



IVD

CE

# SM-C-RIA-CT

*KIP1589*

---

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

Read entire protocol before use.

## SM-C-RIA-CT

### I. INTENDED USE

Radioimmunoassay for the *in vitro* quantitative measurement of human Somatomedin-C (SM-C) in serum and plasma.

### II. GENERAL INFORMATION

- A. **Proprietary name :** DIAsource SM-C-RIA-CT Kit
- B. **Catalog number :** KIP1589 : 96 tests
- C. **Manufactured by :** DIAsource ImmunoAssays S.A.  
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

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

### III. CLINICAL BACKGROUND

#### A. Biological activities

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

#### B. Clinical applications

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

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


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

#### IV. PRINCIPLES OF THE METHOD

In the present kit, DIAsource has introduced a pre-treatment step in order to improve the clinical performance of the assay. It is well established that the binding proteins interfere with the radioimmunoassay for SM-C. The pre-treatment step used by DIAsource is the acid-ethanol procedure of Daughaday et al. (8).

A fixed amount of <sup>125</sup>I labelled SM-C competes with the SM-C to be measured present in the sample or in the calibrator for a fixed amount of antibody sites being immobilized to the wall of a polystyrene tube. After an overnight incubation at 2-8°C, an aspiration step stops the competition reaction. The tubes are then washed with 3 ml of wash solution and aspirated again. A calibration curve is plotted and the SM-C concentrations of the samples are determined by dose interpolation from the calibration curve.

#### V. REAGENTS PROVIDED

Reagents	96 Test Kit	Reconstitution			
 Tubes coated with anti SM-C	2 x 48	Ready for use			
<table border="1" data-bbox="119 683 255 728"><tr><td>Ag</td><td><sup>125</sup>I</td></tr></table> TRACER: <sup>125</sup> Iodine labelled SM-C (HPLC grade) in phosphate buffer with bovine casein and azide (<0.1%)	Ag	<sup>125</sup> I	1 vial 50 ml 145 kBq	Ready for use	
Ag	<sup>125</sup> I				
<table border="1" data-bbox="127 862 247 907"><tr><td>CAL</td><td>0</td></tr></table> Zero calibrator in phosphate buffer with ovalbumin and azide (<0.1%)	CAL	0	1 vial lyophilised	Add 3 ml reconstitution solution	
CAL	0				
<table border="1" data-bbox="127 974 247 1019"><tr><td>CAL</td><td>N</td></tr></table> Calibrators - N = 1 to 5 (see exact values on vial labels) in phosphate buffer with ovalbumin and azide (<0.1%)	CAL	N	5 vials lyophilised	Add 1 ml reconstitution solution	
CAL	N				
<table border="1" data-bbox="103 1131 327 1176"><tr><td>REC</td><td>SOLN</td></tr></table> Reconstitution Solution containing ethanol	REC	SOLN	1 vial 10 ml	Ready for use	
REC	SOLN				
<table border="1" data-bbox="103 1232 327 1276"><tr><td>PRE</td><td>SOLN</td></tr></table> Pre-treatment Solution containing ethanol	PRE	SOLN	1 vial 20 ml	Ready for use	
PRE	SOLN				
<table border="1" data-bbox="103 1332 327 1377"><tr><td>NEUTR</td><td>SOLN</td></tr></table> Neutralization Solution containing phosphate buffer with bovine casein and azide (<0.1%)	NEUTR	SOLN	1 vial 30 ml	Ready for use	
NEUTR	SOLN				
<table border="1" data-bbox="103 1478 327 1523"><tr><td>WASH</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table> Wash solution (TRIS-HCl)	WASH	SOLN	CONC	1 vial 10 ml	Dilute 70 x with distilled water (use a magnetic stirrer).
WASH	SOLN	CONC			
<table border="1" data-bbox="103 1568 295 1612"><tr><td>CONTROL</td><td>N</td></tr></table> Controls - N = 1 or 3 in human plasma with thymol	CONTROL	N	3 vials lyophilised	Add 0.5 ml distilled water	
CONTROL	N				

**Note :** 1. Use the zero calibrator for sample dilutions.  
2. 1 ng of the calibrator preparation is equivalent to 1 ng of the 1<sup>st</sup> IS 91/554.

#### VI. SUPPLIES NOT PROVIDED

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

- Distilled water
- Pipettes for delivery of: 100 µl, 400 µl, 500 µl, 600 µl, 1 ml and 3 ml (the use of accurate pipettes with disposable plastic tips is recommended)
- Vortex mixer
- Magnetic stirrer
- 5 ml automatic syringe (Cornwall type) for washing
- Aspiration system (optional)
- Plastic tubes for pre-treatment of samples
- Tube shaker (1200 rpm)
- Centrifuge (3000 g)
- Incubator at 2-8°C

- Any gamma counter capable of measuring <sup>125</sup>I may be used (minimal yield 70%).

#### VII. REAGENT PREPARATION

- Calibrators:** Reconstitute the zero calibrator with 3 ml reconstitution solution and other calibrators with 1 ml reconstitution solution.
- Controls:** Reconstitute the controls with 0.5 ml distilled water.
- Working Wash solution:** Prepare an adequate volume of Working Wash solution by adding 69 volumes of distilled water to 1 volume of Wash Solution (70x). Use a magnetic stirrer to homogenize. Discard unused Working Wash solution at the end of the day.

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

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

#### IX. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

- Serum or plasma samples must be kept at 2-8°C.
- If the test is not run within 48 hrs, storage in aliquots at -20°C is recommended.
- Avoid successive freezing and thawing.
- Serum and heparinized plasma provide similar results.  
Y (serum) = 0.95x (hep. plasma) + 28      r = 0.91      n = 28  
Y (serum) = 0.89x (EDTA plasma) + 32      r = 0.88      n = 28
- After extraction, the samples can be stored at 2-8°C for 7 days.

#### X. PROCEDURE

##### A. Handling notes

Do not use the kit or components beyond expiry date. Do not mix materials from different kit lots. Bring all the reagents to room temperature prior to use.

Thoroughly mix all reagents and samples by gentle agitation or swirling. In order to avoid cross-contamination, use a clean disposable pipette tip for the addition of each reagent and sample.

High precision pipettes or automated pipetting equipment will improve the precision. Respect the incubation times.

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

Attention: Performance of the kit was defined based on samples tested in duplicate, it is thus important to use the kit as recommended in the IFU. For this reason, the volume of pre-treatment solution and neutralization solution provided in the kit is only sufficient to perform the pre-treatment for a duplicate determination of the patient samples

##### B. Pre-treatment step

- Label two plastic tubes for each sample and control.
- Dispense 100 µl of each sample and control into the first tube.
- Add 400 µl of pre-treatment solution into this tube.
- Shake all the tubes at 1200 rpm during 30 minutes.
- Centrifuge for 10 minutes at 1500 g.
- Take 100 µl of the supernatant and transfer it into the second labelled tube.
- Add 600 µl of the neutralisation solution to the second tube.
- Vortex each tube.

##### C. Modified pre-treatment procedure

In case of renal failure we recommend a modified extraction procedure.

- See pre-treatment step.
- Store the neutralized extract at -20°C for 1 h, then centrifuge immediately at 3000 g for 30 min at 4°C.
- Decant the supernatant into fresh tubes and assay it as described below.

#### D. Procedure

1. Label coated tubes in duplicate for each calibrator, control and sample. For the determination of total counts, label 2 normal tubes.
2. Briefly vortex calibrators, controls and samples and dispense 100µl of each into respective tubes.
3. Dispense 500 µl of <sup>125</sup>Iodine labelled SM-C into each tube, including the uncoated tubes for total counts.
4. Shake the tube rack gently by hand to liberate any trapped air bubbles.
5. Incubate overnight at 2-8°C.
6. Aspirate (or decant) the content of each tube (except total counts). Be sure that the plastic tip of the aspirator reaches the bottom of the coated tube in order to remove all the liquid.
7. Wash tubes with 3 ml Working Wash solution (except total counts) and aspirate (or decant). Avoid foaming during the addition of the Working Wash solution.
8. Let the tubes stand upright for two minutes and aspirate the remaining drop of liquid.
9. Count tubes in a gamma counter for 60 seconds.

#### XI. CALCULATION OF RESULTS

1. Calculate the mean of duplicate determinations.
2. Calculate the bound radioactivity as a percentage of the binding determined at the zero calibrator point (0) according to the following formula :

$$B/B_0 (\%) = \frac{\text{Counts (Calibrator or sample)}}{\text{Counts (Zero Calibrator)}} \times 100$$

3. Plot the (B/B<sub>0</sub>(%)) values for each calibrator point as a function of the SM-C concentration of each calibrator point. Reject obvious outliers.
4. Computer assisted methods can also be used to construct the calibration curve. If automatic result processing is used, a 4-parameter logistic function curve fitting is recommended.
5. By interpolation of the sample (B/B<sub>0</sub> (%)) values, determine the SM-C concentrations of the samples from the calibration curve.
6. The concentrations read on the calibration curve must be multiplied by 35 (dilution factor during the pre-treatment step).
7. For each assay, the percentage of total tracer bound in the absence of unlabelled SM-C (B<sub>0</sub>/T) must be checked.

#### XII. TYPICAL DATA

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

SM-C	cpm	B/Bo (%)
Total count	41020	
Calibrator		
0 ng/ml	12493	100.0
0.45 ng/ml	11441	91.6
1.6 ng/ml	9590	76.8
5.1 ng/ml	6288	50.3
15 ng/ml	3401	27.2
47 ng/ml	1486	11.9

#### XIII. PERFORMANCE AND LIMITATIONS

##### A. Detection limit

Twenty zero calibrators were assayed along with a set of other calibrators. The detection limit, defined as the apparent concentration two standard deviations below the average counts at zero binding, was 0.25 ng/ml (x 35 for neat sample).

The limit of quantitation (LoQ) was calculated by testing 7 samples of low value 10 times in different test. The LoQ was calculated to be 0.85 ng/ml (29.75 ng/ml for neat sample) with CV of 20%.

#### B. Specificity

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

Compound	Cross-Reactivity (%)
SM-C (IGF-1)	100
IGF-II	0.3
Insuline	< 0.01
GH	< 0.01
EGF	< 0.01
MSA	< 0.01

Note: this table shows the cross-reactivity for the anti SM-C.

#### C. Precision

##### INTRA-ASSAY PRECISION

##### INTER-ASSAY PRECISION

Serum	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)	Serum	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)
A	20	38.8 ± 3.8	9.8	A	20	172 ± 18	10.4
B	20	160.8 ± 15.4	9.6	B	20	621 ± 32	5.2
C	20	664.0 ± 53.5	8.1				

SD: Standard Deviation; CV: Coefficient of variation

#### D. Accuracy

##### DILUTION TEST

Sample	Dilution	Theoretical Concent. (ng/ml)	Measured Concent. (ng/ml)
Serum A	1/1	-	549
	1/2	275	292
	1/4	137	153
	1/8	69	81
	1/16	34	31
	1/32	17	13
Serum B	1/1	-	449
	1/2	225	237
	1/4	112	128
	1/8	56	64
	1/16	28	30
	1/32	14	7

Samples were diluted with the zero calibrator.

##### RECOVERY TEST

Sample	added SM-C (ng/ml)	Recovered SM-C (ng/ml)	Recovered (%)
C1	155	123	79.4
C2	243	217	89.3
C3	316	271	85.8

##### Conversion factor:

From ng/ml to nmol/L: x 0.1307

From nmol/L to ng/ml: x 7.649

#### XIV. INTERNAL QUALITY CONTROL

- If the results obtained for Control 1 and/or Control 2 and/or Control 3 are not within the range specified on the vial label, the results cannot be used unless a satisfactory explanation for the discrepancy has been given.
- If desirable, each laboratory can make its own pools of control samples, which should be kept frozen in aliquots.
- Acceptance criteria for the difference between the duplicate results of the samples should rely on Good Laboratory Practises.

## REFERENCE INTERVALS

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

### Normal subjects

Age Group	MALES (ng/ml)			FEMALES (ng/ml)		
	Mean	Range (*)	N	Mean	Range (*)	N
0 - 2 years	136	32 - 339	12	138	45 - 361	8
3 - 5 years	117	47 - 287	10	132	42 - 276	12
6 - 8 years	189	75 - 311	15	170	59 - 297	12
9 - 11 years	233	85 - 553	20	300	188 - 515	10
12 - 14 years	398	139 - 727	18	463	214 - 753	12
15 - 17 years	577	123 - 1016	20	541	210 - 1064	20
18 - 20 years	601	135 - 1276	11	325	70 - 758	9
21 - 30 years	277	170 - 418	11	341	161 - 517	10
31 - 40 years	229	100 - 459	13	254	153 - 489	12
41 - 50 years	305	164 - 627	17	227	138 - 364	16
51 - >51 years	237	87 - 541	38	209	70 - 434	35

(\*) The range is based on 2.5% and 97.5% percentiles.

## XVI. PRECAUTIONS AND WARNINGS

### Safety

For in vitro diagnostic use only.

This kit contains <sup>125</sup>I (half-life: 60 days), emitting ionizing X (28 keV) and  $\gamma$  (35.5 keV) radiations.

This radioactive product can be transferred to and used only by authorized persons; purchase, storage, use and exchange of radioactive products are subject to the legislation of the end user's country. In no case the product must be administered to humans or animals.

All radioactive handling should be executed in a designated area, away from regular passage. A logbook for receipt and storage of radioactive materials must be kept in the lab. Laboratory equipment and glassware, which could be contaminated with radioactive substances, should be segregated to prevent cross contamination of different radioisotopes.

Any radioactive spills must be cleaned immediately in accordance with the radiation safety procedures. The radioactive waste must be disposed of following the local regulations and guidelines of the authorities holding jurisdiction over the laboratory. Adherence to the basic rules of radiation safety provides adequate protection.

The human blood components included in this kit have been tested by European approved and/or FDA approved methods and found negative for HBsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 and 2. No known method can offer complete assurance that human blood derivatives will not transmit hepatitis, AIDS or other infections. Therefore, handling of reagents, serum or plasma specimens should be in accordance with local safety procedures.

All animal products and derivatives have been collected from healthy animals. Bovine components originate from countries where BSE has not been reported. Nevertheless, components containing animal substances should be treated as potentially infectious.

Avoid any skin contact with reagents (sodium azide as preservative). Azide in this kit may react with lead and copper in the plumbing and in this way form highly explosive metal azides. During the washing step, flush the drain with a large amount of water to prevent azide build-up.

Do not smoke, drink, eat or apply cosmetics in the working area. Do not pipette by mouth. Use protective clothing and disposable gloves.

## XVII. BIBLIOGRAPHY

1. DAUGHADAY W.H. and ROTWEIN P. (1989)  
**Insulin-like growth factors I and II. peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum and tissue concentrations.**  
Endocrine Rev., 10(1) : 68-91.
2. FROESCH E.R. and ZAPF J. (1985)  
**Insulin-like growth factors and insulin : comparative aspects.**  
Diabetologia, 28 : 485-493.
3. FURLANETTO R.W., UNDERWOOD L., VAN WYK J.J., D'ERCOLE A.J. (1977)  
**Estimation of somatomedin-C levels in normals and patients with pituitary disease by radioimmunoassay.**  
J. Clin. Invest. 60 : 648.

4. ROSENFELD R.G., WILSON D.M., LEE P.D.K. and HINTZ R.L. (1986)  
**Insulin-like growth factors I and II in evaluation of growth retardation.**  
J. Pediatr., 109 : 428.
5. RUDMAN D., KUTNER M.H. and CHAWLA R.K. (1985)  
**The short child with subnormal plasma somatomedin-C.**  
Pediatric Res., 19(10) : 975-980.
6. ALBERTSSON-WIKLAND K. and HALL K. (1987)  
**Growth hormone treatment in short children : relationship between growth and serum insulin-like growth factor I and II levels.**  
J. Clin. Endocrinol Metab., 65 : 671.
7. WASS J.A.H., CLEMMONS D.R., UNDERWOOD L.E., BARROW L., BESSER G.M. and VAN WYK J.J. (1982)  
**Changes in circulating somatomedin-C levels in bromocriptine treated acromegaly.**  
Clin. Endocrinol., 17 : 369-377.
8. DAUGHADAY W.H., MARIZ I.K. and BLETHEN S.L. (1980)  
**Inhibition of access of bound somatomedin to membrane receptor and immunobinding sites - a comparison of radioreceptor and radioimmunoassay of somatomedin in native and acid-ethanol extracted serum.**  
J. Clin. Endocrinol. Metab., 51 : 781.
9. BREIERB.H., GALLAHER B.W. and GLUCKMAN P.D. (1991)  
**Radioimmunoassay for insulin-like growth factor-I : solutions to some potential problems and pitfalls.**  
Journal of Endocrinology, 128 : 347-357.
10. SCHOUTEN J.S.A.G. and al. (1993)  
**IGF1 : a prognostic factor of knee osteoarthritis.**  
British J. Rheumatol., 32 : 274-280.
11. GRONBAEK H., SKJAERBAEK C., NIELSEN B., FRYSTYK J., FOEGH M.L., FLYVBJERG A., ORSKOV H. (1995)  
**Growth hormone and insulin-like growth factor-I: a suggested role in renal transplantation and graft vessel disease.**  
Transplant. Proceed., 27/3 : 2133-2136.
12. TSITOURAS P.D., ZHONG Y.G., SPUNGEN A.M., BAUMAN W.A. (1995)  
**Serum testosterone and growth hormone insulin-like growth factor-I in adults with spinal cord injury.**  
Hormone and metabolic Research , 27/6 : 287-292.
13. KOCH A., DORR H.G., GERLING S., BEHRENS R., BOHLES H.J. (1995)  
**Effect of growth hormone on IDF-I levels in patients with growth hormone deficiency and Wilson disease.**  
Hormone Research, 44/1 : 40-44.

**XVIII. SUMMARY OF THE PROTOCOL**

	<b>TOTAL COUNTS µl</b>	<b>CALIBRATORS µl</b>	<b>SAMPLE(S) CONTROLS µl</b>
<b><u>PRE-TREATMENT</u></b>			
Samples, controls	-	-	100
Pre-treatment solution	-	-	400
Incubation Centrifugation	30 minutes with continuous shaking at 1200 rpm 10 minutes at 1500 g		
Supernatant	-	-	100
Neutralization Solution	-	-	600
Shaking	Vortex		
<b><u>INCUBATION</u></b>			
Calibrators (0 to 5)	-	100	-
Pre-treated Samples, controls	-	-	100
Tracer	500	500	500
Incubation	Overnight at 2-8°C		
Separation Working Wash solution Separation	-	Aspirate (or decant) 3.0 ml Aspirate (or decant)	
Counting	Count tubes for 60 seconds		

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



Lire entièrement le protocole avant utilisation.

# SM-C-RIA-CT

## I. BUT DU DOSAGE

Trousse de dosage radio-immunologique pour la mesure quantitative *in vitro* de la Somatomédine-C (SM-C) dans le sérum et le plasma humain.

## II. INFORMATIONS GENERALES

- A. **Nom du produit :** DIAsource SM-C -RIA-CT kit
- B. **Numéro de catalogue:** KIP1589 : 96 tests
- C. **Fabriqué par :** DIAsource ImmunoAssays S.A.  
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgique.

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

### B. Applications cliniques

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



















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

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

#### IV. PRINCIPES DU DOSAGE

Dans la présente trousse, DIASource a introduit une phase pré-traitement afin d'améliorer les performances cliniques de la trousse. Il est prouvé que les protéines d'adhésion ont une influence sur la trousse radio-immunologique pour le dosage de la SM-C. La phase de pré-traitement utilisé par DIASource est la procédure acide-éthanol de Daughaday et al. (8). Une quantité fixe de SM-C marquée à  $^{125}\text{I}$  est en compétition avec la SM-C à mesurer et présente dans l'échantillon ou dans le calibrateur pour une quantité fixe d'anticorps immobilisés sur les parois du tube en polystyrène. Après une nuit d'incubation à 2-8°C, le liquide est aspiré pour terminer la réaction de compétition. Les tubes sont lavés avec 3 ml de Solution de Lavage et aspirés à nouveau. Une courbe de calibration est réalisée et la concentration en SM-C des échantillons est déterminée par interpolation de la dose sur la courbe de calibration.

#### V. REACTIFS FOURNIS

Réactifs	96 Tests	Reconstitution
 Tubes recouverts avec l'anti SM-C	2 x 48	Prêt à l'emploi
  TRACEUR: SM-C marquée à $^{125}\text{I}$ (grade HPLC) dans un tampon phosphate avec de la caséine bovine et de l'azide de sodium (<0,1%)	1 flacon 50 ml 145 kBq	Prêt à l'emploi
  Calibrateur zéro dans un tampon phosphate avec de l'ovalbumine et de l'azide de sodium (<0,1%)	1 flacon lyophilisé	Ajouter 3 ml de Solution de Reconstitution
  Calibrateurs SM-C - N = 1 à 5 (cfr. valeurs exactes sur chaque flacon) dans un tampon phosphate avec de l'ovalbumine et de l'azide de sodium (<0,1%)	5 flacons lyophilisés	Ajouter 1 ml de Solution de Reconstitution
  Solution de Reconstitution contenant de l'éthanol	1 flacon 10 ml	Prêt à l'emploi
  Solution de Pré-traitement contenant de l'éthanol	1 flacon 20 ml	Prêt à l'emploi
  Solution de Neutralisation dans un tampon phosphate avec de la caséine bovine et de l'azide de sodium (<0,1%)	1 flacon 30 ml	Prêt à l'emploi
   Solution de lavage (TRIS-HCl)	1 flacon 10 ml	Diluer 70x avec de l'eau distillée (utiliser un agitateur magnétique).
  Contrôles - N = 1 à 3 dans du plasma humain et du thymol	3 flacons lyophilisés	Ajouter 0,5 ml d'eau distillée

**Note :** Utiliser le calibrateur zéro pour la dilution des échantillons.  
1 ng de la préparation du calibrateur est équivalent à 1 ng de  $^{125}\text{I}$  91/554.

#### VI. MATERIELS NON FOURNIS

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

- Eau distillée
- Pipettes pour distribuer: 100 µl, 400 µl, 500 µl, 600 µl, 1 ml et 3 ml (l'utilisation de pipettes précises et de pointes en plastique est recommandée)

- Des tubes en plastique pour le pré-traitement des échantillons.
- Agitateur vortex
- Agitateur magnétique
- Seringue automatique de 5 ml (type Cornwall) pour les lavages
- Système d'aspiration
- Agitateur de tubes
- Centrifugeuse (3000 g)
- Incubateur à 2-8°C
- Tout compteur gamma capable de mesurer  $^{125}\text{I}$  peut être utilisé (rendement minimum 70%).

#### VII. PREPARATION DES REACTIFS

- Calibrateurs:** Reconstituer le calibrateur zéro avec 3 ml de Solution de Reconstitution et les autres calibrateurs avec 1 ml de Solution de Reconstitution.
- Contrôles :** Reconstituer les contrôles avec 0,5 ml d'eau distillée.
- Solution de Lavage :** Préparer un volume adéquat de Solution de Lavage en ajoutant 69 volumes d'eau distillée à 1 volume de Solution de Lavage (70x). Utiliser un agitateur magnétique pour homogénéiser. Eliminer la Solution de Lavage non utilisée à la fin de la journée.

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

- Avant l'ouverture ou la reconstitution, tous les composants de la trousse sont stables jusqu'à la date d'expiration, indiquée sur l'étiquette, si la trousse est conservée entre 2 et 8°C.
- Après reconstitution, les calibrateurs et les contrôles sont stables pendant 7 jours entre 2 et 8°C. Pour de plus longues périodes de stockage, des aliquots devront être réalisés et ceux-ci seront gardés à -20°C pendant 3 mois. Eviter des cycles de congélation et décongélation successifs.
- La Solution de Lavage préparée doit être utilisée le jour même.
- Après la première utilisation, le traceur est stable jusqu'à la date d'expiration, si celui-ci est conservé entre 2 et 8°C dans le flacon d'origine correctement fermé.
- Des altérations dans l'apparence physique des réactifs de la trousse peuvent indiquer une instabilité ou une détérioration.

#### IX. PREPARATION ET STABILITE DE L'ECHANTILLON

- Les échantillons de sérum et plasma doivent être gardés entre 2 et 8°C.
- Si le test n'est pas réalisé dans les 48 heures, un stockage à -20°C est recommandé.
- Eviter des cycles de congélation et décongélation successifs. Le sérum ou le plasma hépariné donne des résultats similaires.  
 $Y(\text{sérum}) = 0,95x(\text{hép. plasma}) + 28$   $r = 0,91$   $n = 28$   
 $Y(\text{sérum}) = 0,89x(\text{EDTA plasma}) + 32$   $r = 0,88$   $n = 28$
- Après extraction, les échantillons peuvent être gardés à 2-8°C pendant 7 jours.

#### X. MODE OPERATOIRE

##### A. Notes de manipulation

Ne pas utiliser la trousse ou ses composants après avoir dépassé la date d'expiration. Ne pas mélanger du matériel provenant de trousses de lots différents. Mettre tous les réactifs à température ambiante avant utilisation. Mélangez à fond tous les réactifs et les échantillons sous agitation douce. Pour éviter toute contamination croisée, utiliser une nouvelle pointe de pipette pour l'addition de chaque réactif et échantillon. Des pipettes de haute précision ou un équipement de pipetage automatique permettent d'augmenter la précision. Respecter les temps d'incubation. Préparer une courbe de calibration pour chaque nouvelle série d'expériences, ne pas utiliser les données d'expériences précédentes. Attention : Les performances du kit ont été définies sur la base d'échantillons testés en double, il est donc important d'utiliser le kit tel que recommandé dans l'IFU. Pour cette raison, le volume de solution de prétraitement et de solution de neutralisation fourni dans le kit est uniquement suffisant pour effectuer le prétraitement pour une détermination en double des échantillons de patients

##### B. Phase de pré-traitement

- Identifier deux tubes en plastique pour chaque échantillon et contrôle.
- Distribuer 100 µl de chaque échantillon et contrôle dans le premier tube.
- Ajouter 400 µl de Solution de Pré-traitement à ce tube.
- Agiter tous les tubes à 1200 rpm pendant 30 minutes.
- Centrifuger pour 10 minutes à 1500 g.
- Prendre 100 µl du surnageant et transférer au second tube identifié.
- Ajouter 600 µl de la Solution de Neutralisation au second tube.
- Mélanger chaque tube (Vortex).

### C. Procédure de pré-traitement modifiée

En cas d'insuffisance rénale nous recommandons une procédure d'extraction modifiée.

- 1-8. Voir phase de pré-traitement.
9. Garder l'extrait neutralisé à -20°C pendant 1 h, puis centrifuger immédiatement à 3000 g pendant 30 min à 4°C.
10. Décantier le surnageant dans de nouveaux tubes et tester comme il est décrit ci-dessous.

### D. Mode opératoire

1. Identifier les tubes recouverts fournis dans la trousse en double pour chaque calibrateur, échantillon, contrôle. Pour la détermination de l'activité totale, identifier 2 tubes non recouverts.
2. Agiter au vortex brièvement les calibrateurs, les échantillons et les contrôles. Puis distribuer 100 µl de chacun d'eux dans leurs tubes respectifs.
3. Distribuer 0,5 ml de SM-C marquée à l'<sup>125</sup>Iodine dans chaque tube, y compris les tubes sans anticorps pour la détermination de l'activité totale.
4. Agiter gentiment le portoir de tube pour libérer toute bulle d'air emprisonnée.
5. Incuber pendant une nuit à 2-8°C.
6. Aspirer le contenu de chaque tube (à l'exception des tubes utilisés pour la détermination de l'activité totale). Assurez-vous que la pointe utilisée pour aspirer le liquide des tubes atteint le fond de chacun d'eux pour éliminer toute trace de liquide.
7. Laver les tubes avec 3 ml de Solution de Lavage (à l'exception des tubes utilisés pour la détermination de l'activité totale) et aspirer. Éviter la formation de mousse pendant l'addition de la Solution de Lavage.
8. Laisser les tubes droits pendant 2 minutes et aspirer le reste de liquide.
9. Placer les tubes dans un compteur gamma pendant 60 secondes pour quantifier la radioactivité.

## XI. CALCUL DES RESULTATS

1. Calculer la moyenne de chaque détermination réalisée en double.
2. Calculer la capacité de liaison de l'essai comme un pourcentage de liaison déterminé au point de calibration (0) en suivant la formule ci-dessous :

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

3. Porter en ordonnée les valeurs exprimées en pourcentage de liaison (B/B<sub>0</sub>(%)) de chaque point de calibration et en abscisse leur concentration respective en SM-C, écarter les valeurs aberrantes.
4. Des méthodes informatiques peuvent aussi être utilisées pour construire la courbe de calibration. Si un système d'analyse de traitement informatique des données est utilisé, il est recommandé d'utiliser la fonction « 4 paramètres » du lissage de courbes.
5. L'interpolation des valeurs de chaque échantillon (B/B<sub>0</sub>(%)) détermine les concentrations en SM-C à partir de la courbe de calibration.
6. Les concentrations sur la courbe de calibration doivent être multipliés par 35 (facteur de dilution).
7. Pour chaque essai, le pourcentage total de traceur lié en absence de SM-C non marquée (B<sub>0</sub>/T) doit être vérifié.

## XII. DONNEES TYPES

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

SM-C	cpm	B/Bo (%)
Activité totale	41020	
Calibrateur		
0,0 ng/ml	12493	100,0
0,45 ng/ml	11441	91,6
1,6 ng/ml	9590	76,8
5,1 ng/ml	6288	50,3
15,0 ng/ml	3401	27,2
47,0 ng/ml	1486	11,9

## XIII. PERFORMANCE ET LIMITATIONS

### A. Limite de détection

Vingt calibrateurs zéro ont été testés en parallèle avec un assortiment d'autres calibrateurs.

La limite de détection, définie comme la concentration apparente située 2 déviations standards en-dessous de la moyenne déterminée à la fixation zéro, était de 0,25 ng/ml (x 35 pour échantillon pur).

La limite de quantification (LoQ) a été calculée en testant 7 échantillons ayant une valeur faible 10 fois dans différents tests. La LoQ calculée est de 0.85 ng/ml (29,75 ng / ml pour un échantillon pur) avec un CV de 20%.

### B. Spécificité

Le pourcentage de réaction croisée estimé par la comparaison de la concentration (indiquant une inhibition de 50 %) est respectivement :

Composé	Réactivité Croisée (%)
SM-C (IGF-1)	100
IGF-II	0,3
Insuline	< 0,01
GH	< 0,01
EGF	< 0,01
MSA	< 0,01

Note: cette table montre la réactivité croisée pour l'anti SM-C

### C. Précision

INTRA-ESSAI				INTER-ESSAI			
Sérum	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)	Sérum	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)
A	20	38,8 ± 3,8	9,8	A	20	172 ± 18	10,4
B	20	160,8 ± 15,4	9,6	B	20	621 ± 32	5,2
C	20	664,0 ± 53,5	8,1				

SD : Déviation Standard; CV: Coefficient de variation

### D. Exactitude

#### TEST DE DILUTION

Echantillon	Dilution	Concent. Théorique (ng/ml)	Concent. Mesurée (ng/ml)
A	1/1	-	549
	1/2	275	292
	1/4	137	153
	1/8	69	81
	1/16	34	31
	1/32	17	13
B	1/1	-	449
	1/2	225	237
	1/4	112	128
	1/8	56	64
	1/16	28	30
	1/32	14	7

L'échantillon a été dilué avec le calibrateur zéro

#### TEST DE RECUPERATION

Echantillon	SM-C ajouté (ng/ml)	SM-C récupéré (ng/ml)	Récupération (%)
C1	155	123	79,4
C2	243	217	89,3
C3	316	271	85,8

Facteur de conversion:

De ng/ml à nmol/L: x 0,1307

De nmol/L à ng/ml: x 7,649

## XIV. CÔNTROLE DE QUALITE INTERNE

- Si les résultats obtenus pour le(s) contrôle(s) 1 et/ou 2 et/ou 3 ne sont pas dans l'intervalle spécifié sur l'étiquette du flacon, les résultats ne peuvent pas être utilisés à moins que l'on ait donné une explication satisfaisante de la non-conformité.
- Chaque laboratoire est libre de faire ses propres stocks d'échantillons contrôles, lesquels doivent être congelés aliquotés.
- Les critères d'acceptation pour les écarts des valeurs en duplicat des échantillons doivent être basés sur les pratiques de laboratoire courantes.

#### XIV. VALEURS ATTENDUES

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

Sujets normaux.

Age	MASCULIN (ng/ml)			FEMININ (ng/ml)		
	Moyenne	Portée (*)	N	Moyenne	Portée (*)	N
0 - 2 ans	136	32 - 339	12	138	45 - 361	8
3 - 5 ans	117	47 - 287	10	132	42 - 276	12
6 - 8 ans	189	75 - 311	15	170	59 - 297	12
9 - 11 ans	233	85 - 553	20	300	188 - 515	10
12 - 14 ans	398	139 - 727	18	463	214 - 753	12
15 - 17 ans	577	123 - 1016	20	541	210 - 1064	20
18 - 20 ans	601	135 - 1276	11	325	70 - 758	9
21 - 30 ans	277	170 - 418	11	341	161 - 517	10
31 - 40 ans	229	100 - 459	13	254	153 - 489	12
41 - 50 ans	305	164 - 627	17	227	138 - 364	16
51 - >51 ans	237	87 - 541	38	209	70 - 434	35

(\*)La portée observée est basée sur des percentiles 2,5% à 97,5%.

#### XV. PRECAUTIONS ET AVERTISSEMENTS

##### Sécurité

Pour utilisation en diagnostic *in vitro* uniquement.

Cette trousse contient de l'<sup>125</sup>I (demi-vie: 60 jours), une matière radioactive émettant des rayonnements ionisants X (28 keV) et  $\gamma$  (35.5 keV).

Ce produit radioactif peut uniquement être reçu, acheté, possédé ou utilisé par des personnes autorisées; l'achat, le stockage, l'utilisation et l'échange de produits radioactifs sont soumis à la législation du pays de l'utilisateur final. Ce produit ne peut en aucun cas être administré à l'homme ou aux animaux.

Toutes les manipulations radioactives doivent être exécutées dans un secteur désigné, éloigné de tout passage. Un journal de réception et de stockage des matières radioactives doit être tenu à jour dans le laboratoire. L'équipement de laboratoire et la verrerie, qui pourrait être contaminée avec des substances radioactives, doivent être isolés afin d'éviter la contamination croisée de plusieurs isotopes.

Toute contamination ou perte de substance radioactive doit être réglée conformément aux procédures de radio sécurité. Les déchets radioactifs doivent être placés de manière à respecter les réglementations en vigueur. L'adhésion aux règles de base de sécurité concernant les radiations procure une protection adéquate.

Les composants de sang humain inclus dans ce kit ont été évalués par des méthodes approuvées par l'Europe et/ou la FDA et trouvés négatifs pour HBsAg, l'anti-HCV, l'anti-HIV-1 et 2. Aucune méthode connue ne peut offrir l'assurance complète que des dérivés de sang humain ne transmettront pas d'hépatite, le sida ou toute autre infection. Donc, le traitement des réactifs, du sérum ou des échantillons de plasma devront être conformes aux procédures locales de sécurité. Tous les produits animaux et leurs dérivés ont été collectés d'animaux sains. Les composants bovins proviennent de pays où l'ESB n'a pas été détectée. Néanmoins, les composants contenant des substances animales devront être traités comme potentiellement infectieux.

L'azide de sodium est nocif s'il est inhalé, avalé ou en contact avec la peau (l'azide de sodium est utilisé comme agent conservateur). L'azide dans cette trousse pouvant réagir avec le plomb et le cuivre dans les canalisations et donner des composés explosifs, il est nécessaire de nettoyer abondamment à l'eau le matériel utilisé.

Ne pas fumer, ni boire, ni manger ni appliquer de produits cosmétiques dans les laboratoires où des produits radioactifs sont utilisés. Ne pas pipeter avec la bouche. Utiliser des vêtements protecteurs et des gants à usage unique.

#### XVII. BIBLIOGRAPHIE

1. DAUGHADAY W.H. and ROTWEIN P. (1989)  
**Insulin-like growth factors I and II. peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum and tissue concentrations.**  
Endocrine Rev., 10(1) : 68-91.
2. FROESCH E.R. and ZAPF J. (1985)  
**Insulin-like growth factors and insulin : comparative aspects.**  
Diabetologia, 28 : 485-493.
3. FURLANETTO R.W., UNDERWOOD L., VAN WYK J.J., D'ERCOLE A.J. (1977)  
**Estimation of somatomedin-C levels in normals and patients with pituitary disease by radioimmunoassay.**  
J. Clin. Invest. 60 : 648.

4. ROSENFELD R.G., WILSON D.M., LEE P.D.K. and HINTZ R.L. (1986)  
**Insulin-like growth factors I and II in evaluation of growth retardation.**  
J. Pediatr., 109 : 428.
5. RUDMAN D., KUTNER M.H. and CHAWLA R.K. (1985)  
**The short child with subnormal plasma somatomedin-C.**  
Pediatric Res., 19(10) : 975-980.
6. ALBERTSSON-WIKLAND K. and HALL K. (1987)  
**Growth hormone treatment in short children : relationship between growth and serum insulin-like growth factor I and II levels.**  
J. Clin. Endocrinol Metab., 65 : 671.
7. WASS J.A.H., CLEMMONS D.R., UNDERWOOD L.E., BARROW L., BESSER G.M. and VAN WYK J.J. (1982)  
**Changes in circulating somatomedin-C levels in bromocriptine treated acromegaly.**  
Clin. Endocrinol., 17 : 369-377.
8. DAUGHADAY W.H., MARIZ I.K. and BLETHEN S.L. (1980)  
**Inhibition of access of bound somatomedin to membrane receptor and immunobinding sites - a comparison of radioreceptor and radioimmunoassay of somatomedin in native and acid-ethanol extracted serum.**  
J. Clin. Endocrinol. Metab., 51 : 781.
9. BREIERB.H., GALLAHER B.W. and GLUCKMAN P.D. (1991)  
**Radioimmunoassay for insulin-like growth factor-I : solutions to some potential problems and pitfalls.**  
Journal of Endocrinology, 128 : 347-357.
10. SCHOUTEN J.S.A.G. and al. (1993)  
**IGF1 : a prognostic factor of knee osteoarthritis.**  
British J. Rheumatol., 32 : 274-280.
11. GRONBAEK H., SKJAERBAEK C., NIELSEN B., FRYSTYK J., FOEGH M.L., FLYVBJERG A., ORSKOV H. (1995)  
**Growth hormone and insulin-like growth factor-I: a suggested role in renal transplantation and graft vessel disease.**  
Transplant. Proceed., 27/3 : 2133-2136.
12. TSITOURAS P.D., ZHONG Y.G., SPUNGEN A.M., BAUMAN W.A. (1995)  
**Serum testosterone and growth hormone insulin-like growth factor-I in adults with spinal cord injury.**  
Hormone and metabolic Research , 27/6 : 287-292.
13. KOCH A., DORR H.G., GERLING S., BEHRENS R., BOHLES H.J. (1995)  
**Effect of growth hormone on IDF-I levels in patients with growth hormone deficiency and Wilson disease.**  
Hormone Research, 44/1 : 40-44.

**XVIII. RESUME DU PROTOCOLE**

	ACTIVITE TOTALE ( $\mu$ l)	CALIBRA- TEURS ( $\mu$ l)	ECHANTILLON(S) CONTROLES ( $\mu$ l)
<b>PRE-TRAITEMENT</b>			
Echantillons, contrôles	-	-	100
Solution de Pré- traitement	-	-	400
Incubation Centrifugation	30 minutes sous agitation continue à 1200 rpm 10 minutes à 1500 g		
Surageant	-	-	100
Solution de Neutralisation	-	-	600
Agiter	Vortex		
<b>INCUBATION</b>			
Calibrateurs (0 à 5)	-	100	-
Echantillons pré-traités, contrôles	-	-	100
Traceur	500	500	500
Incubation	une nuit à 2-8°C		
Séparation Solution de Lavage Séparation	-	aspiration 3,0 ml aspiration	
Comptage (radioactivité)	Temps de comptage des tubes : 60 secondes		

Lees het hele protocol vóór gebruik.

## SM-C-RIA-CT

### I. BEOOGD GEBRUIK

Radioimmunoassay voor de kwantitatieve bepaling *in vitro* van menselijk Somatomedine-C (SM-C) in serum en plasma.

### II. ALGEMENE INFORMATIE

- A. **Gedeponeerd handelsmerk:** DIASource SM-C -RIA-CT kit
- B. **Catalogusnummer:** KIP1589: 96 testen.
- C. **Geproduceerd door:** DIASource ImmunoAssays S.A.  
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, België.

Voor technische assistentie of voor bestelinformatie

kunt u contact opnemen met :

Tel : +32 (0)10 84.99.11

Fax: +32 (0)10 84.99.91

### III. KLINISCHE ACHTERGROND

#### A. Biologische activiteiten

Insuline-achtige groeifactor I (IGF-I) of Somatomedine-C (SM-C) is een basisch polypeptide van 70 aminozuren in een enkele keten (MG : 7649 DA) gelijkaardig aan pro-insuline (50% sequentiehomologie), en aan het andere goed gekarakteriseerde lid van de somatomedine-familie: IGF II (67AA, 70 % sequentiehomologie met IGF-I). SM-C is de belangrijkste factor die de groeistimulerende acties van het groeihormoon bemiddelt, een hypofysehormoon met sterk fluctuerende bloedspiegels te wijten aan de pulsatiele vrijgave. De bloedconcentratie van SM-C is stabiel door de binding aan draagproteïnen. De concentratie van het dominante bindingsproteïne (MG 53000 DA) evenals de productie van SM-C, worden geregeld door groeihormoon. SM-C wordt geproduceerd door de lever, en andere weefsels, en heeft endocriene, paracriene en autocriene activiteiten. Het stimuleert de groei en regelt de differentiatie van verschillende weefsels, vertoont insulineachtige activiteiten en bevordert kraakbeengroei. Hoewel GH de belangrijkste factor is in de controle van SM-C secretie en concentratie, zijn er ook andere determinerende factoren: de leeftijd (met een piek in de adolescentie), de sekse, de voedingsstatus, en andere hormonen (oestrogeen, thyroxine, prolactine, ...). Specifieke trofische stimuli controleren vooral SM-C secretie in de lokale micro-omgeving van een bepaald orgaan (paracriene activiteiten), terwijl de SM-C concentratie in bloed de belangrijkste variabele is voor gebalanceerde systemische groei (endocriene activiteiten).

#### B. Klinische toepassingen

· **Groeivertraging:** Groeivertraging kan te wijten zijn aan verschillende oorzaken, waaronder deficiënte GH-productie (hypopituitarisme), wat geassocieerd wordt met lage SM-C bloedspiegels. Omwille van de moeilijkheden om interpreteerbare resultaten te bekomen van GH-metingen (door dynamische multiple of stimulatietesten), wordt de determinatie van de stabiele SM-C concentratie in plasma vaak beschouwd als een eenvoudige screening- bepaling voor de evaluatie van "GH impregnatie" van de patiënt alvorens te besluiten tot uitgebreider onderzoek. In verschillende klinische situaties met gestoorde groei kunnen lage SM-C spiegels geobserveerd worden ondanks normale of hoge GH-productie (bv. ondervoeding, chronische ziekte-toestanden, sommige genetische dwergen zoals pygmeeën, ...). Interessant genoeg kunnen kinderen met discrete GH neuro-afscheiding dysfunctie lage SM-C-waarden vertonen ondanks normale GH-spiegels bij conventionele testen. De resultaten van de SM-C test moeten voorzichtig geïnterpreteerd worden door het in overweging nemen van de normale variaties van SM-C tijdens de kindertijd en de adolescentie (zie Rosenfeld et al).












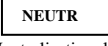




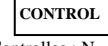

· **Acromegalie:** SM-C spiegels zijn verhoogd bij acromegalie (excessieve productie van GH) en kunnen dienen als een indicator voor de ernst van de ziekte. Resultaten worden sneller geïnterpreteerd omdat de normale waarden gemakkelijker gedefinieerd worden bij volwassenen. SM-C-metingen zijn ook nuttig om de behandeling op te volgen.

· **Research:** De SM-C RIA kit is een onschatbaar instrument om de modificaties van deze groeifactor te bestuderen tijdens fysiologische (i.e. zwangerschap) of pathologische (i.e. diabetes) situaties, en de lokale regulering van SM-C-productie in relatie met zijn paracriene and autocriene activiteiten (wondheling, regenereren van organen, neoplastische groei, foetale ontwikkeling, gonadale regulering, etc).

#### IV. BESCHRIJVING VAN DE METHODE

In deze kit heeft DIASource een pre-behandelingsstap geïntroduceerd om de klinische prestatie van de bepaling te verbeteren. Het is duidelijk aangetoond dat de bindingproteïnen tussenkomen in het radioimmunoassay voor SM-C. De pre-behandelingsstap gebruikt door DIASource is de zuur-ethanol procedure van Daughaday et al. (8). Een vaste hoeveelheid <sup>125</sup>I gelabeld SM-C concurreert met SM-C dat bepaald moet worden en aanwezig is in het monster of in de kalibrator voor een vast aantal plaatsen met antilichamen die geïmmobiliseerd zijn aan de wand van een buisje van polystyreen. Na een overnacht incubatie bij 2-8°C, wordt de concurrentiereactie beëindigd door een aspiratiefase. Daarna worden de buisjes gewassen met 3 ml werk-wasoplossing en opnieuw afgezogen. Een kalibratiecurve wordt uitgezet en de concentraties van SM-C van de monsters worden bepaald door dosisinterpolatie van de kalibratiecurve.

#### V. GELEVERDE REAGENTIA

Reagens	Kit voor 96 testen	Reconstitutie
 Buisjes gecoat met anti SM-C	2 x 48	Klaar voor gebruik
  Tracer : SM-C gelabeld met <sup>125</sup> jood (HPLC-kwaliteit) in fosfaat buffer met bovien caseïne en azide (<0,1%)	1 flacon 50 ml 145 kBq	Klaar voor gebruik
  Nulkalibrator in fosfaat buffer met ovalbumine en azide (<0,1%)	1 flacon, gevroes- droogd	3 ml reconstitutieoplossing <b>toevoegen</b>
  Kalibrators SM-C : N = 1 tot 5 (zie de exacte waarden op de flaconetiketten) in fosfaat buffer met ovalbumine en azide (<0,1%)	5 flacons, gevroes- droogd	1 ml reconstitutieoplossing <b>toevoegen</b>
  Reconstitutieoplossing die ethanol bevat	1 flacon 10 ml	Klaar voor gebruik
  Pre-behandelingsoplossing die ethanol bevat	1 flacon 20 ml	Klaar voor gebruik
  Neutralisatieoplossing in fosfaat buffer met bovien caseïne en azide (<0,1%)	1 flacon 30 ml	Klaar voor gebruik
   Wasoplossing 70x : TRIS-HCl	1 flacon 10 ml	70x met gedistilleerd water <b>verdunnen</b> (gebruik een magnetische roerder)
  Controles : N = 1 of 3 in humaan plasma met thymol	3 flacons, gevroes- droogd	0,5 ml gedistilleerd water <b>toevoegen</b>

**Opmerking:** Gebruik de nulkalibrator voor monsterverdunningen.

1 ng van de kalibratorbereiding is gelijk aan 1 ng van 1<sup>st</sup> IS 91/554.

#### VI. NIET MEEGELEVERDE MATERIALEN

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

- Gedistilleerd water.
- Pipetten voor een volume van 100 µl, 400 µl, 500 µl, 600 µl, 1 ml en 3 ml (het gebruik van nauwkeurige pipetten met plastic wegwerptips wordt aanbevolen).
- Plastic tubes voor de pre-behandeling van de stalen.
- Vortexmenger.
- Magnetische roerder.
- Automatische spuit van 5 ml (type Cornwall) voor de wasfase.
- Afzuigsysteem (facultatief).
- Schudder voor de buisjes
- Centrifuge (3000 g)
- Incubator bij 2-8°C
- Een gammateller die geschikt is voor de bepaling van <sup>125</sup>I. Een maximale telefficiëntie moet worden gegarandeerd.

#### VII. BEREIDING VAN HET REAGENS

- Kalibrators:** Reconstitueer de Nulkalibrator met 3 ml reconstitutieoplossing en de andere kalibratoren met 1 ml reconstitutieoplossing.
- Controles:** Reconstitueer de controles met 0,5 ml gedistilleerd water.
- Werk-wasoplossing:** Bereid een voldoende hoeveelheid werk-wasoplossing door 69 eenheden gedistilleerd water toe te voegen aan 1 eenheid wasoplossing. Gebruik een magnetische roerder voor de homogenisering. Op het eind van de dag moet de ongebruikte werk-wasoplossing afgevoerd worden.

#### VIII. OPSLAG EN VERVALDATUM VAN REAGENTIA

- Vóór opening of reconstitutie zijn alle kitcomponenten houdbaar tot de vervaldatum, zoals vermeld op het etiket, indien zij bewaard werden bij 2 tot 8°C.
- Na reconstitutie zijn de kalibrators en de controles gedurende 7 dagen houdbaar bij 2 tot 8°C. Voor een langere bewaartermijn moeten aliquots gemaakt worden, die bij -20°C bewaard moeten worden voor maximaal 3 maanden. Vermijd herhaalde invriezing en ontdooiing.
- Een vers bereide werk-wasoplossing moet op dezelfde dag nog gebruikt worden.
- Na het eerste gebruik is de tracer houdbaar tot de vervaldatum, indien bewaard bij 2 tot 8°C in de oorspronkelijke, goed afgesloten flacon.
- Wijzigingen in het fysieke aspect van kitreagentia kunnen wijzen op instabiliteit of op een kwaliteitsvermindering.

#### IX. MONSTERAFFNAME EN MONSTERBEREIDING

- Serum en plasmamonsters moeten bij 2-8°C bewaard worden.
- Indien de bepaling niet binnen 48 uur uitgevoerd wordt, dan wordt aanbevolen om ze bij -20°C te bewaren.
- Vermijd herhaalde invriezing en ontdooiing.
- Serum en gehepariniseerd plasma leveren vergelijkbare resultaten op.  
Y (serum) = 0,95x (hep. plasma) + 28      r = 0,91      n = 28  
Y (serum) = 0,89x (EDTA plasma) + 32      r = 0,88      n = 28
- Na extractie kunnen de stalen bewaard worden bij 2-8°C gedurende 7 dagen.

#### X. PROCEDURE

##### A. Opmerkingen bij de procedure

Gebruik de kit of de componenten niet langer dan de aangegeven vervaldatum. Materialen van kits van verschillende loten mogen niet gemengd worden. Laat alle reagentia op kamertemperatuur komen vóór gebruik.

Meng alle reagentia en monsters goed door ze voorzichtig te bewegen of door er voorzichtig mee te draaien. Om kruisbesmetting te vermijden, moet een propere wegwerpbare pipettip gebruikt worden voor toevoeging van elk reagens en monster.

Pipetten met een grote precisie of geautomatiseerde pipetteerapparatuur zullen de precisie verhogen. Respecteer de incubatietijden.

Bereid een kalibratiecurve voor elke run; men mag geen gegevens gebruiken van voorafgaande runs.

Let op: de prestaties van de kit zijn bepaald op basis van monsters die in tweevoud zijn getest. Het is dus belangrijk om de kit te gebruiken zoals aanbevolen in de gebruiksaanwijzing. Om deze reden is het volume van de voorbehandelingsoplossing en neutralisatieoplossing in de kit alleen voldoende om de voorbehandeling uit te voeren voor een duplicaatbepaling van de patiëntmonsters

##### B. Pre-behandelingsstap

- Etiketeer twee plastic buisjes voor elk staal en controle.
- Pipetteer 100 µl van elk monster en controle in het eerste buisje.
- Voeg 400 µl van de pre-behandelingsoplossing toe in dit buisje.
- Schud alle buisjes bij 1200 rpm gedurende 30 minuten.
- Centrifugeer 10 minuten bij 1500 g.
- Neem 100 µl van de supernatant en breng over naar het tweede geëtiketteerde buisje.
- Voeg 600 µl van de neutralisatieoplossing toe aan het tweede buisje.
- Vortex elk buisje.

### C. Gewijzigde pre-behandelingsprocedure

In geval van nierfalen raden we een gewijzigde extractieprocedure aan.

- 1-8. zie pre-behandelingsstap.
9. Bewaar het geneutraliseerde extract bij  $-20^{\circ}\text{C}$  gedurende 1 u, centrifugeer dan onmiddellijk bij 3000 g gedurende 30 min bij  $4^{\circ}\text{C}$ .
10. Decanteer de supernatant in nieuwe buisjes en test zoals hieronder beschreven.

### D. Procedure

1. Etiketteer de gecoatte buisjes in duplo voor elke kalibrator, voor elk monster, voor elke controle. Etiketteer 2 normale buisjes voor de bepaling van de totaal tellingen.
2. Vortex de kalibrators, monsters en controles gedurende korte tijd en pipetteer 100  $\mu\text{l}$  van elk in het desbetreffende buisje.
3. Pipetteer 0,5 ml SM-C dat met  $^{125}\text{I}$  gelabeld werd in elk buisje, inclusief de niet gecoatte buisjes voor de totaal tellingen.
4. Schud het rek met de buisjes voorzichtig zodat eventuele ingesloten luchtballen vrijkomen.
5. Incubeer overnacht bij  $2-8^{\circ}\text{C}$ .
6. Zuig de inhoud van elk buisje (met uitzondering van de totaal tellingen) op. Zorg ervoor dat de plastic tip van de aspirator tot aan de bodem van het gecoatte buisje komt zodat alle vloeistof verwijderd wordt.
7. Was de buisjes met 3 ml werk-wasvloeistof (met uitzondering van de totaal tellingen) en zuig op. Vermijd schuimvorming tijdens toevoeging van de werk-wasvloeistof.
8. Na de wasfase moeten de buisjes gedurende twee minuten rechtop blijven staan en zuig daarna de overblijvende vloeistof op.
9. Tel de buisjes in een gammateller gedurende 60 seconden.

### XI. BEREKENING VAN DE RESULTATEN

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

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

3. Zet de (B/B<sub>0</sub>(%)) waarden uit voor elk kalibratorpunt, als een functie van de SM-C concentratie van elk kalibratorpunt, verwerp hierbij de duidelijke uitschieters.
4. Ook computergestuurde methoden kunnen worden gebruikt om de kalibratiecurve te vormen. Indien de resultaten automatisch verwerkt worden, wordt de 4 parameter logistische functie aanbevolen voor de gepaste curve.
5. Bepaal de IGF-I-concentraties van de monsters uit de referentiecurve door de monsterwaarden (B/B<sub>0</sub>(%)) te interpoleren.
6. De concentraties afgelezen op de kalibratiecurve moeten vermenigvuldigd worden met 35 (verdunningsfactor).
7. Voor elke bepaling moet het totaalpercentage van de tracer, gebonden in afwezigheid van ongelabeld SM-C (B<sub>0</sub>/T), gecontroleerd worden.

### XII. KENMERKENDE GEGEVENS

De volgende gegevens dienen enkel ter illustratie en mogen in geen geval gebruikt worden ter vervanging van de real time kalibratiecurve.

SM-C	cpm	B/Bo (%)
Totaaltelling	41020	
Kalibrator		
0,0 ng/ml	12493	100,0
0,45 ng/ml	11441	91,6
1,6 ng/ml	9590	76,8
5,1 ng/ml	6288	50,3
15,0 ng/ml	3401	27,2
47,0 ng/ml	1486	11,9

### XIII. EIGENSCHAPPEN EN GRENZEN

#### A. Detectielimiet

Twintig nulkalibrators werden bepaald, samen met de serie andere kalibrators. De detectielimiet, omschreven als de schijnbare concentratie van twee standaarddeviaties onder de gemiddelde tellingen bij nulbinding, bedroeg 0,25 ng/ml (x 35 voor puur staal).

De kwantificatielimiet (LoQ) werd berekend door 7 monsters van lage waarde 10 keer in verschillende testen te testen. De LoQ werd berekend op 0,85 ng/ml (29,75 ng/ml voor een net staal) met een CV van 20%.

### B. Specificiteit

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

Bestanddeel	Kruisreactiviteit (%)
SM-C (IGF-1)	100
IGF-II	0,3
Insuline	< 0,01
GH	< 0,01
EGF	< 0,01
MSA	< 0,01

Nota: deze tabel toont de kruisreactiviteit voor het anti SM-C

### C. Precisie

#### PRECISIE BINNEN EEN TEST

#### PRECISIE TUSSEN TESTEN

Serum	N	<X> ± SD (ng/ml)	VC (%)	Serum	N	<X> ± SD (ng/ml)	VC (%)
A	20	38,8 ± 3,8	9,8	A	20	172 ± 18	10,4
B	20	160,8 ± 15,4	9,6	B	20	621 ± 32	5,2
C	20	664,0 ± 53,5	8,1				

SD: standaarddeviatie; VC: variatiecoëfficiënt

### D. Nauwkeurigheid

#### VERDUNNINGSTEST

Monster	Verdunning	Theoretische concentratie (ng/ml)	Concentratie die bepaald werd (ng/ml)
Serum A	1/1	-	549
	1/2	275	292
	1/4	137	153
	1/8	69	81
	1/16	34	31
	1/32	17	13
Serum B	1/1	-	449
	1/2	225	237
	1/4	112	128
	1/8	56	64
	1/16	28	30
	1/32	14	7

Monsters werden verdund met de Nulkalibrator.

#### RECOVERY-TEST

Monster	SM-C toegevoegd (ng/ml)	Recovery van SM-C (ng/ml)	Recovery (%)
C1	155	123	79,4
C2	243	217	89,3
C3	316	271	85,8

Conversiefactor:

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

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

### XIV. INTERNE KWALITEITSCONTROLE

- Indien de resultaten, die verkregen werden voor controle 1 en/of controle 2 en/of controle 3, niet binnen het bereik vallen zoals vermeld op het flaconetiket, dan mogen de resultaten niet gebruikt worden tenzij een bevredigende uitleg gegeven wordt voor de discrepantie.
- Indien gewenst, kan elk laboratorium zijn eigen pools voor controlemonsters maken, die dan in aliquots bewaard moeten worden in de diepvriezer.
- Aanvaardingscriteria voor het verschil tussen de resultaten in duplo van monsters moeten steunen op gangbare laboratoriumpraktijken.



## XV. REFERENTIE-INTERVALS

Deze waarden worden slechts als leidraad gegeven; elk laboratorium moet zijn eigen normaal bereik van waarden uitmaken.

### Normale subjecten

Leeftijd	MANNEN (ng/ml)			VROUWEN (ng/ml)		
	Gemid-deld	Bereik (*)	N	Gemid-deld	Bereik (*)	N
0 - 2 jaar	136	32 - 339	12	138	45 - 361	8
3 - 5 jaar	117	47 - 287	10	132	42 - 276	12
6 - 8 jaar	189	75 - 311	15	170	59 - 297	12
9 - 11 jaar	233	85 - 553	20	300	188 - 515	10
12 - 14 jaar	398	139 - 727	18	463	214 - 753	12
15 - 17 jaar	577	123 - 1016	20	541	210 - 1064	20
18 - 20 jaar	601	135 - 1276	11	325	70 - 758	9
21 - 30 jaar	277	170 - 418	11	341	161 - 517	10
31 - 40 jaar	229	100 - 459	13	254	153 - 489	12
41 - 50 jaar	305	164 - 627	17	227	138 - 364	16
51 - >51 jaar	237	87 - 541	38	209	70 - 434	35

(\*)Het geobserveerde bereik is gebaseerd op 2,5% tot 97,5% percentielen..

## XVI. VOORZORGSMAATREGELEN EN WAARSCHUWINGEN

### Veiligheid

Uitsluitend voor in vitro diagnostisch gebruik.

Deze kit bevat <sup>125</sup>I (halfwaardetijd: 60 dagen), dat ioniserende X- (28 keV) en  $\gamma$ -stralen (35.5 keV) uitzendt.

Dit radioactieve product mag enkel overhandigd worden aan en gebruikt worden door bevoegd personeel; ontvangst, opslag, gebruik en overdracht van radioactieve producten zijn onderworpen aan de wetgeving van het land van de eindgebruiker. In geen geval mag het product toegediend worden aan mensen of dieren.

Alle handelingen met radioactief materiaal moeten plaatsvinden in een daartoe bestemde ruimte, waar uitsluitend bevoegd personeel toegelaten wordt. Een logboek met ontvangst en opslag van radioactieve materialen moet worden bijgehouden in het laboratorium. Laboratoriumapparatuur en glaswerk, dat eventueel gecontamineerd werd met radioactieve bestanddelen, moeten worden gesegregeerd om kruisbesmetting van verschillende radioisotopen te vermijden.

Als radioactief materiaal gemorst werd, dan moet dat onmiddellijk gereinigd worden in overeenstemming met de procedure voor stralingsveiligheid. Het radioactieve afval moet worden weggegooid in overeenstemming met de plaatselijke voorschriften en richtlijnen van de autoriteiten waaronder het laboratorium valt. Naleving van de basisregels van stralingsveiligheid zorgt voor een juiste bescherming.

De componenten, afkomstig van menselijk bloed, in deze kit werden getest door in Europa goedgekeurde en/of door de Amerikaanse FDA goedgekeurde methoden op aanwezigheid van HBsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 en 2 en gaven een negatief resultaat. Geen enkele bekende methode kan echter volledige garanties bieden dat derivaten van menselijk bloed geen hepatitis, aids of andere infecties overdragen. Daarom moet men reagentia, serum- of plasmamonsters behandelen in overeenstemming met de plaatselijke veiligheidsprocedures.

Alle producten en derivaten van dierlijke oorsprong zijn afkomstig van gezonde dieren. Boviene componenten komen uit landen waar BSE niet gerapporteerd werd. Toch moeten componenten die bestanddelen van dierlijke oorsprong bevatten, behandeld worden als potentieel besmettelijk.

Vermijd dat de reagentia (natriumazide als conserveermiddel) in contact komen met de huid. Azide in deze kit kan reageren met lood en koper in de afvoerleidingen en op die manier zeer explosieve metaalaziden vormen. Tijdens de wasfase moeten de afvoerleidingen ruimschoots met water nagespoeld worden om ophoping van azide te vermijden.

Niet roken, drinken, eten of cosmetica aanbrengen in de werkruimte. Niet met de mond pipetteren. Draag beschermende kleding en gebruik wegwerphandschoenen.

## XVII. BIBLIOGRAFIE

1. DAUGHADAY W.H. and ROTWEIN P. (1989)  
**Insulin-like growth factors I and II. peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum and tissue concentrations.**  
Endocrine Rev., 10(1) : 68-91.
2. FROESCH E.R. and ZAPF J. (1985)  
**Insulin-like growth factors and insulin : comparative aspects.**  
Diabetologia, 28 : 485-493.

3. FURLANETTO R.W., UNDERWOOD L., VAN WYK J.J., D'ERCOLE A.J. (1977)  
**Estimation of spmatomedin-C levels in normals and patients with pituitary disease by radioimmunoassay.**  
J. Clin. Invest. 60 : 648.
4. ROSENFELD R.G., WILSON D.M., LEE P.D.K. and HINTZ R.L. (1986)  
**Insulin-like growth factors I and II in evaluation of growth retardation.**  
J. Pediatr., 109 : 428.
5. RUDMAN D., KUTNER M.H. and CHAWLA R.K. (1985)  
**The short child with subnormal plasma somatomedin-C.**  
Pediatric Res., 19(10) : 975-980.
6. ALBERTSSON-WIKLAND K. and HALL K. (1987)  
**Growth hormone treatment in short children : relationship between growth and serum insulin-like growth factor I and II levels.**  
J. Clin. Endocrinol Metab., 65 : 671.
7. WASS J.A.H., CLEMMONS D.R., UNDERWOOD L.E., BARROW L., BESSER G.M. and VAN WYK J.J. (1982)  
**Changes in circulating somatomedin-C levels in bromocriptine treated acromegaly.**  
Clin. Endocrinol., 17 : 369-377.
8. DAUGHADAY W.H., MARIZ I.K. and BLETHEN S.L. (1980)  
**Inhibition of access of bound somatomedin to membrane receptor and immunobinding sites - a comparison of radioreceptor and radioimmunoassay of somatomedin in native and acid-ethanol extracted serum.**  
J. Clin. Endocrinol. Metab., 51 : 781.
9. BREIERB.H., GALLAHER B.W. and GLUCKMAN P.D. (1991)  
**Radioimmunoassay for insulin-like growth factor-I : solutions to some potential problems and pitfalls.**  
Journal of Endocrinology, 128 : 347-357.
10. SCHOUTEN J.S.A.G. and al. (1993)  
**IGF1 : a prognostic factor of knee osteoarthritis.**  
British J. Rheumatol., 32 : 274-280.
11. GRONBAEK H., SKJAERBAEK C., NIELSEN B., FRYSTYK J., FOGH M.L., FLYVBJERG A., ORSKOV H. (1995)  
**Growth hormone and insulin-like growth factor-I: a suggested role in renal transplantation and graft vessel disease.**  
Transplant. Proceed., 27/3 : 2133-2136.
12. TSITOURAS P.D., ZHONG Y.G., SPUNGEN A.M., BAUMAN W.A. (1995)  
**Serum testosterone and growth hormone insulin-like growth factor-I in adults with spinal cord injury.**  
Hormone and metabolic Research , 27/6 : 287-292.
13. KOCH A., DORR H.G., GERLING S., BEHRENS R., BOHLES H.J. (1995)  
**Effect of growth hormone on IDF-I levels in patients with growth hormone deficiency and Wilson disease.**  
Hormone Research, 44/1 : 40-44.

**XVIII. SAMENVATTING VAN HET PROTOCOL**

	TOTAAL- TELLINGEN ( $\mu$ l)	KALIBRATORS ( $\mu$ l)	MONSTER(S) CONTROLES ( $\mu$ l)
<b>PRE-BEHANDELING</b>			
Monsters, controles	-	-	100
Pre-behandelingsoplossing	-	-	400
Incubatie	30 minuen terwijl er voortdurend geschud wordt bij 1200 rpm		
Centrifugatie	10 minuten bij 1500 g		
Supernatant	-	-	100
Neutralisatieoplossing	-	-	600
Schudden	Vortex		
<b>INCUBATIE</b>			
Kalibratoren (0 to 5)	-	100	-
Pre-behandelde	-	-	100
Monsters, controles			
Tracer	500	500	500
Incubatie	overnacht bij 2-8°C		
Scheiding	-	opzuigen	
Werk-wasoplossing		3,0 ml	
Scheiding		opzuigen	
Telling	Tel buisjes gedurende 60 seconden		



Vor Gebrauch des Kits lesen Sie bitte diese Packungsbeilage.

## SM-C-RIA-CT

### I. VERWENDUNGSZWECK

Ein Radio-Immunoassay für die quantitative *in vitro* Bestimmung von humanem Somatomedin-C (SM-C) in Serum und Plasma.

### II. ALLGEMEINE INFORMATION

- A. **Handelsbezeichnung :** DIAsource SM-C-RIA-CT Kit
- B. **Katalognummer :** KIP1589 : 96 Tests
- C. **Hergestellt von:** DIAsource ImmunoAssays S.A.  
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgien.

**Für technische Unterstützung oder Bestellungen wenden Sie sich bitte an:**

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

**Für Deutschland : Kostenfreie Rufnummer : 0800 1 00 85 74 - Kostenfreie Faxnummer : 0800 1 00 85 75**

**E-mail Ordering : [ordering@diasource.be](mailto:ordering@diasource.be)**

### III. KLINISCHER HINTERGRUND

- A. **Biologische Aktivität**  
Der Somatomedin-C (SM-C) oder Insulin ähnliche Wachstumsfaktor I (IGF-I) ist ein Polypeptid von 70 Aminosäuren (7650 Dalton) und ähnelt Proinsulin (50%ige Sequenzhomologie) und dem anderen gut charakterisierten Mitglied der Gruppe der Somatomedine: IGF-II (67AA, 70%ige Sequenzhomologie mit IGF-I). SM-C ist der wichtigste Faktor, der die wachstumsfördernden Effekte von Wachstumshormon (GH) beeinflusst, ein Hypophysenhormon mit starken Schwankungen der Konzentration im Blut, da es in Schüben ausgeschüttet wird. Die Konzentration von SM-C im Blut ist durch die Träger-Bindungsproteine stabiler. Die Konzentration des Hauptbindungsproteins (53000 Dalton) sowie die Produktion von SM-C werden durch Wachstumshormon gesteuert. SM-C wird durch die Leber und andere Gewebe produziert, und er hat endokrine, parakrine und autokrine Wirkungen. Er stimuliert das Wachstum und reguliert die Differenzierung verschiedener Gewebe, zeigt Insulin ähnliche Wirkungen und fördert das Wachstum von Knorpel. Obwohl GH der wichtigste Kontrollfaktor für die Sekretion und Konzentration des SM-C ist, gibt es noch andere determinierende Faktoren: Alter (mit einer Spitze in der Adoleszenz), Geschlecht, Nahrungsstatus und andere Hormone (Östrogen, Thyroxin, Prolaktin, usw.). Vor allem spezifische trophische Stimuli regulieren die SM-C Sekretion im lokalen Mikroumfeld eines bestimmten Organs (parakrine Wirkungen), während die SM-C Konzentration im Blut die wichtigste Variable für ein ausgeglichenes systemisches Wachstum ist (endokrine Wirkungen).
- B. **Klinische Anwendungen**
- **Wachstumsretardierung:** Wachstumsretardierung kann mehrere Ursachen haben, unter anderem eine mangelnde Produktion von GH (Hypopituitarismus), die mit niedrigen SM-C Konzentrationen im Blut verbunden ist. Wegen der Schwierigkeit, interpretierbare Resultate aus GH-Messungen (durch dynamische multiple oder Stimulationstests) zu erhalten, wird die Bestimmung der stabilen SM-C Konzentration im Plasma oft als einfacher Screeningtest zur Beurteilung der ‚GH-Imprägation‘ des Patienten betrachtet, bevor zu extensiveren Untersuchungen übergegangen wird. In mehreren klinischen Situationen mit Wachstumsbehinderung können niedrige SM-C Konzentrationen trotz normaler oder hoher GH-Produktion beobachtet werden (z. B. Mangelernährung, chronische Krankheitszustände, manche Fälle genetisch bedingten Minderwuchses wie Pygmäen, usw.). Interessanterweise können Kinder mit diskontinuierlicher neurosekretorischer GH-Dysfunktion bei konventionellen Tests trotz eines normalen GH-Spiegels niedrige SM-C Werte aufweisen. Die Resultate des SM-C Assay müssen unter Berücksichtigung der normalen Schwankungen von SM-C während der Kindheit und Jugend vorsichtig interpretiert werden (siehe Rosenfeld et al).
  - **Akromegalie:** Die SM-C Konzentrationen sind bei Akromegalie (überhöhter GH-Produktion) erhöht und können als Hinweis auf die Schwere der Krankheit dienen. Die Resultate werden leichter interpretiert, weil die Normalwerte bei Erwachsenen einfacher bestimmt werden. SM-C Messungen sind auch zur Kontrolle der Behandlung nützlich.
  - **Forschung:** Der SM-C RIA Kit ist ein unschätzbares Instrument zur Untersuchung der Veränderungen dieses Wachstumsfaktors während physiologischer (z. B. Schwangerschaft) oder pathologischer (z. B. Diabetes) Situationen sowie zur Untersuchung der lokalen Regulierung der SM-C Produktion in Bezug auf die parakrinen und autokrinen Wirkungen dieses Faktors (Wundheilung, Organregeneration, neoplastisches Wachstum, fetale Entwicklung, Steuerung der Gonaden, usw.).

#### IV. GRUNDSÄTZLICHES ZUR DURCHFÜHRUNG

Im vorliegenden Kit hat DIAsource einen Vorbehandlungsschritt eingeführt, um die klinische Leistung des Assay zu steigern. Es wurde bereits nachgewiesen, dass die Bindungsproteine mit dem Radioimmunoassay für SM-C interferieren. Der von DIAsource verwendete Vorbehandlungsschritt ist das Säure-Ethanol-Verfahren von Daughaday et al. (8). Eine festgesetzte Menge an <sup>125</sup>I markiertem SM-C konkurriert mit dem zu messenden, in der Probe oder in dem Kalibrator vorhandenen SM-C um eine Menge an Antikörperbindungsstellen, die an der Wand des Polystyren Röhrchens fixiert sind. Nach Inkubation über Nacht bei 2-8°C, beendet das Absaugen die Verdrängungsreaktion. Die Röhrchen werden anschließend mit Waschlösung gewaschen, danach wird nochmals abgesaugt. Eine Standardkurve wird gedruckt und die SM-C-Konzentrationen der Proben werden über Dosis Interpolation der Kalibrationskurve bestimmt.

#### V. MITGELIEFERTE REAGENZIEN

Reagenz	96 Test Kit	Rekonstitution			
Mit anti SM-C-beschichtete Röhrchen	2 x 48	<b>Gebrauchsfertig</b>			
<table border="1" style="margin-left: 20px;"> <tr> <td>Ag</td> <td><sup>125</sup>I</td> </tr> </table> Tracer : <sup>125</sup> Iod markiertes SM-C (HPLC grade) in Phosphatpuffer mit Rinderserumalbumin und Azid (<0,1%)	Ag	<sup>125</sup> I	1 Gefäß 50 ml 145 kBq	<b>Gebrauchsfertig</b>	
Ag	<sup>125</sup> I				
<table border="1" style="margin-left: 20px;"> <tr> <td>CAL</td> <td>0</td> </tr> </table> Null Kalibrator in Phosphatpuffer mit Ovalbumin und Azid (<0,1%)	CAL	0	1 Gefäß lyophilisiert	3 ml Rekonstitutionslösung <b>zugeben</b>	
CAL	0				
<table border="1" style="margin-left: 20px;"> <tr> <td>CAL</td> <td>N</td> </tr> </table> Kalibratoren SM-C : N = 1 bis 5 (genaue Werte auf Gefäß-Etiketten) in Phosphatpuffer mit Ovalbumin und Azid (<0,1%)	CAL	N	5 Gefäße lyophilisiert	1 ml Rekonstitutionslösung <b>zugeben</b>	
CAL	N				
<table border="1" style="margin-left: 20px;"> <tr> <td>REC</td> <td>SOLN</td> </tr> </table> Rekonstitutionslösung mit Ethanol	REC	SOLN	1 Gefäß 10 ml	<b>Gebrauchsfertig</b>	
REC	SOLN				
<table border="1" style="margin-left: 20px;"> <tr> <td>PRE</td> <td>SOLN</td> </tr> </table> Vorbehandlungslösung mit Ethanol	PRE	SOLN	1 Gefäß 20 ml	<b>Gebrauchsfertig</b>	
PRE	SOLN				
<table border="1" style="margin-left: 20px;"> <tr> <td>NEUTR</td> <td>SOLN</td> </tr> </table> Neutralisierungslösung in Phosphatpuffer mit Rinder-casein und Azid (<0,1%)	NEUTR	SOLN	1 Gefäß 30 ml	<b>Gebrauchsfertig</b>	
NEUTR	SOLN				
<table border="1" style="margin-left: 20px;"> <tr> <td>WASH</td> <td>SOLN</td> <td>CONC</td> </tr> </table> Waschlösung (TRIS-HCl)	WASH	SOLN	CONC	1 Gefäß 10 ml	70x mit dest. Wasser (Magnetprüher verwenden) <b>verdünnen.</b>
WASH	SOLN	CONC			
<table border="1" style="margin-left: 20px;"> <tr> <td>CONTROL</td> <td>N</td> </tr> </table> Kontrollen : N = 1 oder 3 in Humanplasma und Thymol	CONTROL	N	3 Gefäße lyophilisiert	0,5 ml dest. Wasser <b>zugeben</b>	
CONTROL	N				

#### Bemerkung :

- Benutzen Sie den Null Kalibrator zur Probenverdünnung.
- 1 ng der Standardzubereitung ist äquivalent zu 1 ng <sup>125</sup>I IS 91/554.

#### VI. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL

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

- Dest. Wasser
- Pipetten: 100 µl, 400 µl, 500 µl, 600 µl, 1 ml und 3 ml (Verwendung von Präzisionspipetten mit Einwegpipettenspitzen wird empfohlen)
- Kunststoffröhrchen zur Vorbehandlung von Proben
- Vortexmischer
- Magnetprüher
- 5 ml automatische Spritze (Cornwall-Typ) zum Waschen
- Absaugsystem (optional)
- Schüttler für Röhrchen (1200 rpm)
- Zentrifuge (3.000 g)
- Inkubator bei 2 bis 8°C
- Jeder Gamma-Counter, der <sup>125</sup>I messen kann, kann verwendet werden. Maximale Messeffizienz sollte gewährleistet sein.

#### VII. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- Kalibratoren:** Rekonstituieren Sie den Null-Kalibrator mit 3 ml Rekonstitutionslösung und die anderen Kalibratoren mit 1 ml Rekonstitutionslösung.
- Kontrollen :** Rekonstituieren Sie die Kontrollen mit 0,5 ml dest. Wasser.
- Waschlösung:** Zur Vorbereitung eines angemessenen Volumens nutzbarer Waschlösung, mischen Sie zu einem Volumen Waschlösung (70x) 69 Volumen destilliertes Wasser. Benutzen Sie einen Magnetprüher. Entsorgen Sie nach jedem Arbeitstag die überflüssige Waschlösung.

#### VIII. AUFBEWAHRUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Vor dem Öffnen und Rekonstituieren sind alle Kitkomponenten bei 2 bis 8°C bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum haltbar.
- Nach der Rekonstitution sind die Kalibratoren und Kontrollen bei 2°C bis 8°C, 7 Tage stabil. Aliquots müssen bei längerer Aufbewahrung bei -20°C eingefroren werden während max. 3 Monaten. Vermeiden Sie wiederholtes Einfrieren und Auftauen.
- Die Waschlösung sollte frisch hergestellt und am selben Tag aufgebraucht werden.
- Wenn der Tracer nach der ersten Benutzung wieder im gut verschlossenen Originalgefäß bei 2 bis 8°C aufbewahrt wird, ist er bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar.
- Veränderungen im Aussehen der Kitkomponenten können auf Instabilität bzw. Zerfall hindeuten.

#### IX. PROBENSAMMLUNG UND -VORBEREITUNG

- Serum- oder Plasmaproben müssen bei 2-8 °C aufbewahrt werden.
- Falls der Test nicht innerhalb von 48 Std. durchgeführt wird, müssen die Proben bei -20°C aufgehoben werden.
- Vermeiden Sie wiederholtes Einfrieren und Auftauen.
- Serum- oder heparinisertes Plasmaproben liefern ähnliche Ergebnisse  
 $Y(\text{serum}) = 0,95x(\text{hep. plasma}) + 28$        $r = 0,91$        $n = 28$   
 $Y(\text{serum}) = 0,89x(\text{EDTA plasma}) + 32$        $r = 0,88$        $n = 28$
- Nach der Extraktion können die Proben bei 2 bis 8°C 7 Tage lang aufbewahrt werden.

#### X. DURCHFÜHRUNG

##### A. Bemerkungen zur Durchführung

Verwenden Sie den Kit oder dessen Komponenten nicht nach dem Ablaufdatum. Vermischen Sie nie Materialien von unterschiedlichen Kit-Chargen. Bringen Sie alle Reagenzien vor der Verwendung auf Raumtemperatur.

Mischen Sie alle Reagenzien und Proben gründlich durch sanftes Schütteln oder Rühren. Verwenden Sie saubere Einwegpipettenspitzen, um Kreuzkontamination zu vermeiden.

Präzisionspipetten oder ein automatisches Pipettiersystem erhöhen die Präzision. Achten Sie auf die Einhaltung der Inkubationszeiten.

Erstellen Sie für jeden Durchlauf eine Kalibrationskurve, verwenden Sie nicht die Daten von früheren Durchläufen.

Achtung: Die Leistung des Kits wurde auf der Grundlage von doppelt getesteten Proben definiert, daher ist es wichtig, das Kit wie in der Gebrauchsanweisung empfohlen zu verwenden. Aus diesem Grund reicht das im Kit enthaltene Volumen an Vorbehandlungslösung und Neutralisationslösung nur aus, um die Vorbehandlung für eine Doppelbestimmung der Patientenproben durchzuführen

##### B. Vorbehandlungsschritt

- Beschriften Sie je zwei Plastikröhrchen für jede Probe und Kontrolle.
- Geben Sie 100 µl jeder Probe und Kontrolle in das erste Röhrchen.
- Pipettieren Sie 400 µl der Vorbehandlungslösung in dieses Röhrchen.
- Schütteln Sie alle Röhrchen 30 Minuten lang bei 1.200 U/m.
- Zentrifugieren Sie 10 Minuten lang auf 1.500 g.
- Entnehmen Sie 100 µl des Überstands und pipettieren Sie in das zweite beschriftete Röhrchen.
- Pipettieren Sie 600 µl der Neutralisierungslösung in das zweite Röhrchen.
- Mischen Sie jedes Röhrchen mit einem Vortexmischer.

##### C. Variante des Vorbehandlungsverfahrens

Bei Niereninsuffizienz empfehlen wir eine Variante des Extraktionsverfahrens.

- Siehe Vorbehandlungsschritt.
- Lagern Sie den neutralisierten Extrakt 1 Stunde lang bei -20°C, dann sofort 30 Minuten lang bei 4°C auf 3.000 g zentrifugieren.
- Dekantieren Sie den Überstand in frische Röhrchen und führen Sie den Assay wie unten beschrieben durch.

#### D. Durchführung

- Beschriften Sie je 2 beschichtete Röhrchen für jeden Kalibrator, jede Probe und jede Kontrolle. Zur Bestimmung der Gesamtaktivität, beschriften Sie 2 normale Röhrchen.
- Vortexen Sie Kalibratoren, Proben und Kontrollen kurz und geben Sie 100 µl von jedem in ihre Röhrchen.
- Geben Sie 0,5 ml des 125Iod markierten SM-C in jedes Röhrchen, einschließlich der unbeschichteten Röhrchen für die Gesamtaktivität.
- Schütteln Sie vorsichtig die Halterung mit den Röhrchen um Blasen zu entfernen.
- Inkubieren Sie über Nacht bei 2-8°C.
- Saugen Sie den Inhalt jedes Röhrchens ab (außer Gesamtaktivität). Vergewissern Sie sich, dass die Plastikspitze des Absaugers den Boden des beschichteten Röhrchens erreicht, um die gesamte Flüssigkeit zu entfernen.
- Waschen Sie die Röhrchen mit 3 ml Waschlösung (außer Gesamtaktivität) und saugen Sie ab. Vermeiden Sie Schaumbildung bei Zugabe der Waschlösung.
- Lassen Sie die Röhrchen 2 Minuten aufrecht stehen, und saugen Sie den verbleibenden Flüssigkeitstropfen ab.
- Werten Sie die Röhrchen in einem Gamma-Counter über 60 Sekunden aus.

#### XI. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

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

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

- Drucken Sie die (B/B0(%)) Werte für jeden Kalibratorpunkt als Funktion der SM-C-Konzentration für jeden Kalibratorpunkt, schließen Sie offensichtliche „Ausreißer“ aus.
- Computergestützte Methoden können ebenfalls zur Erstellung der Kalibrationskurve verwendet werden. Falls die Ergebnisberechnung mit dem Computer durchgeführt wird, empfehlen wir die Berechnung mit einer „4 Parameter“-Kurvenfunktion.
- Bestimmen Sie die SM-C-Konzentrationen der Proben über Interpolation der Probenwerte B/B0(%) der Referenzkurve.
- Die auf der Kalibrierungskurve abgelesenen Werte müssen mit 35 multipliziert werden (Verdünnungsfaktor).
- Bei jedem Assay muss der Prozentsatz des gesamten gebundenen Tracers ohne unmarkiertes SM-C (B0/T) geprüft werden.

#### XII. TYPISCHE WERTE

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

SM-C	cpm	B/Bo (%)
Gesamtaktivität	41020	
Kalibrator		
0,0 ng/ml	12493	100,0
0,45 ng/ml	11441	91,6
1,6 ng/ml	9590	76,8
5,1 ng/ml	6288	50,3
15,0 ng/ml	3401	27,2
47,0 ng/ml	1486	11,9

#### XIII. LEISTUNGSMERKMALE UND GRENZEN DER METHODIK

##### A. Nachweisgrenze

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

Die Nachweisgrenze, definiert als die scheinbare Konzentration bei zwei Standardabweichungen unterhalb des gemessenen Durchschnittswerts bei Nullbindung, entsprach 0,25 ng/ml (x 35 für eine saubere Probe).

Die Quantifizierungsgrenze (LoQ) wurde berechnet, indem 7 Proben mit niedrigem Wert 10 Mal in verschiedenen Tests getestet wurden. Der LoQ wurde zu 0,85 ng / ml (29,75 ng/ml für saubere Probe) mit einem CV von 20% berechnet.

#### B. Spezifität

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

Substanz	Kreuz-Reaktivität (%)
SM-C (IGF-1)	100
IGF-II	0,3
Insulin	< 0,01
GH	< 0,01
EGF	< 0,01
MSA	< 0,01

**Bemerkung:** Diese Tabelle zeigt die Kreuz-Reaktivität für die anti SM-C

#### C. Präzision

##### INTRA-ASSAY PRÄZISION

##### INTER-ASSAY PRÄZISION

Serum	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)	Serum	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)
A	20	38,8 ± 3,8	9,8	A	20	172 ± 18	10,4
B	20	160,8 ± 15,4	9,6	B	20	621 ± 32	5,2
C	20	664,0 ± 53,5	8,1				

SD : Standardabweichung; CV: Variationskoeffizient

#### D. Genauigkeit

##### VERDÜNNUNGSTEST

Probe	Verdünnung	Theoretische Konz. (ng/ml)	Gemessene Konz. (ng/ml)
Probe A	1/1	-	549
	1/2	275	292
	1/4	137	153
	1/8	69	81
	1/16	34	31
	1/32	17	13
Probe B	1/1	-	449
	1/2	225	237
	1/4	112	128
	1/8	56	64
	1/16	28	30
	1/32	14	7

Die Proben wurden mit Null-Kalibrator verdünnt.

##### WIEDERFINDUNGSTEST

Probe	Zugeg. SM-C (ng/ml)	Wiedergef. SM-C (ng/ml)	Wiedergefunden (%)
C1	155	123	79,4
C2	243	217	89,3
C3	316	271	85,8

Umrechnungsfaktor:

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

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

#### XIV. INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE

- Entsprechen die Ist-Werte nicht den auf den Fläschchen angegebenen Soll-Werten, können die Werte, ohne treffende Erklärung der Abweichungen, nicht weiterverarbeitet werden.
- Falls Extra-Kontrollen erwünscht sind, kann jedes Labor seinen eigenen Pool herstellen, der in Aliquots eingefroren werden sollte.
- Akzeptanzkriterien für die Differenz zwischen den Resultaten der Wiederholungstests anhand der Proben müssen auf Guter Laborpraxis beruhen.

## XV. ZU ERWARTENDER BEREICH

Diese Werte sind nur Richtwerte; jedes Labor muss seinen eigenen Normalwertbereich ermitteln.

### Gesunde Personen

Altersgruppe	MÄNNER (ng/ml)			FRAUEN (ng/ml)		
	Mittelwert	Bereich (*)	N	Mittelwert	Bereich (*)	N
0 - 2 Jahre	136	32 - 339	12	138	45 - 361	8
3 - 5 Jahre	117	47 - 287	10	132	42 - 276	12
6 - 8 Jahre	189	75 - 311	15	170	59 - 297	12
9 - 11 Jahre	233	85 - 553	20	300	188 - 515	10
12 - 14 Jahre	398	139 - 727	18	463	214 - 753	12
15 - 17 Jahre	577	123 - 1016	20	541	210 - 1064	20
18 - 20 Jahre	601	135 - 1276	11	325	70 - 758	9
21 - 30 Jahre	277	170 - 418	11	341	161 - 517	10
31 - 40 Jahre	229	100 - 459	13	254	153 - 489	12
41 - 50 Jahre	305	164 - 627	17	227	138 - 364	16
51 - >51 Jahre	237	87 - 541	38	209	70 - 434	35

(\*) Der beobachtete Bereich war, auf Grundlage der Perzentilen 2,5% bis 97,5%.

## XV. VORSICHTMASSNAHMEN UND WARNUNGEN

### Sicherheit

Nur für diagnostische Zwecke.

Dieser Kit enthält  $^{125}\text{I}$  (Halbwertszeit: 60 Tagen), das ionisierende X (28 keV) und  $\gamma$  (35,5 keV) Strahlungen emittiert.

Dieses radioaktive Produkt kann nur an autorisierte Personen abgegeben und darf nur von diesen angewendet werden; Erwerb, Lagerung, Verwendung und Austausch radioaktiver Produkte sind Gegenstand der Gesetzgebung des Landes des jeweiligen Endverbrauchers. In keinem Fall darf das Produkt an Menschen oder Tieren angewendet werden.

Der Umgang mit radioaktiven Substanzen sollte fern von Durchgangsverkehr in einem speziell ausgewiesenen Bereich stattfinden. Ein Logbuch für Protokolle und Aufbewahrung muss im Labor sein. Die Laborausstattung und die Glasbehälter, die mit radioaktiven Substanzen kontaminiert werden können, müssen ausgesondert werden, um Kreuzkontaminationen mit unterschiedlichen Radioisotopen zu verhindern.

Verschüttete radioaktive Substanzen müssen sofort den Sicherheitsbestimmungen entsprechend entfernt werden. Radioaktive Abfälle müssen entsprechend den lokalen Bestimmungen und Richtlinien der für das Labor zuständigen Behörden gelagert werden. Das Einhalten der Sicherheitsbestimmungen für den Umgang mit radioaktiven Substanzen gewährleistet ausreichenden Schutz.

Die menschlichen Blutkomponenten in diesem Kit wurden mit europäischen und in USA erprobten FDA-Methoden getestet, sie waren negativ für HBsAg, anti-HCV und anti-HIV 1 und 2. Keine bekannte Methode kann jedoch vollkommene Sicherheit liefern, dass menschliche Blutbestandteile nicht Hepatitis, AIDS oder andere Infektionen übertragen. Deshalb sollte der Umgang mit Reagenzien, Serum oder Plasmaproben in Übereinstimmung mit den Sicherheitsbestimmungen erfolgen.

Alle tierischen Produkte und deren Derivate wurden von gesunden Tieren gesammelt. Komponenten von Rindern stammen aus Ländern, in denen BSE nicht nachgewiesen wurde. Trotzdem sollten Komponenten, die tierische Substanzen enthalten, als potentiell ansteckend behandelt werden.

Vermeiden Sie Hautkontakt mit den Reagenzien (Natriumazid als Konservierungsmittel). Das Azid in diesem Kit kann mit Blei oder Kupfer in den Abflusshohrungen reagieren und so hochexplosive Metallazide bilden. Spülen Sie während der Waschstufen den Abfluß gründlich mit viel Wasser, um die Metallazidbildung zu verhindern.

Bitte rauchen, trinken, essen oder wenden Sie Kosmetika nicht in Ihrem Arbeitsbereich an. Pipettieren Sie nicht mit dem Mund. Tragen Sie Schutzkleidung und Wegwerfhandschuhe.

## XVII. LITERATUR

1. DAUGHADAY W.H. and ROTWEIN P. (1989)  
**Insulin-like growth factors I and II. peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum and tissue concentrations.**  
Endocrine Rev., 10(1) : 68-91.
2. FROESCH E.R. and ZAPF J. (1985)  
**Insulin-like growth factors and insulin : comparative aspects.**  
Diabetologia, 28 : 485-493.

3. FURLANETTO R.W., UNDERWOOD L., VAN WYK J.J., D'ERCOLE A.J. (1977)  
**Estimation of somatomedin-C levels in normals and patients with pituitary disease by radioimmunoassay.**  
J. Clin. Invest. 60 : 648.
4. ROSENFELD R.G., WILSON D.M., LEE P.D.K. and HINTZ R.L. (1986)  
**Insulin-like growth factors I and II in evaluation of growth retardation.**  
J. Pediatr., 109 : 428.
5. RUDMAN D., KUTNER M.H. and CHAWLA R.K. (1985)  
**The short child with subnormal plasma somatomedin-C.**  
Pediatric Res., 19(10) : 975-980.
6. ALBERTSSON-WIKLAND K. and HALL K. (1987)  
**Growth hormone treatment in short children : relationship between growth and serum insulin-like growth factor I and II levels.**  
J. Clin. Endocrinol Metab., 65 : 671.
7. WASS J.A.H., CLEMMONS D.R., UNDERWOOD L.E., BARROW L., BESSER G.M. and VAN WYK J.J. (1982)  
**Changes in circulating somatomedin-C levels in bromocriptine treated acromegaly.**  
Clin. Endocrinol., 17 : 369-377.
8. DAUGHADAY W.H., MARIZ I.K. and BLETHEN S.L. (1980)  
**Inhibition of access of bound somatomedin to membrane receptor and immunobinding sites - a comparison of radioreceptor and radioimmunoassay of somatomedin in native and acid-ethanol extracted serum.**  
J. Clin. Endocrinol. Metab., 51 : 781.
9. BREIERB.H., GALLAHER B.W. and GLUCKMAN P.D. (1991)  
**Radioimmunoassay for insulin-like growth factor-I : solutions to some potential problems and pitfalls.**  
Journal of Endocrinology, 128 : 347-357.
10. SCHOUTEN J.S.A.G. and al. (1993)  
**IGF1 : a prognostic factor of knee osteoarthritis.**  
British J. Rheumatol., 32 : 274-280.
11. GRONBAEK H., SKJAERBAEK C., NIELSEN B., FRYSTYK J., FOEGH M.L., FLYVBJERG A., ORSKOV H. (1995)  
**Growth hormone and insulin-like growth factor-I: a suggested role in renal transplantation and graft vessel disease.**  
Transplant. Proceed., 27/3 : 2133-2136.
12. TSITOURAS P.D., ZHONG Y.G., SPUNGEN A.M., BAUMAN W.A. (1995)  
**Serum testosterone and growth hormone insulin-like growth factor-I in adults with spinal cord injury.**  
Hormone and metabolic Research, 27/6 : 287-292.
13. KOCH A., DORR H.G., GERLING S., BEHRENS R., BOHLES H.J. (1995)  
**Effect of growth hormone on IGF-I levels in patients with growth hormone deficiency and Wilson disease.**  
Hormone Research, 44/1 : 40-44.

**XVIII. ZUSAMMENFASSUNG DES PROTOKOLLS**

	<b>GESAMT- AKTIVITÄT (<math>\mu</math>l)</b>	<b>KALIBRA- TOREN (<math>\mu</math>l)</b>	<b>PROBE(N)- KONTROLLEN (<math>\mu</math>l)</b>
<b><u>VORBEHANDLUNG</u></b>			
Proben, Kontrollen	-	-	100
Vorbehandlungslösung	-	-	400
Inkubation Zentrifugation	30 Min. unter ständigem Schütteln (1200 rpm) 10 Minuten auf 1.500 g		
Überstand Neutralisierungslösung	- -	- -	100 600
Schütteln	Vortexen		
<b><i>INKUBATION</i></b>			
Kalibratoren (0 to 5)	-	100	-
Vorbehandelte	-	-	100
Proben, Kontrollen			
Tracer	500	500	500
Inkubation	Über Nacht bei 2-8°C		
Separation	-	absaugen	
Waschlösung	-	3,0 ml	
Separation	-	absaugen	
Auswertung	Messen der Röhrchen 60 Sekunden		



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

## SM-C-RIA-CT

### I. USO DEL KIT

Kit radioimmunologico per la determinazione quantitativa in vitro del Somatomedina-C (SM-C) in siero o plasma.

### II. INFORMAZIONI DI CARATTERE GENERALE

- A. Nome commerciale:** DIASource SM-C -RIA-CT Kit
- B. Numero di catalogo:** KIP1589: 96 tests
- C. Prodotto da:** DIASource ImmunoAssays S.A.  
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgio.

Per informazioni tecniche o su come ordinare il prodotto contattare:

Tel: +32 (0)10 84.99.11

Fax: +32 (0)10 84.99.91

### III. INFORMAZIONI CLINICHE

#### A. Attività biologiche

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

#### B. Applicazioni cliniche

· **Ritardo della crescita:** Il ritardo della crescita può essere dovuto a cause gravi, tra le quali una carente produzione di GH (ipopituitarismo) associata a bassi livelli ematici di SM-C. A causa delle difficoltà di interpretazione dei risultati ottenuti dalla misurazione del GH (tramite test di stimolazione o test multipli dinamici), la determinazione della concentrazione stabile di SM-C nel plasma viene spesso considerata alla stregua di un semplice test di screening volto alla valutazione "dell'impregnazione di GH" del paziente prima di decidere se procedere a indagini più estensive. Nei casi clinici gravi di deficit di crescita, è possibile riscontrare bassi livelli di SM-C anche in presenza di una produzione di GH normale o elevata (ossia malnutrizione, patologie croniche, nanismo genetico come nel caso dei pigmei, ecc.). È interessante notare che bambini con discreta disfunzione neuro-secretoria di GH possono mostrare bassi valori di SM-C anche in presenza di livelli di GH normali riscontrati durante i normali test. È necessario interpretare con molta cautela gli esiti del dosaggio di SM-C tenendo conto delle normali variazioni di SM-C durante l'infanzia e l'adolescenza (vedi Rosenfeld et al).

· **Acromegalia:** Nella acromegalia i livelli di SM-C sono elevati (eccesso di produzione di GH) e possono fungere da indicatore della gravità della malattia. I risultati sono più facili da interpretare in quanto i valori normali sono più facilmente definiti negli adulti. Le misurazioni di SM-C sono, inoltre, utili al monitoraggio del trattamento.


· **Ricerca:** Il kit SM-C RIA è un indispensabile strumento per lo studio delle modifiche del fattore della crescita in presenza di situazioni fisiologiche (gravidanza) o patologiche (diabete) e per lo studio della regolazione locale della produzione di SM-C rispetto alle sue attività paracrine e autocrine (cicatizzazione, rigenerazione di organi, crescita neoplastica, sviluppo fetale, regolazione delle gonadi, ecc.).



#### IV. PRINCIPIO DEL METODO

Nel presente kit, DIASource ha introdotto una fase di pre-trattamento per migliorare le caratteristiche cliniche del dosaggio. È stato ben stabilito che le proteine leganti interferiscono con il kit radioimmunologico per SM-C. La fase di pre-trattamento utilizzata da DIASource è la procedura di Daughaday et al. (8). Una quantità definita di SM-C marcata con <sup>125</sup>I compete con il SM-C presente in calibratore e campioni per un numero definito di siti di un anticorpo adsorbito sulla superficie interna di provette di polistirene. Dopo un'incubazione protrattasi per tutta la notte a 2-8°C, la reazione di competizione viene interrotta per aspirazione della miscela di reazione. Le provette vengono quindi lavate con tampone di lavaggio diluito e aspirate. La concentrazione di SM-C nei campioni viene calcolata per interpolazione sulla curva calibratore.

#### V. REATTIVI FORNITI

Reattivi	Kit da 96 test	Volume di ricostituzione			
 Provette sensibilizzate con anticorpo anti SM-C	2 x 48	Pronte per l'uso			
<table border="1" data-bbox="119 728 255 772"><tr><td>Ag</td><td><sup>125</sup>I</td></tr></table> Marcato: SM-C marcato con <sup>125</sup> I (grado HPLC), in tampone fosfato con caseina bovina e sodio azide (<0,1%)	Ag	<sup>125</sup> I	1 flacone 50 ml 145 kBq	Pronte per l'uso	
Ag	<sup>125</sup> I				
<table border="1" data-bbox="119 896 255 940"><tr><td>CAL</td><td>0</td></tr></table> Calibratore zero in tampone fosfato con ovalbumina e sodio azide (<0,1%)	CAL	0	1 flacone liofilizzati	Aggiungere 3 ml di soluzione di ricostituzione	
CAL	0				
<table border="1" data-bbox="119 1019 255 1064"><tr><td>CAL</td><td>N</td></tr></table> Calibratore 1-5 di SM-C, (le concentrazioni esatte degli calibratore sono riportate sulle etichette dei flaconi), in tampone fosfato con ovalbumina e sodio azide (<0,1%)	CAL	N	5 flaconi liofilizzati	Aggiungere 1 ml di soluzione di ricostituzione	
CAL	N				
<table border="1" data-bbox="71 1220 319 1265"><tr><td>REC</td><td>SOLN</td></tr></table> Soluzione di ricostituzione contenente etanolo	REC	SOLN	1 flacone 10 ml	Pronte per l'uso	
REC	SOLN				
<table border="1" data-bbox="71 1321 319 1366"><tr><td>PRE</td><td>SOLN</td></tr></table> Soluzione di pretrattamento contenente etanolo	PRE	SOLN	1 flacone 20 ml	Pronte per l'uso	
PRE	SOLN				
<table border="1" data-bbox="71 1422 319 1467"><tr><td>NEUTR</td><td>SOLN</td></tr></table> Soluzione di neutralizzazione in tampone fosfato con caseina bovina e sodio azide (<0,1%)	NEUTR	SOLN	1 flacone 30 ml	Pronte per l'uso	
NEUTR	SOLN				
<table border="1" data-bbox="71 1568 367 1624"><tr><td>WASH</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table> Tampone di lavaggio (TRIS-HCl)	WASH	SOLN	CONC	1 flacone 10 ml	Diluire 70 x con acqua distillata usando un agitatore magnetico
WASH	SOLN	CONC			
<table border="1" data-bbox="103 1657 335 1713"><tr><td>CONTROL</td><td>N</td></tr></table> Controlli: N = 1 - 3, in plasma umano e timolo	CONTROL	N	3 flaconi liofilizzati	Aggiungere 0,5 ml di acqua distillata	
CONTROL	N				

**Note :** Usare lo calibratore zero per diluire I campioni  
1 ng della preparazione standard è equivalente a 1 ng di 1<sup>st</sup> IS 91/554.

#### VI. REATTIVI NON FORNITI

Il seguente materiale è richiesto per il dosaggio ma non è fornito nel kit.

1. Acqua distillata.
2. Pipette per dispensare 100 µl, 400 µl, 500 µl, 600 µl, 1 ml e 3 ml (Si raccomanda di utilizzare pipette accurate con puntale in plastica monouso).
3. Provette di plastica per campioni pre-trattamento
4. Agitatore tipo vortex.
5. Agitatore magnetico.

6. Pipetta a ripetizione automatica 5 ml per i lavaggi.
7. Sistema di aspirazione dei campioni (facoltativo).
8. Agitatore rotante
9. Centrifuga (3000 g)
10. Incubatrice a 2-8°C
11. Contatore gamma con finestra per <sup>125</sup>I (efficienza minima 70%)

#### VII. PREPARAZIONE DEI REATTIVI

- A. **Calibratore:** Ricostituire lo calibratore zero con 3 ml di soluzione di ricostituzione e gli altri calibratore con 1 ml di soluzione di ricostituzione.
- B. **Controlli:** Ricostituire i controlli con 0,5 ml di acqua distillata.
- C. **Soluzione di lavoro del tampone di lavaggio:** Preparare la quantità necessaria di soluzione di lavoro del tampone di lavaggio aggiungendo 69 parti di acqua distillata ad una parte di tampone di lavaggio concentrato (70x). Usare un agitatore magnetico per rendere la soluzione omogenea. La soluzione di lavoro va scartata al termine della giornata.

#### VIII. CONSERVAZIONE E SCADENZA DEI REATTIVI

- I reattivi non utilizzati sono stabili a 2-8°C fino alla data riportata su ciascuna etichetta.
- Dopo ricostituzione, calibratore e controlli sono stabili 7 giorni a 2-8°C e suddivisi in aliquote a -20°C per periodi pi? lunghi per 3 mesi. Evitare ripetuti cicli di congelamento-scongelo.
- La soluzione di lavoro del tampone di lavaggio deve essere preparata fresca ogni volta e usata nello stesso giorno della preparazione.
- Dopo apertura del flacone, il marcato è stabile fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta, se conservato a 2-8°C nel flacone originale ben tappato.
- Alterazioni dell'aspetto fisico dei reattivi possono indicare una loro instabilità o deterioramento.

#### IX. RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

- Conservare i campioni di siero o plasma a 2-8°C.
- Se non si desidera eseguire il dosaggio entro 48 ore dal prelievo, si raccomanda di conservare i campioni a -20°C.
- Evitare ripetuti cicli di congelamento-scongelo dei campioni.
- Il siero e il plasma da eparina forniscono gli stessi valori.  

$$Y(\text{siero}) = 0,95x(\text{plasma eparina}) + 28 \quad r = 0,91 \quad n = 28$$

$$Y(\text{siero}) = 0,89x(\text{plasma da EDTA}) + 32 \quad r = 0,88 \quad n = 28$$
- Dopo l'estrazione, conservare i campioni a 2-8°C per 7 giorni.

#### X. METODO DEL DOSAGGIO

- A. **Avvertenze generali**  
Non usare il kit o suoi componenti oltre la data di scadenza. Non mescolare reattivi di lotti diversi. Prima dell'uso portare tutti i reattivi a temperatura ambiente. Mescolare delicatamente i campioni per inversione o rotazione. Per evitare cross-contaminazioni, cambiare il puntale della pipetta ogni volta che si usi un nuovo reattivo o campione. L'uso di pipette ben tarate e ripetibili o di sistemi di pipettamento automatici migliora la precisione del dosaggio. Rispettare i tempi di incubazione. Allestire una curva di taratura per ogni seduta analitica, in quanto non è possibile utilizzare per un dosaggio curve di taratura di sedute analitiche precedenti. Attenzione: le prestazioni del kit sono state definite sulla base di campioni testati in duplicato, è quindi importante utilizzare il kit come raccomandato nelle IFU. Per questo motivo, il volume della soluzione di pretrattamento e della soluzione di neutralizzazione forniti nel kit è sufficiente solo per eseguire il pretrattamento per una determinazione in duplicato dei campioni dei pazienti

#### B. Fase di pre-trattamento

1. Numerare due provette di plastica per ogni campione e controllo.
2. Dispensare 100 µl di ogni campione e controllo nella prima provetta.
3. Aggiungere 400 µl di soluzione di pre-trattamento in questa provetta.
4. Agitare tutte le provette a 1200 gpm durante 30 minuti.
5. Centrifugare per 10 minuti a 1500 g.
6. Prendere 100 µl del supernatante e trasferirli nella seconda provetta numerata.
7. Aggiungere 600 µl di soluzione di neutralizzazione nella seconda provetta.
8. Agitare tutte le provette.

### C. Procedura di pre-trattamento modificata

In caso di insufficienza renale si raccomanda una procedura di estrazione modificata.

- 1-8. Vedere fase di pre-trattamento.
9. Conservare l'estratto neutralizzato a  $-20^{\circ}\text{C}$  per 1 h, quindi centrifugare immediatamente a 3000 g per 30 min a  $4^{\circ}\text{C}$ .
10. Decantare il supernatante in provette pulite e dosarlo in base alla procedura descritta qui di seguito.

### D. Metodo del dosaggio

1. Numerare le provette sensibilizzate necessarie per dosare in duplicato ogni calibratore, campione o controllo. Numerare 2 provette non sensibilizzate per la determinazione dell'attività totale.
2. Agitare brevemente su vortex calibratore, campioni e controlli. Dispensare 100  $\mu\text{l}$  di calibratore, campioni e controlli nelle rispettive provette.
3. Dispensare 500  $\mu\text{l}$  di SM-C marcato con  $^{125}\text{I}$  in tutte le provette, comprese quelle per l'attività totale.
4. Scuotere gentilmente il portaprovette per liberare eventuali bolle d'aria intrappolate nel liquido contenuto nelle provette.
5. Incubare per tutta la notte a  $2-8^{\circ}\text{C}$ .
6. Aspirare il liquido contenuto in tutte le provette, tranne in quelle per l'attività totale, facendo attenzione che il puntale dell'aspiratore raggiunga il fondo delle provette e che aspiri tutto il liquido.
7. Lavare tutte le provette, tranne quelle per l'attività totale, con 3 ml di soluzione di lavoro di tampone di lavaggio, evitando di provocare la formazione di schiuma.
8. Lasciare decantare le provette in posizione verticale per due minuti circa e aspirare eventuali gocce di liquido residue.
9. Contare tutte le provette per 1 minuto con il contatore gamma.

## XI. CALCOLO DEI RISULTATI

1. Calcolare la media delle determinazioni in duplicato.
2. Calcolare il rapporto (rapporto di competizione) tra radioattività legata alle provette di calibratore 1-5, campioni e controlli (B) e la radioattività legata alle provette dello calibratore zero (B0).

$$B/B_0(\%) = \frac{\text{cpm (Calibratore, campioni o controlli)}}{\text{cpm (Zero Calibratore)}} \times 100$$

3. Ponendo in ordinata i rapporti di competizione. B/B0 (%) per ogni calibratore e in ascissa le rispettive concentrazioni di SM-C, tracciare la curva di taratura, scartare i valori palesemente discordanti.
4. È possibile utilizzare un sistema di interpolazione dati automatizzato. Con un sistema automatico di interpolazione dati, utilizzare la curva a 4 parametri.
5. Per interpolazione sulla curva di taratura dei rapporti di competizione di campioni e controlli, determinare le rispettive concentrazioni di SM-C.
6. I valori delle concentrazioni riportati sulla curva di taratura devono essere moltiplicati per 35 (fattore di diluizione).
7. Per ogni dosaggio determinare la capacità legante B0/T.

## XII. CARATTERISTICHE TIPICHE

I sotto riportati sono forniti a titolo di esempio e non devono essere utilizzati per calcolare le concentrazioni di SM-C in campioni e controlli al posto della curva calibratore eseguita contemporaneamente.

SM-C	cpm	B/Bo (%)
Attività totale	41020	
Calibratore		
0,0 ng/ml	12493	100,0
0,45 ng/ml	11441	91,6
1,6 ng/ml	9590	76,8
5,1 ng/ml	6288	50,3
15,0 ng/ml	3401	27,2
47,0 ng/ml	1486	11,9

## XIII. CARATTERISTICHE E LIMITI DEL METODO

### A. Sensibilità

La sensibilità, calcolata come concentrazione apparente di un campione con cpm pari alla media meno 2 deviazioni calibratore di 20 replicati dello calibratore zero, è risultata essere 0,25 ng/ml (x 35 in caso di campione pulito).

Il limite di quantificazione (LoQ) è stato calcolato testando 7 campioni di valore basso 10 volte in test diversi. Il LoQ è stato calcolato in 0,85 ng/ml (29,75 ng/ml per il campione pulito) con CV del 20%.

### B. Specificità

Le percentuali di cross-reattività stimata rispetto alla concentrazione in grado di produrre un'inibizione al 50% sono rispettivamente:

Composto	Cross-Reattività (%)
SM-C (IGF-1)	100
IGF-II	0,3
Insulina	< 0,01
GH	< 0,01
EGF	< 0,01
MSA	< 0,01

Nota : questa tabella mostra la cross-reattività relativa all' anti-SM-C

### C. Precisione

#### INTRA SAGGIO

#### INTER SAGGIO

Siero	N	<X> $\pm$ SD (ng/ml)	CV (%)	Siero	N	<X> $\pm$ SD (ng/ml)	CV (%)
A	20	38,8 $\pm$ 3,8	9,8	A	20	172 $\pm$ 18	10,4
B	20	160,8 $\pm$ 15,4	9,6	B	20	621 $\pm$ 32	5,2
C	20	664,0 $\pm$ 53,5	8,1				

SD : Deviazione Standard; CV: Coefficiente di Variazione

### D. Accuratezza

#### TEST DI DILUZIONE

Campione	Diluizione	Concentrazione teorica (ng/ml)	Concentrazione misurata (ng/ml)
A	1/1	-	549
	1/2	275	292
	1/4	137	153
	1/8	69	81
	1/16	34	31
	1/32	17	13
B	1/1	-	449
	1/2	225	237
	1/4	112	128
	1/8	56	64
	1/16	28	30
	1/32	14	7

I campioni sono stati diluiti con calibratore zero.

#### TEST DI RECUPERO

Campione	SM-C aggiunto (ng/ml)	SM-C recuperato (ng/ml)	Recupero (%)
C1	155	123	79,4
C2	243	217	89,3
C3	316	271	85,8

Fattore di conversione:

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

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

## XIV. CONTROLLO DI QUALITA' INTERNO

- Se i risultati ottenuti dosando il Controllo 1 e il Controllo 2 e il Controllo 3 non sono all'interno dei limiti riportati sull'etichetta dei flaconi, non è opportuno utilizzare i risultati ottenuti per i campioni, a meno che non si trovi una giustificazione soddisfacente.
- Ogni laboratorio può preparare un proprio pool di sieri da utilizzare come controllo, da conservare congelato in aliquote.
- I criteri di accettazione delle differenze tra i risultati in duplicato dei campioni devono basarsi sulla buona prassi di laboratorio.

## XV. INTERVALLI DI RIFERIMENTO

Questi valori sono puramente indicativi, ciascun laboratorio potrà stabilire i propri intervalli normali.

Soggetti normali

Gruppo di età	MASCHI( (ng/ml)			FEMMINE (ng/ml)		
	Media	Intervallo (*)	N	Media	Intervallo (*)	N
0 - 2 anni	136	32 - 339	12	138	45 - 361	8
3 - 5 anni	117	47 - 287	10	132	42 - 276	12
6 - 8 anni	189	75 - 311	15	170	59 - 297	12
9 - 11 anni	233	85 - 553	20	300	188 - 515	10
12 - 14 anni	398	139 - 727	18	463	214 - 753	12
15 - 17 anni	577	123 - 1016	20	541	210 - 1064	20
18 - 20 anni	601	135 - 1276	11	325	70 - 758	9
21 - 30 anni	277	170 - 418	11	341	161 - 517	10
31 - 40 anni	229	100 - 459	13	254	153 - 489	12
41 - 50 anni	305	164 - 627	17	227	138 - 364	16
51 - >51 anni	237	87 - 541	38	209	70 - 434	35

(\*)L'intervallo analizzato e basato su percentili da 2,5% a 97,5%.

## XVI. PRECAUZIONI PER L'USO

### Sicurezza

Il kit è solo per uso diagnostico in vitro.

Il kit contiene <sup>125</sup>I (emivita: 60 giorni) emettente raggi X (28 keV) e  $\gamma$  (35,5 keV) ionizzanti.

L'acquisto, la detenzione, l'utilizzo e il trasporto di materiale radioattivo sono soggetti a regolamentazione locale. In nessun caso il prodotto può essere somministrato ad esseri umani o animali.

Usare sempre guanti e camici da laboratorio quando si manipola materiale radioattivo. Le sostanze radioattive devono essere conservate in propri contenitori in appositi locali che devono essere interdetti alle persone non autorizzate. Deve essere tenuto un registro di carico e scarico del materiale radioattivo. Il materiale di laboratorio e la vetreria deve essere dedicato all'uso di isotopi specifici per evitare cross-contaminazioni.

In caso di contaminazione o dispersione di materiale radioattivo, fare riferimento alle norme locali di radioprotezione. I rifiuti radioattivi devono essere smaltiti secondo le norme locali di radioprotezione. Lo scrupoloso rispetto delle norme per l'uso di sostanze radioattive fornisce una protezione adeguata agli utilizzatori.

I reattivi di origine umana presenti nel kit sono stati dosati con metodi approvati da organismi di controllo europei o da FDA e si sono rivelati negativi per HBs Ag, anti HCV, anti HIV1 e anti HIV2. Non sono disponibili metodi in grado di offrire la certezza assoluta che derivati da sangue umano non possano provocare epatiti, AIDS o trasmettere altre infezioni. Manipolare questi reattivi o i campioni di siero o plasma secondo le procedure di sicurezza vigenti.

Tutti i prodotti di origine animale o loro derivati provengono da animali sani. I componenti di origine bovina provengono da paesi dove non sono stati segnalati casi di BSE. E' comunque necessario considerare i prodotti di origine animale come potenziali fonti di infezioni.

Evitare ogni contatto dell'epidermide con i reattivi contenenti sodio azide come conservante. La sodio azide può reagire con piombo rame o ottone presenti nelle tubature di scarico per formare metallo-azidi esplosive. Smaltire questi reattivi facendo scorrere abbondante acqua negli scarichi.

Nei luoghi dove si usano sostanze radioattive non è consentito consumare cibi o bevande, fumare o usare cosmetici. Non pipettare i reattivi con pipette a bocca.

## XVII. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

1. DAUGHADAY W.H. and ROTWEIN P. (1989)  
**Insulin-like growth factors I and II. peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum and tissue concentrations.**  
Endocrine Rev., 10(1) : 68-91.
2. FROESCH E.R. and ZAPF J. (1985)  
**Insulin-like growth factors and insulin : comparative aspects.**  
Diabetologia, 28 : 485-493.
3. FURLANETTO R.W., UNDERWOOD L., VAN WYK J.J., D'ERCOLE A.J. (1977)  
**Estimation of somatomedin-C levels in normals and patients with pituitary disease by radioimmunoassay.**  
J. Clin. Invest. 60 : 648.
4. ROSENFELD R.G., WILSON D.M., LEE P.D.K. and HINTZ R.L. (1986)  
**Insulin-like growth factors I and II in evaluation of growth retardation.**  
J. Pediatr., 109 : 428.

5. RUDMAN D., KUTNER M.H. and CHAWLA R.K. (1985)  
**The short child with subnormal plasma somatomedin-C.**  
Pediatric Res., 19(10) : 975-980.
6. ALBERTSSON-WIKLAND K. and HALL K. (1987)  
**Growth hormone treatment in short children : relationship between growth and serum insulin-like growth factor I and II levels.**  
J. Clin. Endocrinol Metab., 65 : 671.
7. WASS J.A.H., CLEMMONS D.R., UNDERWOOD L.E., BARROW L., BESSER G.M. and VAN WYK J.J. (1982)  
**Changes in circulating somatomedin-C levels in bromocriptine treated acromegaly.**  
Clin. Endocrinol., 17 : 369-377.
8. DAUGHADAY W.H., MARIZ I.K. and BLETHEN S.L. (1980)  
**Inhibition of access of bound somatomedin to membrane receptor and immunobinding sites - a comparison of radioreceptor and radioimmunoassay of somatomedin in native and acid-ethanol extracted serum.**  
J. Clin. Endocrinol. Metab., 51 : 781.
9. BREIERB.H., GALLAHER B.W. and GLUCKMAN P.D. (1991)  
**Radioimmunoassay for insulin-like growth factor-I : solutions to some potential problems and pitfalls.**  
Journal of Endocrinology, 128 : 347-357.
10. SCHOUTEN J.S.A.G. and al. (1993)  
**IGF1 : a prognostic factor of knee osteoarthritis.**  
British J. Rheumatol., 32 : 274-280.
11. GRONBAEK H., SKJAERBAEK C., NIELSEN B., FRYSTYK J., FOGH M.L., FLYVBJERG A., ORSKOV H. (1995)  
**Growth hormone and insulin-like growth factor-I: a suggested role in renal transplantation and graft vessel disease.**  
Transplant. Proceed., 27/3 : 2133-2136.
12. TSITOURAS P.D., ZHONG Y.G., SPUNGEN A.M., BAUMAN W.A. (1995)  
**Serum testosterone and growth hormone insulin-like growth factor-I in adults with spinal cord injury.**  
Hormone and metabolic Research , 27/6 : 287-292.
13. KOCH A., DORR H.G., GERLING S., BEHRENS R., BOHLES H.J. (1995)  
**Effect of growth hormone on IGF-I levels in patients with growth hormone deficiency and Wilson disease.**  
Hormone Research, 44/1 : 40-44.

**XVIII. SCHEMA DEL DOSAGGIO**

	<b>Attività totale µl</b>	<b>Calibratore µl</b>	<b>Campioni Controlli µl</b>
<b>PRE- TRATTAMENTO</b>			
Campioni, Controlli	-	-	100
Soluzione di pre- trattamento	-	-	400
Incubazione Centrifugation	30 minuti in agitazione (1200 rpm) 10 minuti (1500 g)		
Supernatante	-	-	100
Soluzione di neutralizzazione	-	-	600
Agitazione	Vortex		
<b>INCUBAZIONE</b>			
Calibratore (0 to 5)	-	100	-
Campioni pretrattati, controlli	-	-	100
Marcato	500	500	500
Incubazione	Per tutta la notte a 2-8°C		
Separazione Soluzione di lavoro del tamponi di lavaggio Separazione		Aspirare 3 ml  Aspirare	
Conteggio	Contare le provette per 1 minuto		

Leer el protocolo completo antes de usar.

# SM-C-RIA-CT

## I. INSTRUCCIONES DE USO

Radioinmunoensayo para la determinación cuantitativa in vitro de la Somatomedina-C (SM-C) humana en suero y plasma.

## II. INFORMACIÓN GENERAL

- A. **Nombre:** DIAsource SM-C -RIA-CT Kit
- B. **Número de Catálogo:** KIP1589 : 96 tests
- C. **Fabricado por:** DIAsource ImmunoAssays S.A.  
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

**Para cuestiones técnicas y información sobre pedidos contactar :**  
Tel : +32 (0)10 84.99.11 Fax : +32 (0)10 84.99.91

## III. INFORMACIÓN CLÍNICA

### A. Actividades biológicas

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

### B. Aplicaciones clínicas

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


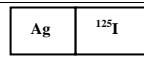
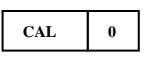
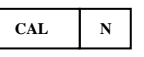
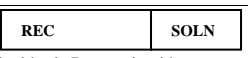
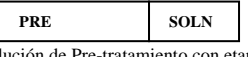
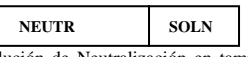
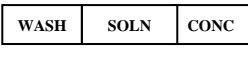

· **Acromegalia:** los niveles de SM-C son elevados en acromegalia (producción excesiva de HGH) y pueden ser un indicador de la gravedad de la enfermedad. Los resultados se interpretan más fácilmente porque los valores normales se definen más fácilmente en adultos. Las mediciones de SM-C también son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

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

#### IV. PRINCIPIOS DEL MÉTODO

En este ensayo, DIAsource ha introducido una fase de pre-tratamiento para mejorar el funcionamiento del ensayo. Es cierto que las proteínas ligadoras influyen en el radioinmunoensayo para SM-C. La fase de pre-tratamiento utilizada por DIAsource es el procedimiento con etanol-ácido de Daughaday et al. (8). Una cantidad fija de SM-C marcada con  $I^{125}$  compete con el SM-C a medir, presente en la muestra ó en el calibrador, por los puntos de unión del anticuerpo inmovilizado en las paredes de un tubo de poliestireno. Después de una noche de incubación a temperatura 2-8°C, una aspiración termina con la reacción de competición. Los tubos se lavan con 3 ml de Solución de lavado y se aspiran otra vez. Se dibuja la curva de calibración y las concentraciones de SM-C de las muestras se determinan por interpolación de la dosis en la curva de calibración.

#### V. REACTIVOS SUMINISTRADOS

Reactivos	Kit 96 test	Reconstitución
 Tubos recubiertos con anti SM-C	2 x 48	Listo para uso
 TRAZADOR:SM-C marcado con $I^{125}$ (grado HPLC) en tampón fosfato con caseína bovina y azida (<0,1%)	1 vial 50 ml 145 kBq	Listo para uso
 Calibrador cero en tampón fosfato con ovalbúmina y azida (<0,1%)	1 vial liofilizado	Añadir 3 ml de Solución de Reconstitución
 Calibradores SM-C - N = 1 al 5 (mirar los valores exactos en las etiquetas) en tampón fosfato con ovalbúmina y azida (<0,1%)	5 viales liofilizados	Añadir 1 ml de Solución de Reconstitución
 Solución de Reconstitución con etanol	1 vial 10 ml	Listo para uso
 Solución de Pre-tratamiento con etanol	1 vial 20 ml	Listo para uso
 Solución de Neutralización en tampón fosfato con caseína bovina y azida (<0,1%)	1 vial 30 ml	Listo para uso
 Solución de lavado ( TRIS-HCl)	1 vial 10 ml	Diluir 70 x con agua destilada (utilizar agitador magnético)
 Controles - N = 1 al 3 en plasma humano y thymol	3 viales liofilizados	Añadir 0,5 ml de agua destilada

Nota: Para diluciones de muestras utilizar Calibrador cero.  
1 ng de la preparación del calibrador es equivalente a 1 ng del 1<sup>st</sup> IS 91/554.

#### VI. MATERIAL NO SUMINISTRADO

- El material mencionado a continuación es necesario y no está incluido en el kit
1. Agua destilada
  2. Pipetas de 100µl, 400 µl, 500µl, 600 µl, 1 ml y 3 ml (Se recomienda el uso de pipetas precisas con puntas desechables de plástico)
  3. Tubos plásticos para el pretratamiento de muestras
  4. Vortex
  5. Agitador magnético
  6. Jeringa automática 5 ml (tipo Cornwall) para el lavado
  7. Sistema de aspiración (opcional)
  8. Agitador de tubos
  9. Centrifugador (3000 g)
  10. Incubador a 2-8°C
  11. Contador de radiaciones gamma para medir  $I^{125}$  ( mínima eficiencia 70%)

#### VII. PREPARACIÓN REACTIVOS

- A. **Calibradores:** Reconstituir el calibrador cero con 3 ml de Solución de Reconstitución y los otros calibradores con 1 ml de solución de Reconstitución.
- B. **Controles:** Reconstituir los controles con 0,5 ml de agua destilada.
- C. **Solución de lavado de trabajo:** Preparar el volumen necesario de Solución de lavado de trabajo mezclando 69 partes de agua destilada por 1 parte de Solución de lavado (70x). Utilizar un agitador magnético para homogeneizar. Desechar la solución de lavado de trabajo no utilizada al final del día.

#### VIII. ALMACENAJE Y CADUCIDADES DE LOS REACTIVOS

- Antes de abrir ó reconstituir todos los componentes de los kits son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta, si se guardan a 2-8°C.
- Después de su reconstitución los calibradores y controles son estables durante 7 días a 2-8°C. Para periodos más largos, alícuotar y guardar a -20°C durante 3 meses. Evitar congelar y descongelar sucesivamente.
- La solución de lavado de trabajo recién preparada solo debe utilizarse en el mismo día.
- Después del primer uso, el trazador es estable hasta la fecha de caducidad, si se guarda en el vial original cerrado a 2-8°C.
- Las alteraciones de los reactivos en el aspecto físico pueden indicar inestabilidad ó deterioro.

#### IX. RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

- Las muestras de suero ó plasma deben ser guardadas a 2-8°C.
- Si el ensayo no se realiza en 48 hrs., almacenar las muestras a -20°.
- Evitar congelar y descongelar sucesivamente.
- Suero o plasma en heparina presentan resultados similares.  
 $Y(\text{suero}) = 0,95x(\text{hep. plasma}) + 28$   $r = 0,91$   $n = 28$   
 $Y(\text{suero}) = 0,89x(\text{EDTA plasma}) + 32$   $r = 0,88$   $n = 28$
- Después de la extracción, las muestras pueden ser guardadas a 2-8°C durante 7 días.

#### X. PROTOCOLO

##### A. Notas de manejo

No utilizar el kit ó componentes después de la fecha de caducidad. No mezclar reactivos de diferente número de lote. Llevar todos los reactivos a temperatura ambiente antes de su uso.  
 Agitar minuciosamente todos los reactivos y muestras, agitándolos o girándolos suavemente. Con el fin de evitar ninguna contaminación utilizar puntas de pipetas desechables y limpias para la adición de cada reactivo y muestra.  
 El uso de pipetas de precisión ó equipamiento de dispensación automática mejorara la precisión. Respetar los tiempos de incubación.  
 Preparar la curva de calibración en cada ensayo, no utilizar los datos de un ensayo previo.  
 Atención: El rendimiento del kit se definió en base a muestras analizadas por duplicado, por lo que es importante utilizar el kit como se recomienda en las IFU. Por este motivo, el volumen de solución de pretratamiento y solución de neutralización proporcionado en el kit solo es suficiente para realizar el pretratamiento para una determinación por duplicado de las muestras de pacientes.

##### B. Fase de pre-tratamiento

1. Marcar dos tubos de plástico para cada muestra y control.
2. Dispensar 100 µl de cada muestra y control en el primer tubo.
3. Añadir 400 µl de la Solución de Pre-tratamiento en este tubo.
4. Agitar cada tubo a 1200 rpm durante 30 minutos.
5. Centrifugar durante 10 minutos a 1500 g.
6. Tomar 100 µl del sobrenadante y transferir al segundo tubo marcado.
7. Añadir 600 µl de la Solución de Neutralización en el segundo tubo.
8. Mezclar cada tubo (vortex).

##### C. Procedimiento de pre-tratamiento modificado

- En caso de fallo renal recomendamos un procedimiento de extracción modificado.
- 1-8. Ver fase de pre-tratamiento.
  9. Guardar los extractos neutralizados a -20°C durante 1 h, después centrifugar inmediatamente a 3000 g durante 30 min a 4°C.
  10. Decantar el sobrenadante en nuevos tubos y ensayar como se describe a continuación

#### D. Protocolo

1. Marcar los tubos recubiertos por duplicado para cada uno de los estándares, muestras y controles. Para la determinación de las Cuentas Totales, marcar 2 tubos normales.
2. Agitar brevemente los calibradores, muestras y controles y dispensar 100 µl de cada uno en sus respectivos tubos.
3. Dispensar 0,5 ml de SM-C marcado con I125 en cada tubo, incluyendo los tubos no recubiertos, destinados a las Cuentas Totales.
4. Agitar suavemente la gradilla de tubos para eliminar cualquier burbuja pegada de las paredes de los tubos.
5. Incubar durante una noche a 2-8°C.
6. Aspirar el contenido de cada tubo (excepto los de Cuentas Totales). Asegurarse que la punta de la pipeta de aspiración toca el fondo del tubo con el fin de aspirar todo el líquido.
7. Lavar los tubos con 3 ml de Solución de lavado de trabajo (excepto los de Cuentas Totales) y aspirar. Evitar la formación de espuma durante la adición de la Solución de lavado
8. Dejar los tubos en posición inversa durante 2 minutos y aspirar el líquido restante.
9. Medir la actividad de cada tubo durante 60 segundos en un Contador Gamma.

#### XI. CALCULO DE RESULTADOS

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

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

3. Representar los valores de (B/B0%) de cada calibrador frente a las concentraciones de la SM-C de cada calibrador, rechazando los extremos claros. Métodos computarizados de resultados pueden ser utilizados para la construcción de la curva de calibración. Si se utiliza un sistema automático de calculo de resultados, se recomienda usar la representación gráfica "4 parámetros".
4. Por interpolación de los valores (B/B%) de las muestras, se determinan los valores de las concentraciones de las mismas desde la curva de calibración.
5. Las concentraciones en la curva de calibración se deben multiplicar por 35 (factor de dilución).
6. El porcentaje total de enlace del trazador en ausencia de SM-C no marcado (B0/T) debe ser calculado en cada ensayo.

#### XII. EJEMPLO DE RESULTADOS

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

SM-C	cpm	B/Bo (%)
Cuentas Totales	41020	
Calibrador		
0,0 ng/ml	12493	100,0
0,45 ng/ml	11441	91,6
1,6 ng/ml	9590	76,8
5,1 ng/ml	6288	50,3
15,0 ng/ml	3401	27,2
47,0 ng/ml	1486	11,9

#### XIII. REALIZACIÓN Y LIMITACIONES

##### A. Limite de detección

Veinte calibradores cero fueron medidos en una curva con otros calibradores.

El limite de detección, definido como la concentración aparente resultante de dos desviaciones estándares debajo de la media de enlace del calibrador cero, fue de 0,25 ng/ml (x 35 para muestras puras).

El límite de cuantificación (LoQ) se calculó mediante la prueba de 7 muestras de bajo valor 10 veces en diferentes pruebas. El LoQ se calculó en 0.85 ng/ml (29.75 ng/ml para muestras limpias) con un CV del 20%.

#### B. Especificidad

El porcentaje de reacción cruzada estimada por la comparación de la concentración (indicando una inhibición de 50 %) es respectivamente:

Componente	Reacción-cruzada (%)
SM-C (IGF-1)	100
IGF-II	0,3
Insulina	< 0,01
GH	< 0,01
EGF	< 0,01
MSA	< 0,01

Nota: esta tabla presenta la reacción cruzada para el anti SM-C

#### C. Precisión

##### PRECISION INTRA-ENSAYO

##### PRECISION INTER-ENSAYO

Suero	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)	Suero	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)
A	20	38,8 ± 3,8	9,8	A	20	172 ± 18	10,4
B	20	160,8 ± 15,4	9,6	B	20	621 ± 32	5,2
C	20	664,0 ± 53,5	8,1				

SD : Desviación Estándar; CV: Coeficiente de Variación

#### D. Exactitud

##### TEST DILUCIÓN

Muestra	Dilución	Concent. Teórica (ng/ml)	Concent. Medida (ng/ml)
A	1/1	-	549
	1/2	275	292
	1/4	137	153
	1/8	69	81
	1/16	34	31
	1/32	17	13
B	1/1	-	449
	1/2	225	237
	1/4	112	128
	1/8	56	64
	1/16	28	30
	1/32	14	7

Las muestras fueron diluidas con el calibrador cero.

##### TEST DE RECUPERACIÓN

Muestra	SM-C añadido (ng/ml)	SM-C Recuperado (ng/ml)	Recuperado (%)
C1	155	123	79,4
C2	243	217	89,3
C3	316	271	85,8

Factor de conversión:

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

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

#### XIV. CONTROL DE CALIDAD INTERNO

- Si los resultados obtenidos para el Control 1 y/6 Control 2 y/6 Control 3 no están dentro del rango especificado en la etiqueta del vial, los resultados obtenidos no podrán ser utilizados a no ser que se pueda dar una explicación convincente de dicha discrepancia
- Si es conveniente, - cada laboratorio puede utilizar sus propios pools de controles, los cuales se guardan en alícuotas congeladas.
- Los criterios de aceptación de la diferencia entre los duplicados de las muestras se apoyan en las prácticas de laboratorio corrientes.

## XV. INTERVALOS DE REFERENCIA

Estos valores solamente sirven de pauta; cada laboratorio tiene que establecer sus propios valores normales.

### Sujetos normales

Edad	HOMBRES (ng/ml)			MUJERES (ng/ml)		
	Medio	Alcance (*)	N	Medio	Alcance (*)	N
0 - 2 años	136	32 - 339	12	138	45 - 361	8
3 - 5 años	117	47 - 287	10	132	42 - 276	12
6 - 8 años	189	75 - 311	15	170	59 - 297	12
9 - 11 años	233	85 - 553	20	300	188 - 515	10
12 - 14 años	398	139 - 727	18	463	214 - 753	12
15 - 17 años	577	123 - 1016	20	541	210 - 1064	20
18 - 20 años	601	135 - 1276	11	325	70 - 758	9
21 - 30 años	277	170 - 418	11	341	161 - 517	10
31 - 40 años	229	100 - 459	13	254	153 - 489	12
41 - 50 años	305	164 - 627	17	227	138 - 364	16
51 - >51 años	237	87 - 541	38	209	70 - 434	35

(\*) El alcance, basado en percentilos de 2,5% a 97,5%..

## XVI. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

### Seguridad

Para uso solo en diagnóstico in vitro.

Este kit contiene  $I^{125}$  (vida media : 60 días) emisor de rayos X (28 keV) y de rayos  $\gamma$  (35.5 keV) ionizantes.

Este producto radiactivo solo puede ser manejado y utilizado por personas autorizadas; la compra, almacenaje, uso y cambio de productos radiactivos están sujetos a la legislación del país del usuario. En ningún caso el producto deberá ser suministrado a humanos y animales.

Todo el manejo de producto radiactivo se hará en una área señalizada, diferente de la de paso regular. Deberá de utilizarse un libro de registros de productos radiactivos utilizados. El material de laboratorio, vidrio que podría estar contaminado radiactivamente deberá de descontaminarse para evitar la contaminación con otros isótopos.

Cualquier derramamiento radiactivo deberá ser limpiado de inmediato de acuerdo con los procedimientos de seguridad. Los desperdicios radiactivos deberán ser almacenados de acuerdo con las regulaciones y normativas vigentes de la legislación a la cual pertenezca el laboratorio. El ajustarse a las normas básicas de seguridad radiológica facilita una protección adecuada.

Los componentes de sangre humana utilizados en este kit han sido testados por métodos aprobados por la CEE y/o la FDA dando negativo a HBsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 y 2. No se conoce ningún método que asegure que los derivados de la sangre humana no transmitan hepatitis, SIDA ó otras infecciones. Por lo tanto el manejo de los reactivos y muestras se hará de acuerdo con los procedimientos de seguridad locales.

Todos los productos animales y derivados han sido obtenidos a partir de animales sanos. Componentes bovinos originales de países donde BSE no ha sido informado. Sin embargo, los componentes conteniendo substancias animales deberán ser consideradas como potencialmente infecciosas.

Evitar cualquier contacto de los reactivos con la piel (azida sódica como conservante). La azida en este kit puede reaccionar con el plomo y cobre de las cañerías y producir azidas metálicas altamente explosivas. Durante el proceso de lavado, hacer circular mucha cantidad de agua por el sumidero para evitar el almacenamiento de la azida.

No fumar, beber, comer ó utilizar cosméticos en el área de trabajo. No pipetear con la boca. Utilizar ropa de protección y guantes.

## XVII. BIBLIOGRAFIA

1. DAUGHADAY W.H. and ROTWEIN P. (1989)  
**Insulin-like growth factors I and II. peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum and tissue concentrations.**  
Endocrine Rev., 10(1) : 68-91.
2. FROESCH E.R. and ZAPF J. (1985)  
**Insulin-like growth factors and insulin : comparative aspects.**  
Diabetologia, 28 : 485-493.
3. FURLANETTO R.W., UNDERWOOD L., VAN WYK J.J., D'ERCOLE A.J. (1977)  
**Estimation of somatomedin-C levels in normals and patients with pituitary disease by radioimmunoassay.**  
J. Clin. Invest. 60 : 648.

4. ROSENFELD R.G., WILSON D.M., LEE P.D.K. and HINTZ R.L. (1986)  
**Insulin-like growth factors I and II in evaluation of growth retardation.**  
J. Pediatr., 109 : 428.
5. RUDMAN D., KUTNER M.H. and CHAWLA R.K. (1985)  
**The short child with subnormal plasma somatomedin-C.**  
Pediatric Res., 19(10) : 975-980.
6. ALBERTSSON-WIKLAND K. and HALL K. (1987)  
**Growth hormone treatment in short children : relationship between growth and serum insulin-like growth factor I and II levels.**  
J. Clin. Endocrinol Metab., 65 : 671.
7. WASS J.A.H., CLEMMONS D.R., UNDERWOOD L.E., BARROW L., BESSER G.M. and VAN WYK J.J. (1982)  
**Changes in circulating somatomedin-C levels in bromocriptine treated acromegaly.**  
Clin. Endocrinol., 17 : 369-377.
8. DAUGHADAY W.H., MARIZ I.K. and BLETHEN S.L. (1980)  
**Inhibition of access of bound somatomedin to membrane receptor and immunobinding sites - a comparison of radioreceptor and radioimmunoassay of somatomedin in native and acid-ethanol extracted serum.**  
J. Clin. Endocrinol. Metab., 51 : 781.
9. BREIERB.H., GALLAHER B.W. and GLUCKMAN P.D. (1991)  
**Radioimmunoassay for insulin-like growth factor-I : solutions to some potential problems and pitfalls.**  
Journal of Endocrinology, 128 : 347-357.
10. SCHOUTEN J.S.A.G. and al. (1993)  
**IGF1 : a prognostic factor of knee osteoarthritis.**  
British J. Rheumatol., 32 : 274-280.
11. GRONBAEK H., SKJAERBAEK C., NIELSEN B., FRYSTYK J., FOEGH M.L., FLYVBJERG A., ORSKOV H. (1995)  
**Growth hormone and insulin-like growth factor-I: a suggested role in renal transplantation and graft vessel disease.**  
Transplant. Proceed., 27/3 : 2133-2136.
12. TSITOURAS P.D., ZHONG Y.G., SPUNGEN A.M., BAUMAN W.A. (1995)  
**Serum testosterone and growth hormone insulin-like growth factor-I in adults with spinal cord injury.**  
Hormone and metabolic Research , 27/6 : 287-292.
13. KOCH A., DORR H.G., GERLING S., BEHRENS R., BOHLES H.J. (1995)  
**Effect of growth hormone on IDF-I levels in patients with growth hormone deficiency and Wilson disease.**  
Hormone Research, 44/1 : 40-44.



**XVIII. RESUMEN DEL PROTOCOLO**

	<b>CUENTAS TOTALES (<math>\mu</math>l)</b>	<b>CALIBRADORES (<math>\mu</math>l)</b>	<b>MUESTRA(S) CONTROL(S) (<math>\mu</math>l)</b>
<b><u>PRE-TRATAMIENTO</u></b>			
Muestras, controles	-	-	100
Solución de Pre- tratamiento	-	-	400
Incubación Centrifugación	30 minutos con agitación continua a 1200 rpm 10 minutos a 1500 g		
Sobrenadante	-	-	100
Solución de Neutralización	-	-	600
Agitar	Vortex		
<b><i>INCUBACION</i></b>			
Calibradores (0 a 5)	-	100	-
Muestras pre-tratadas, Controles	-	-	100
Trazador	500	500	500
Incubación	Una noche a 2-8°C.		
Separación	-	aspirar	
Solución de lavado de trabajo	-	3,0 ml	
Separación	-	aspirar	
Contaje	Contar los tubos durante 60 segundos		

Przed zastosowaniem należy przeczytać cały protokół.

## SM-C-RIA-CT

### I. PRZEZNACZENIE

Oznaczenie radioimmunologiczne do ilościowego pomiaru in vitro ludzkiego hormonu Somatomedyny-C (SM-C) w ludzkiej surowicy i osoczu.

### II. INFORMACJE OGÓLNE

- A. **Nazwa firmowa:** DIASource SM-C-RIA-CT
- B. **Numer katalogowy:** KIP1589 : 96 oznaczeń
- C. **Wyprodukowano przez:** DIASource ImmunoAssays S.A.  
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgia.

**Dział pomocy technicznej oraz informacje dotyczące zamówień:**

**Tel: +32 (0)10 84.99.11**

**Fax: +32 (0)10 84.99.91**

### III. INFORMACJE KLINICZNE

#### A. Aktywność biologiczna

Somatomedyna C (SM-C), lub insulinopodobny czynnik wzrostu (IGF-I) jest jednołańcuchowym polipeptydem, składającym się z 70 aminokwasów, o masie cząsteczkowej 7649 Da. Substancja jest podobna do proinsuliny (50% homologii sekwencyjnej) i do innej, dobrze poznanej substancji z rodziny somatomedyn: IGF II (67AA, 70 homologii sekwencyjnej z IGF-I). SM-C jest najważniejszym czynnikiem nasilającym działania pro wzrostowe, jako mediator hormonu wzrostu, hormonu przysadkowego o wysoce zmiennych poziomach we krwi, co jest związane z pulsacyjnym uwalnianiem tej substancji. Stężenie SM-C we krwi obwodowej jest bardziej stabilne ze względu na wiązanie z białkami nośnikowymi. Stężenie głównego białka wiążącego (o masie cząsteczkowej 53kDa), podobnie jak wytwarzanie SM-C, jest regulowane przez hormon wzrostu. SM-C jest wytwarzana w wątrobie i innych tkankach i działa endokrynowo, parakrynowo i autokrynowo. Stymuluje wzrost i reguluje różnicowanie różnych tkanek, przejawia aktywność podobną do insuliny i ułatwia wzrost tkanki chrzęstnej. Chociaż GH jest najważniejszym czynnikiem kontrolującym wydzielanie i stężenie SM-C, na poziom tej substancji wpływają również inne czynniki: wiek (szczytowe wartości hormonu w okresie dojrzewania), płeć, stan odżywienia i inne hormony (estrogeny, tyroksyna, prolaktyna,...). W lokalnym mikrośrodowisku określonego narządu, wydzielanie SK-C kontroluje głównie swoją stymulację troficzną (działania parakrynowe), podczas gdy stężenie SM-C we krwi krążącej jest najważniejszą zmienną dla zbilansowanych procesów wzrostu systemowego (działania endokrynowe).

#### B. Zastosowania kliniczne

· **Zahamowanie wzrostu:** Do zahamowania wzrostu może dochodzić w różnych sytuacjach, w tym z powodu niedoboru wytwarzania GH (karłowatość przysadkowa), co związane jest z niskimi poziomami SM-C we krwi. Z uwagi na trudności w uzyskaniu wyników pomiarów GH, które można interpretować (np. w badaniach wielopowtarzalnych lub testach stymulacji), oznaczenie stabilnego stężenia SM-C w osoczu jest często uważane jako prosty test przesiewowy do oceny nieprawidłowych poziomów GH u pacjentów przed rozpoczęciem bardziej intensywnej diagnostyki. W niektórych sytuacjach klinicznych związanych z zahamowaniem wzrostu, niskie poziomy SM-C mogą być obserwowane pomimo prawidłowej lub wysokiej produkcji GH (w niedożywieniu, przewlekłych stanach chorobowych, niektórych karłowatościach wrodzonych takich jak np. u Pigmejów). Ciekawym zjawiskiem jest, że dzieci z niewielką dysfunkcją neurowydzielniczą GH mogą przejawiać niskie poziomy SM-C pomimo prawidłowych poziomów GH, uzyskanych w badaniach konwencjonalnych. Wyniki oznaczenia SM-C muszą być ostrożnie interpretowane, biorąc pod uwagę prawidłowe zmienności poziomów SM-C w okresie dzieciństwa i dojrzewania (Rosenfeld i wsp.).

· **Akromegalia:** Poziomy SM-C mogą być podwyższone w akromegalii (nadmierna produkcja GH) i mogą stanowić wskaźnik stopnia ciężkości choroby. Z uwagi na to, że prawidłowe wartości są łatwiej zdefiniowane u dorosłych, wyniki są interpretowane bardziej czytelnie. Pomiary SM-C są również przydatne w monitorowaniu leczenia.


· **Badania naukowe:** Zestaw SM-C RIA nie jest wartościowym narzędziem w badaniach modyfikacji tego czynnika wzrostu w sytuacjach fizjologicznych (np. ciąża) lub patologicznych (np. cukrzyca), i lokalnej regulacji wytwarzania SM-C w odniesieniu do parakrynowego i autokrynowego działania hormonu (w gojeniu się ran, regeneracji narządów, rozwoju płodowym, regulacji gonadalnej, itp.).

#### IV. ZAGADNIENIA DOTYCZĄCE METODY

Aby poprawić kliniczną charakterystykę wydajnościową, w obecnym zestawie, firma DIAsource wprowadziła etap przygotowawczy. Interferencja białek wiążących z oznaczeniem radioimmunometrycznym SM-C została dobrze udokumentowana. Etap przygotowawczy wykorzystywany w oznaczeniu DIAsource jest procedurą etanolową w środowisku kwaśnym, opisaną przez Daughaday'a i wsp. (8).

W celu pomiaru substancji obecnej w próbce lub w kalibratorze, odpowiednia ilość cząsteczek SM-C oznakowanych <sup>125</sup>I współzawodniczy z SM-C o określonej ilości miejsc na przeciwciałach unieruchomionych na ścianie próbki polistyrenowej. Po całonocnej inkubacji w temperaturze 2-8°C, wykonanie aspiracji przerywa reakcję kompetycyjną. Następnie próbki są płukane przy pomocy 3 ml roztworu płuczącego i aspirowane. Wykreślana jest krzywa kalibracyjna a stężenia SM-C w próbkach są określane na podstawie nałożenia dawki na krzywą kalibracyjną.

#### V. ODCZYNNIKI DOSTARCZONE

Odczynniki	Zestaw 96 oznaczeń	Rekonstytucja			
 Probówki opłaskane anty-SM-C	2 x 48	<b>Gotowe</b> do zastosowania.			
<table border="1" data-bbox="119 786 256 831"> <tr> <td>Ag</td> <td><sup>125</sup>I</td> </tr> </table> ZNACZNIK IZOTOPOWY: SM-C oznakowany jodem <sup>125</sup> (poziom HPLC) w buforze fosforanowym z kazeiną bydlęcą i azydkiem (<0,1%).	Ag	<sup>125</sup> I	1 fiolka 50 ml 145 kBq	<b>Gotowy</b> do zastosowania.	
Ag	<sup>125</sup> I				
<table border="1" data-bbox="119 972 256 1016"> <tr> <td>CAL</td> <td>0</td> </tr> </table> Kalibrator zerowy w buforze fosforanowym z owoalbuminą i azydkiem. (<0,1%)	CAL	0	1 fiolka materiał liofilizowan y	<b>Dodać</b> 3 ml roztworu do rekonstytucji	
CAL	0				
<table border="1" data-bbox="119 1113 256 1158"> <tr> <td>CAL</td> <td>N</td> </tr> </table> Kalibratory - N = od 1 do 5 ( <b>dokładne wartości na etykietach fiolek</b> ) w buforze fosforanowym z owoalbuminą i azydkiem. (<0,1%).	CAL	N	5 fiolek materiał liofilizowan y	<b>Dodać</b> 1 ml roztworu do rekonstytucji	
CAL	N				
<table border="1" data-bbox="49 1254 288 1299"> <tr> <td>REC</td> <td>SOLN</td> </tr> </table> Roztwór do rekonstytucji zawierający etanol	REC	SOLN	1 fiolka 10 ml	<b>Gotowy</b> do zastosowania.	
REC	SOLN				
<table border="1" data-bbox="49 1373 288 1417"> <tr> <td>PRE</td> <td>SOLN</td> </tr> </table> Roztwór przygotowawczy zawierający etanol	PRE	SOLN	1 fiolka 20 ml	<b>Gotowy</b> do zastosowania.	
PRE	SOLN				
<table border="1" data-bbox="49 1514 288 1559"> <tr> <td>NEUTR</td> <td>SOLN</td> </tr> </table> Roztwór neutralizujący zawierający bufor fosforanowy z kazeiną bydlęcą i azydkiem (<0,1%)	NEUTR	SOLN	1 fiolka 30 ml	<b>Gotowy</b> do zastosowania.	
NEUTR	SOLN				
<table border="1" data-bbox="119 1677 314 1722"> <tr> <td>WASH</td> <td>SOLN</td> <td>CONC</td> </tr> </table> Roztwór płuczący (TRIS HCl)	WASH	SOLN	CONC	1 fiolka 10 ml	<b>Rozcieńczyć</b> 70x wodą destylowaną (wykorzystać mieszadło magnetyczne).
WASH	SOLN	CONC			
<table border="1" data-bbox="65 1796 266 1841"> <tr> <td>CONTROL</td> <td>N</td> </tr> </table> Kontrole - N = od 1 do 3 w plazma ludzkiej z tymolem	CONTROL	N	3 fiołki materiał liofilizowan y	<b>Dodać</b> 0,5 ml wody destylowanej	
CONTROL	N				

Uwaga: Do rozcieńczania próbek używać kalibrator zerowy.  
1 ng przygotowanego kalibratora jest równoważny 1 ng z 1<sup>st</sup> IS 91/554.

#### VI. MATERIAŁY WYMAGANE, ALE NIEDOSTARCZONE

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

1. Woda destylowana

2. Pipety do dozowania: 100 µl, 400 µl, 500 µl, 600 µl, 1 ml i 3 ml (zaleca się korzystanie z dokładnych pipet z jednorazowymi końcówkami plastikowymi)
3. Probówki plastikowe lub dodanie do próbek roztworu przygotowawczego
4. Mieszadło wirowe
5. Mieszadło magnetyczne
6. Strzykawka automatyczna o objętości 5 ml (rodzaj Cornwall) do płukania
7. Układ do aspiracji (opcjonalnie)
8. Wytrząsarka próbek (1200 obr/min)
9. Wirówka (3000 g)
10. Inkubator w temperaturze 2 – 8 °C
11. Może być wykorzystywany jakikolwiek licznik gamma odpowiedni do pomiaru <sup>125</sup>I (minimalny uzysk 70%)

#### VII. PRZYGOTOWANIE ODCZYNNIKÓW

- A. Kalibratory:** Rozpuścić kalibrator zerowy za pomocą 3 ml roztworu do rekonstytucji a inne kalibratory za pomocą 1 ml roztworu do rekonstytucji.
- B. Kontrole:** Kontrole należy rekonstruować przy pomocy 0,5 ml wody destylowanej.
- C. Roboczy roztwór płuczący:** Właściwą objętość roboczego roztworu płuczącego należy przygotować dodając 69 objętości wody destylowanej do 1 objętości roztworu płuczącego (70x). Do homogenizacji należy wykorzystać mieszadło magnetyczne. Niewykorzystany roboczy roztwór płuczający należy wylać pod koniec dnia.

#### VIII. PRZECHOWYWANIE I DATA WAŻNOŚCI ODCZYNNIKÓW

- Przed otwarciem lub rekonstytucją wszystkie składniki zestawu zachowują trwałość do daty ważności przedstawionej na etykiecie, jeżeli są przechowywane w temperaturze od 2 do 8°C.
- Po rekonstytucji, kalibratory i kontrole zachowują trwałość przez 1 tydzień, pod warunkiem przechowywania w temperaturze od 2 do 8°C. W razie konieczności przechowywania przez dłuższy okres czasu, należy przygotować niewielkie objętości kontroli, co pozwala przechowywać je w temperaturze -20 °C przez 3 miesiące.
- Unikać powtarzanych cykli zamrażania-odmrażania
- Świeżo przygotowany roboczy roztwór płuczający powinien być wykorzystany w tym samym dniu.
- Po jego pierwszym zastosowaniu, znacznik izotopowy zachowuje trwałość do podanej daty ważności jeżeli jest przechowywany w oryginalnej, dobrze zamkniętej fiołce w temperaturze od 2 do 8°C.
- Zmiany w wyglądzie fizycznym odczynników w zestawie mogą wskazywać na ich niestabilność lub zużycie.

#### IX. POBIERANIE I PRZYGOTOWANIE MATERIAŁU DO BADANIA

- Próbkę surowicy lub osocza muszą być przechowywane w temperaturze 2-8°C.
- Jeżeli oznaczenie nie jest wykonywane w ciągu 48 godzin, zaleca się przechowywanie w temperaturze -20°C.
- Unikać powtarzanych cykli zamrażania-odmrażania.
- Surowica i osocze heparynizowane pozwalają na uzyskanie podobnych wyników.  
Y (surowica) = 0,95x (osocze heparynizowane) + 28     r = 0,91   n = 28  
Y (surowica) = 0,89 x (osocze z EDTA) + 32     r = 0,88   n = 28
- Po ekstrakcji, próbki mogą być przechowywane do 7 dni w temperaturze 2-8°C.

#### X. PROCEDURA

##### A. Uwagi dotyczące obsługi

Nie wolno wykorzystywać składników zestawu po upływie daty ważności.  
Nie wolno mieszać materiałów pochodzących z różnych serii zestawów.  
Przed wykorzystaniem wszystkie odczynniki powinny osiągnąć temperaturę pokojową.  
Wszystkie odczynniki i próbki należy dokładnie wymieszać przez delikatne potrząsanie lub obracanie.  
Aby uniknąć zanieczyszczenia krzyżowego, do dodawania poszczególnych odczynników i próbek należy wykorzystywać czyste końcówki jednorazowe pipet. Pipety wysokiej precyzji lub pipety automatyczne poprawiają precyzję wykonania oznaczenia.  
Przestrzegać czasów inkubacji.  
Przygotować krzywą kalibracyjną dla każdego cyklu pomiarowego, nie wolno wykorzystywać danych z poprzednich oznaczeń. Uwaga: Wydajność zestawu została określona na podstawie próbek przetestowanych w dwóch egzemplarzach, dlatego ważne jest, aby używać zestawu zgodnie z zaleceniami instrukcji obsługi. Z tego powodu objętość roztworu do obróbki wstępnej i roztworu zobojętniającego dostarczona w zestawie jest wystarczająca tylko do przeprowadzenia obróbki wstępnej w celu podwójnego oznaczenia próbek pacjentów

## B. Etap przygotowawczy

1. Dla każdej próbki i kontroli oznaczyć dwie plastikowe próbki.
2. Dozować po 100 µl każdej próbki i kontroli do pierwszej próbki.
3. Do tej próbki dodać 400 µl roztworu przygotowawczego.
4. Wytrząsać wszystkie próbki z prędkością 1200 obr/min przez 30 minut.
5. Wirować przez 10 minut (1500 g).
6. Pobrać 100 µl supernatantu i przenieść do drugiej, oznaczonej próbki.
7. Do drugiej próbki dodać 600 µl roztworu neutralizującego.
8. Wymieszać każdą próbkę na mieszadzie typu vortex.

## C. Zmodyfikowana procedura przygotowawcza

W przypadku niewydolności nerek zaleca się stosowanie zmodyfikowanej procedury przygotowawczej.

- 1-8. Jak w etapie przygotowawczym.
9. Przechowywać przez 1 godzinę zneutralizowany ekstrakt w temperaturze -20°C, następnie od razu odwirować (3000 g) przez 30 minut w temperaturze 4°C.
10. Odlać supernatant do świeżych próbek i oznaczyć go jak opisano poniżej.

## D. Procedura

1. Dla każdego kalibratora, próbki i kontroli należy oznaczyć opłaszczoną próbkę w badaniach podwójnych. W celu określenia całkowitych zliczeń należy oznaczyć 2 standardowe próbki.
2. Szybko wymieszać wirując: kalibratory, próbki i kontrole, i dozować po 100 µl każdej substancji do odpowiednich próbek.
3. Do każdej próbki, w tym do próbek nieopłaszczonych do całkowitego zliczania, dodać po 500 µl SM-C oznakowanego jodem 125.
4. Delikatnie potrząsnąć statywem w celu uwolnienia uwieczonych pęcherzyków powietrza.
5. Inkubować przez jedną dobę w temperaturze 2-8°C.
6. Aspirować (lub odlać) zawartość każdej próbki (z wyjątkiem próbek do całkowitego zliczania). Aby usunąć cały płyn należy upewnić się, że plastikowa końcówka aspiratora osiągnęła dno opłaszczonej próbki.
7. Przepłukać próbki przy pomocy 3 ml roboczego roztworu płuczącego (z wyjątkiem próbek do całkowitego zliczania) i aspirować zawartość (lub odlać ją). W trakcie dodawania roboczego roztworu płuczącego należy unikać wytwarzania piany.
8. Pozostawić próbki w pozycji stojącej do góry na dwie minuty i aspirować pozostałe krople płynu.
9. Zliczać próbki w liczniku gamma przez 60 sekund.

## XI. OBLICZANIE WYNIKÓW

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

$$B/B_0(\%) = \frac{\text{Liczba zliczeń (dla kalibratora lub próbki)}}{\text{Liczba zliczeń (dla kalibratora zerowego)}} \times 100$$

3. Wykreślić wartości (B/B<sub>0</sub>(%)) dla każdego punktu kalibratora jako funkcję stężenia SM-C każdego punktu kalibratora. Odrzucić oczywiste wartości graniczne.
4. Do opracowania krzywej kalibracyjnej mogą być wykorzystane również metody wspomagania komputerowego. Jeżeli ma być zastosowane automatyczne przetwarzanie wyników, zaleca się dopasowanie krzywej logistycznej 4 parametrowej.
5. Nakładając wartości (B/B<sub>0</sub>(%)) próbki należy określić stężenia SM-C w próbkach z krzywej kalibracyjnej.
6. Stężenia odczytane na krzywej kalibracyjnej muszą być pomnożone przez 35 (współczynnik rozcieńczenia w etapie przygotowawczym).
7. Dla każdego oznaczenia należy sprawdzić odsetek całkowitego związanego znacznika izotopowego przy braku nieoznakowanego SM-C (B<sub>0</sub>/T).

## XII. PRZYKŁAD DANYCH TYPOWYCH

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

SM-C	cpm	B/Bo (%)
Zliczanie całkowite	41020	
Kalibrator		
0 ng/ml	12493	100,0
0,45 ng/ml	11441	91,6
1,6 ng/ml	9590	76,8
5,1 ng/ml	6288	50,3
15 ng/ml	3401	27,2
47 ng/ml	1486	11,9

## XIII. DZIAŁANIE I OGRANICZENIA

### A. Granica wykrywania

Dwadzieścia kalibratorów zerowych oznaczano wraz z zestawem innych kalibratorów.

Granica wykrywania, zdefiniowana jako odmienne stężenie dwóch odchyłeń standardowych poniżej przeciętnej wartości zliczania przy wiązaniu zerowym kształtowała się na poziomie 0,25 ng/ml (x 35 dla próbki czystej).

Granice oznaczalności (LoQ) obliczono, testując 7 próbek o niskiej wartości 10 razy w innym teście. Obliczono LoQ na 0,85 ng/ml (29,75 ng/ml dla czystej próbki) z CV 20%.

### B. Swoistość

Odsetek reaktywności krzyżowej, oceniany przez porównanie stężenia prowadzącego do 50% zahamowania, przedstawia się następująco:

Związek	Reaktywność krzyżowa (%)
SM-C (IGF-1)	100
IGF-II	0,3
Insulina	< 0,01
GH	< 0,01
EGF	< 0,01
MSA	< 0,01

Nota: w tej tabeli przedstawiono reaktywność krzyżową dla anti- SM-C.

### C. Precyzja

#### PRECYZJA W SERII

#### PRECYZJA MIĘDZY SERIAMI

Surowica	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)	Surowica	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)
A	20	38,8 ± 3,8	9,8	A	20	172 ± 18	10,4
B	20	160,8 ± 15,4	9,6	B	20	621 ± 32	5,2
C	20	664,0 ± 53,5	8,1				

SD: Odchylenie standardowe; CV: Współczynnik zmienności

### D. Dokładność

#### BADANIE ROZCIĘCZENIA

Próbka	Rozcieńczenie	Stęż. teoretyczne (ng/ml)	Stęż. zmierzone (ng/ml)
Surowica A	1/1	-	549
	1/2	275	292
	1/4	137	153
	1/8	69	81
	1/16	34	31
	1/32	17	13
Surowica B	1/1	-	449
	1/2	225	237
	1/4	112	128
	1/8	56	64
	1/16	28	30
	1/32	14	7

Próbki zostały rozcieńczone przy pomocy kalibrator zerowy.

#### BADANIE ODZYSKU

Próbka	Dodano SM-C (ng/ml)	Odzyskany SM-C (ng/ml)	Odzysk (%)
1	155	123	79,4
2	243	217	89,3
3	316	271	85,8

#### Współczynnik konwersji:

Z ng/ml na nmol/l : x 0,1307

Z nmol/l na ng/ml : x 7,649

#### XIV. WEWNĘTRZNA KONTROLA JAKOŚCI

- Jeżeli wyniki uzyskane dla kontroli 1 i 2 i 3 nie znajdują się w zakresie określonym na etykiecie fiołki, wyniki nie mogą zostać wykorzystane dopóki nie uda się znaleźć właściwego wyjaśnienia tego odchylenia.
- Jeżeli to konieczne, każde laboratorium może wykonać własne próbki zbiorcze w celach kontrolnych, które powinny być zamrożone w małych objętościach.
- Dopuszczalne kryteria dotyczące różnicy pomiędzy wynikami oznaczeń podwójnych próbek powinny być zgodne z zasadami prawidłowej pracy w laboratorium.

#### XV. ZAKRESY REFERENCYJNE

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

Zdrowi osobnicy

Grupa wiekowa	MĘŻCZYŹNI (ng/ml)			KOBIECY (ng/ml)		
	Średnia	Zakres(*)	N	Średnia	Zakres	N
0 - 2 lata	136	32 - 339	12	138	45 - 361	8
3 - 5 lat	117	47 - 287	10	132	42 - 276	12
6 - 8 lat	189	75 - 311	15	170	59 - 297	12
9 - 11 lat	233	85 - 553	20	300	188 - 515	10
12 - 14 lat	398	139 - 727	18	463	214 - 753	12
15 - 17 lat	577	123 - 1016	20	541	210 - 1064	20
18 - 20 lat	601	135 - 1276	11	325	70 - 758	9
21 - 30 lat	277	170 - 418	11	341	161 - 517	10
31 - 40 lat	229	100 - 459	13	254	153 - 489	12
41 - 50 lat	305	164 - 627	17	227	138 - 364	16
51 - >51 lat	237	87 - 541	38	209	70 - 434	35

(\*) Zakres jest oparty na percentylach od 2,5% do 97,5%.

#### XVI. ŚRODKI OSTROŻNOŚCI I OSTRZEŻENIA

##### Bezpieczeństwo

Tylko do diagnostyki *in vitro*.

Zestaw zawiera <sup>125</sup>I (Okres połowicznego rozpadu: 60 dni), emitujący promieniowanie jonizujące X (28 keV) i γ (35,5 keV).

Ten produkt radioaktywny może być transportowany i wykorzystany wyłącznie przez osoby autoryzowane; zakup, przechowywanie, stosowanie i wymiana produktów radioaktywnych podlega regulacjom prawnym kraju użytkownika końcowego. W żadnym wypadku produkt nie może być podawany ludziom lub zwierzętom.

Obsługa materiałów radioaktywnych powinno być przeprowadzana w miejscach do tego przeznaczonych, z dala od miejsc ogólnej użyteczności. W laboratorium musi być przechowywany rejestr przyjęć i przechowywania materiałów radioaktywnych. Wyposażenie laboratorium oraz szkło, które może być skażone substancjami radioaktywnymi powinno być oddzielone w celu uniknięcia krzyżowego zanieczyszczenia różnych radioizotopów.

Wszelkie plamy z substancji radioaktywnych muszą być natychmiast oczyszczone zgodnie z procedurami dotyczącymi bezpieczeństwa radiologicznego. Odpady radioaktywne muszą być usuwane zgodnie z miejscowymi przepisami i ogólnie przyjętymi wytycznymi obowiązującymi w laboratorium. Przestrzeganie podstawowych zasad bezpieczeństwa radiologicznego zapewnia wystarczające zabezpieczenie.

Składniki zawierające ludzką krew, dostarczone w zestawie, zostały przebadane metodami zaaprobowanymi przez instytucje europejskie i/lub FDA. Stwierdzono, że nie zawierają one HbsAg, przeciwciał anty-HCV, anty-HIV-1 i 2. Żadna ze znanych metod nie może dać całkowitej pewności że materiały pochodzenia ludzkiego nie przeniosą czynników zakaźnych wirusowego zapalenia wątroby, AIDS i innych. Dlatego postępowanie z odczynnikami i próbkami surowicy lub osocza powinno być zgodne z miejscowymi procedurami dotyczącymi bezpieczeństwa.

Produkty pochodzenia zwierzęcego były pobierane od zdrowych zwierząt. Składniki bydłace pochodzą z krajów, w których nie odnotowano występowania BSE. Pomimo to, składniki zawierające substancje pochodzenia zwierzęcego powinny być traktowane jako potencjalnie zakaźne.

Unikać kontaktu skóry z odczynnikami (zawierają azydek sodowy jako środek konserwujący). Azydek znajdujący się w zestawie może reagować z miedzią i ołowiem w układzie kanalizacyjnym tworząc związki o właściwościach wybuchowych. W czasie płukania odprowadzany płyn należy płukać dużymi objętościami wody, aby zapobiec kumulacji azydków.

Nie wolno palić, spożywać napojów ani pokarmów, bądź używać kosmetyków w miejscu pracy. Nie pipetować ustami. Zakładać ubranie ochronne i rękawiczki jednorazowe.

#### XVII. BIBLIOGRAFIA

1. DAUGHADAY W.H. and ROTWEIN P. (1989)  
**Insulin-like growth factors I and II. peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum and tissue concentrations.**  
Endocrine Rev., 10(1) : 68-91.
2. FROESCH E.R. and ZAPP J. (1985)  
**Insulin-like growth factors and insulin : comparative aspects.**  
Diabetologia, 28 : 485-493.
3. FURLANETTO R.W., UNDERWOOD L., VAN WYK J.J., D'ERCOLE A.J. (1977)  
**Estimation of somatomedin-C levels in normals and patients with pituitary disease by radioimmunoassay.**  
J. Clin. Invest. 60 : 648.
4. ROSENFELD R.G., WILSON D.M., LEE P.D.K. and HINTZ R.L. (1986)  
**Insulin-like growth factors I and II in evaluation of growth retardation.**  
J. Pediatr., 109 : 428.
5. RUDMAN D., KUTNER M.H. and CHAWLA R.K. (1985)  
**The short child with subnormal plasma somatomedin-C.**  
Pediatric Res., 19(10) : 975-980.
6. ALBERTSSON-WIKLAND K. and HALL K. (1987)  
**Growth hormone treatment in short children : relationship between growth and serum insulin-like growth factor I and II levels.**  
J. Clin. Endocrinol Metab., 65 : 671.
7. WASS J.A.H., CLEMMONS D.R., UNDERWOOD L.E., BARROW L., BESSER G.M. and VAN WYK J.J. (1982)  
**Changes in circulating somatomedin-C levels in bromocriptine treated acromegaly.**  
Clin. Endocrinol., 17 : 369-377.
8. DAUGHADAY W.H., MARIZ I.K. and BLETHEN S.L. (1980)  
**Inhibition of access of bound somatomedin to membrane receptor and immunobinding sites - a comparison of radioreceptor and radioimmunoassay of somatomedin in native and acid-ethanol extracted serum.**  
J. Clin. Endocrinol. Metab., 51 : 781.
9. BREIERB.H., GALLAHER B.W. and GLUCKMAN P.D. (1991)  
**Radioimmunoassay for insulin-like growth factor-I : solutions to some potential problems and pitfalls.**  
Journal of Endocrinology, 128 : 347-357.
10. SCHOUTEN J.S.A.G. and al. (1993)  
**IGF1 : a prognostic factor of knee osteoarthritis.**  
British J. Rheumatol., 32 : 274-280.
11. GRONBAEK H., SKJAERBAEK C., NIELSEN B., FRYSTYK J., FOEGH M.L., FLYVBJERG A., ORSKOV H. (1995)  
**Growth hormone and insulin-like growth factor-I: a suggested role in renal transplantation and graft vessel disease.**  
Transplant. Proceed., 27/3 : 2133-2136.
12. TSITOURAS P.D., ZHONG Y.G., SPUNGEN A.M., BAUMAN W.A. (1995)  
**Serum testosterone and growth hormone insulin-like growth factor-I in adults with spinal cord injury.**  
Hormone and metabolic Research , 27/6 : 287-292.
13. KOCH A., DORR H.G., GERLING S., BEHRENS R., BOHLES H.J. (1995)  
**Effect of growth hormone on IDF-I levels in patients with growth hormone deficiency and Wilson disease.**  
Hormone Research, 44/1 : 40-44.

**XVIII. PODSUMOWANIE PROTOKOŁU**

	<b>CAŁKOWITA LICZBA ZLICZEŃ μl</b>	<b>KALIBRATORY  μl</b>	<b>PRÓBKI KONTROLE  μl</b>
<b><u>PRZYGOTOWANIE</u></b>			
Próbki, kontrole	-	-	100
Roztwór przygotowawczy	-	-	400
Inkubacja Wirowanie	30 minut z ciągłym wytrząsaniem (1200 obr/min) 10 minut przy 1500 g		
Supernatant Roztwór neutralizujący	- -	- -	100 600
Wytrząsanie	Ieszenie przy pomocy mieszadła typu worteks		
<b><u>INKUBACJA</u></b>			
Kalibratory (0 - 5)	-	100	-
Przygotowane próbki, kontrole	-	-	100
Znacznik izotopowy	500	500	500
Inkubacja	Przez jedną dobę w temperaturze 2-8°C		
Rozdzielenie Roboczy roztwór płuczący Rozdzielenie	- - -	Aspiracja (lub odlewanie) 3,0 ml Aspiracja (lub odlewanie)	
Zliczanie	Zliczanie probówek przez 60 sekund		