinación de la *radiactividad total añadida*

##### B. Procedimiento

1. Reconstituir los reactivos de acuerdo con las instrucciones.
2. Preparar los calibradores de trabajo de glucagón diluyendo el calibrador de 300 pmol/l con el diluyente del ensayo de acuerdo con las siguientes indicaciones:
  - a/ 1,00 ml calibrador 300 pmol/l + 1,00 ml diluyente del ensayo = 150 pmol/l
  - b/ 1,00 ml calibrador 150 pmol/l + 1,00 ml diluyente del ensayo = 75 pmol/l
  - c/ 1,00 ml calibrador 75 pmol/l + 1,00 ml diluyente del ensayo = 37,5 pmol/l
  - d/ 1,00 ml calibrador 37,5 pmol/l + 1,00 ml diluyente del ensayo = 18,8 pmol/l
  - e/ 1,00 ml calibrador 18,8 pmol/l + 1,00 ml diluyente del ensayo = 9,4 pmol/l
  - f/ 1,00 ml calibrador 9,4 pmol/l + 1,00 ml diluyente del ensayo = 4,7 pmol/l
  - g/ Diluyente del ensayo = 0 pmol/l
3. Conservar las soluciones de calibrador a-g y el calibrador de 300 pmol/ a - 18 °C o a temperatura inferior en caso de reutilización.
4. Pipetear 200 µl de los calibradores a-g, muestras y controles en sus respectivos tubos (duplicados).
5. Pipetear 200 µl del diluyente del ensayo en los tubos NSB para el calibrador.
6. Pipetear 500 µl de antiglucagón en todos los tubos excepto los tubos NSB y TOT.
7. Pipetear 500 µl del diluyente del ensayo en los tubos NSB.
8. Agitar e incubar durante 20-24 horas a 2-8 °C.
9. Pipetear 500 µl de glucagón I<sup>125</sup>en todos los tubos. Tapar y guardar aparte los tubos TOT.
10. Agitar e incubar durante 20-24 horas a 2-8 °C.
11. Añadir 100 µl de fase sólida de doble anticuerpo en todos los tubos excepto los tubos TOT. Agitar continuamente el reactivo mientras se pipetea.
12. Agitar e incubar durante 30-60 minutos a 2-8 °C.
13. Centrifugar los tubos durante 15 minutos a +4 °C (a 1700 x g).

**Nota:** La fuerza de centrifugación correcta es importante para obtener un rendimiento exacto.

14. Decantar el líquido inmediatamente después de la centrifugación.

**Nota:** La exactitud y la coherencia en la manipulación de los sobrenadantes son cruciales para la precisión del ensayo.

14. Contar la radiactividad de los precipitados utilizando un contador gamma. El tiempo de recuento debe ser por lo menos de 2 minutos.

## XI. CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

- Restar la media de la tasa de recuento (CPM) de los tubos de fijación no específica de la tasa de recuento (CPM) de los duplicados de los tubos del calibrador, de las muestras y de los controles.
- Se puede obtener una curva representando gráficamente la CPM fijada (en CPM o % B/TOT) en función de la concentración de los calibradores de glucagón.
- Interpolar las concentraciones de glucagón de las muestras y controles a partir de la curva de calibración obtenida.
- La curva de calibración y el cálculo de las concentraciones de las muestras también se puede realizar utilizando un programa informático adecuado. También puede utilizarse un algoritmo spline.

## XII. DATOS TÍPICOS

Los siguientes datos solo se muestran a modo de ejemplo y no deben utilizarse nunca en lugar de la curva de calibración en tiempo real.

Tubo n.º	Tipo de tubo	Concentración pmol/l	CPM (índice bruto)	$\frac{B_{-}NSB}{TOT-NSB} \times 100$
1	NSBst	-	684	5,5%
2	"	-	653	5,3%
3	TOT	-	12301	$\frac{B_{-}NSB}{TOT-NSB} \times 100$
4	"	-	12347	
5	Cal	0,0	6253	50,7%
6	"	"	6203	50,3%
7	Cal	4,7	5827	47,3%
8	"	"	5775	46,9%
9	Cal	9,4	5267	42,7%
10	"	"	5384	43,7%
11	Cal	18,8	4661	37,8%
12	"	"	4729	38,4%
13	Cal	37,5	3379	27,4%
14	"	"	3310	26,9%
15	Cal	75	1777	14,4%
16	"	"	1760	14,3%
17	Cal	150	1050	8,5%
18	"	"	1081	8,8%

### Parámetros de control

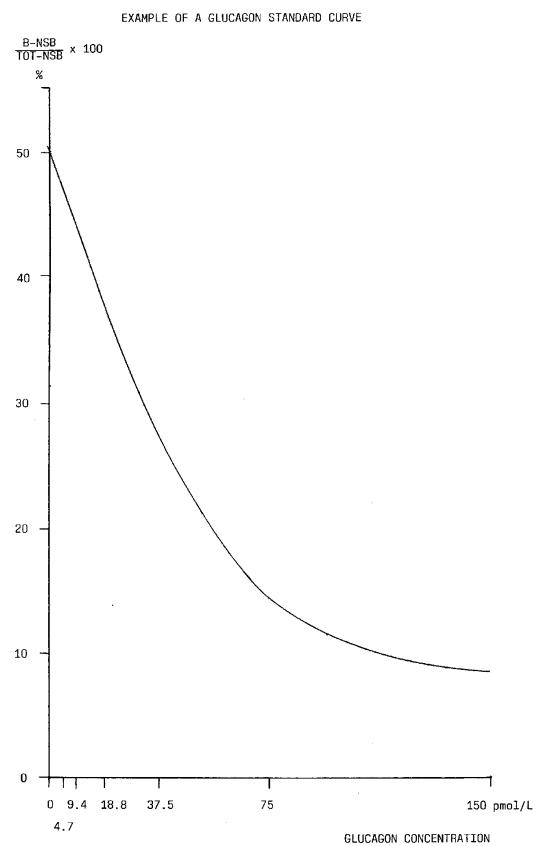
$$\frac{B_0}{TOT} \times 100 : 48,0 \%$$

$$\frac{NSB}{TOT} \times 100 : 5,4 \%$$

$$ED\ 80 : 14,5\ pmol/l$$

$$ED\ 50 : 39,8\ pmol/l$$

$$ED\ 20 : 100\ pmol/l$$



## XIII. EFICACIA Y LIMITACIONES

### A. Sensibilidad

La concentración mínima detectable del ensayo es de 3 pmol/l. Esta cifra corresponde a una reducción de la fijación de 2 x DE de la radiactividad ligada al calibrador cero.

### B. Precisión

#### Variación intraensayo:

Nivel	Coeficiente de variación (%CV)	N
16,4 pmol/l	8,1	30
60,1 pmol/l	4,5	30

#### Variación total (suma de la variación intraensayo y la variación interensayo):

Nivel	Coeficiente de variación (%CV)	N
25,4 pmol/l	6,8	6
22,0 pmol/l	7,4	6
23,0 pmol/l	8,3	5
73,9 pmol/l	3,9	6
97,9 pmol/l	5,6	6

### C. Precisión

La recuperación fue del 97,6% al añadirse cantidades conocidas de glucagón a las muestras de plasma.

### D. Especificidad

Se han detectado las siguientes reacciones cruzadas:

Péptido	Reacción cruzada
Glucagón, pancreático, humano	100,0%
GLI intestinal	<0,1%
Secretina	<0,02%
Colecistoquinina -39	<0,02%
Péptido intestinal vasoactivo	<0,02%
Péptido inhibidor gástrico	<0,02%
GLP1	<0,1%
Oxintomodulina	<0,1%

#### E. Correlación

El ensayo Glucagón se correlaciona con el calibrador OMS 69/194.

#### F. Interferencia

Las muestras que presentan enturbiamiento, una hemólisis, una hiperlipemia o que contienen fibrina pueden dar resultados inexactos.

### XIV. CONTROL DE CALIDAD INTERNO

Para que el laboratorio pueda monitorizar completamente el rendimiento consistente del ensayo, deben comprobarse los siguientes factores importantes.

#### 1. Las concentraciones detectadas en los controles

Las concentraciones detectadas en los controles deben estar dentro de los límites que figuran en las etiquetas de los viales.

#### 2. Recuentos totales

Los recuentos totales obtenidos deben aproximarse a las CPM esperadas teniendo en cuenta la eficiencia del recuento y el deterioro radiactivo. El contenido de glucagón  $I^{125}$  de este kit dará un recuento total de 10 500 CPM (-5, +30%) en la fecha de fabricación (eficacia de recuento: 80%).

#### 3. Máxima fijación (Bo/TOT)

Calcular para cada ensayo el % de radiactividad ligada en el calibrador cero:

$$\frac{Bo}{TOT} \times 100$$

TOT

#### 4. Fijación no específica (NSB/TOT)

Calcular para cada ensayo el porcentaje de fijación no específica:

$$\frac{NSB}{TOT} \times 100$$

TOT

La fijación no específica debe ser de menos del 6%.

#### 5. Pendiente de la curva de calibración

Por ejemplo, monitorizar los puntos 80, 50 y 20% de la línea de calibración para controlar la reproducibilidad entre ensayos.

### XV. INTERVALOS DE REFERENCIA

Nivel normal de glucagón en plasma después de 12 horas en ayunas: <60 pmol/l (obtenido con este método). Se recomienda que los usuarios establezcan intervalos de referencia para las poblaciones atendidas por sus propios laboratorios.

### XVI. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

#### Seguridad

Solo para uso diagnóstico *in vitro*.

Puesto que la normativa varía de un país a otro, es fundamental que la persona responsable del laboratorio esté familiarizada con la normativa local vigente relativa a todos los aspectos de los materiales radiactivos del tipo y cantidad de los utilizados en esta prueba.

Este kit contiene componentes de origen humano. Todos ellos han sido analizados mediante inmunoensayos para el antígeno de superficie de la hepatitis B, los anticuerpos del VHC y los anticuerpos del VIH-1 y VIH-2, dando todos ellos negativo. No obstante, se deben respetar todas las precauciones recomendadas para manipular cualquier derivado de la sangre.

Este kit contiene  $I^{125}$  (vida media: 60 días), emisor de rayos X (28 keV) y de rayos  $\gamma$  (35,5 keV) ionizantes. Se deben seguir los pasos necesarios para garantizar la correcta manipulación del material radiactivo de acuerdo con la normativa local y/o nacional. Solo el personal autorizado debe tener acceso a los reactivos.

Al manipular materiales radiactivos, se deben adoptar las siguientes precauciones:

- El material radiactivo debe almacenarse en zonas especialmente designadas para tal efecto, normalmente no accesibles para el personal no autorizado.
- La manipulación del material radiactivo debe realizarse solamente en zonas autorizadas.
- Debe tenerse mucho cuidado para evitar la ingestión del material y el contacto del material con la piel y la ropa.  
No pipetear soluciones radiactivas con la boca.
- En los lugares donde se está utilizando material radiactivo, debe estar prohibido beber, comer o fumar.
- Las manos se deben proteger con guantes y deben lavarse después de utilizar materiales radiactivos.
- El trabajo se debe realizar sobre una superficie cubierta de un material absorbente desecharable.
- En caso de derrame, el material radiactivo debe recogerse inmediatamente y todos los materiales contaminados deben ser eliminados como residuos radiactivos. Las superficies contaminadas deben limpiarse con detergente.

Los reactivos de este kit contienen azida sódica. La azida sódica puede reaccionar con el plomo y el cobre de las tuberías formando depósitos acumulados de azida altamente explosivos. Al eliminar los reactivos por el desagüe, verter siempre abundantes cantidades de agua para evitar la formación de azidas metálicas. Las

tuberías que se sospeche se han contaminado con estos depósitos explosivos deben limpiarse a fondo con una solución del 10% de hidróxido de sodio.

### XVII. REFERENCIAS

1. Bromer, W.W., Staub, A., Sinn, L.G. and Behrens, O.K. I. Am. Chem. Soc. 79:2801, 1957.
2. Ferner, H. Am. J. Dig. Dis. 20:301, 1953.
3. Thim, L. and Moody, A.J. Peptides Q1 (supl. 2):37, 1981.
4. Cherrington, A.D., Williams, P.E., Liljenquist, J.E. and Lacy, W.W. In: Endocrine pancreas and diabetes. (Ed. J. Pierluissi), págs. 172-191. Excerpta Medica, Amsterdam and Oxford.
5. Sherwin, R., Tamborlane, D., Hendler, R., Saccà, L., De Fronzo, R. and Felig, P. J. Clin. Endocrinol. Metab. 45:1104-1107, 1977.
6. Gerich, J., Rizza, R., Haymond, M., Miles, J., Verdonk, C. and Cryer, P. In: Current views of hypoglycemia and glucagon (ed. D. Andreani, P.J. Lefebvre and V. Marks), págs. 117-126. Academic Press, Londres 1980.
7. Boden, G., Master, R.W., Rezvani, I., Palmer, J.P., Lobe, T.E. and Owen, O.E. J. Clin. Invest 65:706-716, 1980.
8. Mallinson, C.N., Bloom, S.R., Warin, P.R., Salmon, P.R. and Cox, B. Lancet 2:1-5, 1974.
9. Müller, W.A., Berger, M., Suter, P., Cuppers, H.J., Reiter, J., Wyss, T., Berchtold, P., Schmidt, F.H., Assal, J.P. and Renold, A.E. J. Clin. Invest 63:820-827, 1979.
10. Von Schenck, H., Vasquez, B. and Unger, R.H. Horm. Metab. Res 14:69-71, 1982.
11. Unger, R.H. and Orci, L. Lancet 1:14-16, 1975.
12. Gerich, J., Lorenzi, M., Bier, D., Schneider, V., Tsalikian, E., Karam, J. and Forsham, P. N Engl. J. Med. 292:985-989, 1975.
13. Unger, R.H. Metabolism 27:1691-1709, 1978.
14. Von Schenck, H. In: Methods in diabetes Reserach, Vol. I, Laboratory Methods, part B (Ed. Joseph Larner and Stephen Pohl).

### XVIII. RESUMEN DEL PROTOCOLO

	Recuento total	NSB	Calibrador (0-6)	Controles	Muestras
Calibrador	-	-	200 µl	-	-
Controles	-	-	-	200 µl	-
Muestras	-	-	-	-	200 µl
Antiglucagó n	-	-			500 µl
Diluyente del ensayo	-	700 µl	-	-	-
Agitar e incubar durante 20-24 horas a 2-8 °C.					
Trazador $I^{125}$			500 µl		
Agitar e incubar durante 20-24 horas a 2-8 °C.					
Fase sólida de doble anticuerpo	-		100 µl		
Agitar e incubar durante 30-60 minutos a 2-8 °C.					
Centrifugar durante 15 minutos (1700 g; 4 °C)					
Decantar y contar la radiactividad de los precipitados					

Desde nuestro sitio web se pueden descargar otras traducciones de estas Instrucciones de uso: <https://www.diasource-diagnostics.com/>