



DCM186-1
Ed. 01/2015

IGF-1

per analisi di routine

Determinazione immunoenzimatica quantitativa di "Insulin-like Growth Factor 1" (IGF-1) in siero umano

IVD



LOT

Vedere etichetta esterna



$\Sigma = 96$ test

REF DKO186

DESTINAZIONE D'USO

Metodo immunoenzimatico colorimetrico per la determinazione quantitativa della concentrazione di "Insulin-like Growth Factor 1" (IGF-1) in siero umano. Il kit IGF-1 è destinato al solo uso di laboratorio.

1. SIGNIFICATO CLINICO

La proteina "Insulin-like growth factor 1" (IGF-1) o somatomedina-C (SM-C) è un polipeptide di 70 aminoacidi a singola catena (peso: 7649 Da) simile alla proinsulina (50% omologia di sequenza) e all'altro membro della famiglia somatomedina IGF II (di 67 aminoacidi e avente il 70% di omologia di sequenza con IGF-1).

IGF-1 è il fattore più importante come mediatore della crescita, in quanto agisce direttamente sull'ormone della crescita, un ormone ipofisario caratterizzato da livelli ematici altamente fluttuanti. La concentrazione nel sangue di IGF-1, al contrario, è più stabile a causa del legame alle proteine di trasporto; sia la concentrazione della proteina di legame predominante che la produzione di IGF-1 sono regolati dall'ormone della crescita.

IGF-1 è prodotta dal fegato e altri tessuti, ed ha attività endocrina, paracrina e autocrina. IGF-1 stimola la crescita e regola la differenziazione dei vari tessuti, presenta attività insulino-simili e favorisce la crescita della cartilagine. Anche se GH è il fattore più importante che controlla la concentrazione e secrezione di IGF-1, anche altri fattori svolgono un ruolo determinante: l'età (con un picco durante l'adolescenza), il sesso, lo stato nutrizionale, e altri ormoni (estrogeni, tiroxina, prolattina...). Stimoli trofici specifici controllano principalmente la secrezione di IGF-1 nel microambiente locale di un particolare organo (attività paracrina), mentre la concentrazione sanguigna di IGF-1 è la variabile più importante per la crescita sistemica equilibrata (attività endocrina).

Applicazioni cliniche

Ritardo della crescita: un ritardo della crescita può essere dovuto a diverse cause, tra le quali la produzione carente di GH (ipopituitarismo), che è associata a bassi livelli di IGF-1 nel sangue. A causa delle difficoltà nell'ottenere risultati interpretabili da misurazioni di GH, la determinazione della concentrazione di IGF-1 nel plasma è spesso considerato come un semplice test di screening del paziente prima di intraprendere indagini più

approfondite. In diverse situazioni cliniche di ritardo della crescita si possono osservare bassi livelli di IGF-1, nonostante la produzione normale o alta di GH. È interessante notare che i bambini con disfunzione neuro-secretoria di GH possono mostrare bassi livelli di IGF-1, nonostante normali livelli di GH. I risultati del dosaggio di IGF-1 devono essere interpretati con cautela, considerando le normali variazioni di IGF-1 durante l'infanzia e l'adolescenza (vedi Rosenfeld et al).

Acromegalia: i livelli di IGF-1 risultano elevati in casi di acromegalia (eccesso di produzione di GH) e possono servire come indicatore della gravità della malattia. I risultati sono più facilmente interpretati perché i valori normali sono più facilmente definiti negli adulti. La misurazione di IGF-1 è utile anche per monitorare il trattamento.

Ricerca: il dosaggio di IGF-1 è uno strumento prezioso per studiare le modifiche di questo fattore di crescita durante gli stati fisiologici (ad esempio gravidanza) o situazioni patologiche (ad esempio diabete), e la regolazione locale della produzione di IGF-1 in relazione alla sua attività paracrina e autocrina (coinvolta in: guarigione delle ferite, rigenerazione di organi, crescita neoplastica, sviluppo fetale, regolazione delle gonadi, ecc).

2. PRINCIPIO DEL METODO

Il kit Diametra IGF-1 è un dosaggio immunoenzimatico in fase solida. Nella presente kit Diametra ha introdotto una fase di pre-trattamento dei campioni al fine di migliorare la prestazione clinica del dosaggio. È ben noto che le proteine che legano l'IGF-1 interferiscono con il dosaggio. La fase di pre-trattamento utilizzata nel kit è sviluppata in accordo alla procedura riportata in Daughaday et al. (8).

Una quantità fissa di IGF-1 marcato con perossidasi di rafano (HRP) compete con l'IGF-1 non marcato presente nei calibratori, nei controlli e nei campioni per un numero limitato di siti di legame riconosciuti da un anticorpo specifico. Dopo 1 ora di incubazione a temperatura ambiente, la micropiastra viene lavata per arrestare la reazione di competizione. Successivamente viene aggiunta la soluzione di cromogeno (TMB) e la micropiastra viene incubata per 15 minuti. La reazione viene bloccata con l'aggiunta di Stop Solution, dopodiché la micropiastra viene letta alla lunghezza d'onda appropriata.

L'assorbanza misurata è inversamente proporzionale alla concentrazione di IGF-1. La concentrazione di IGF-1 nei campioni viene determinata per interpolazione dalla curva di calibrazione.

3. REATTIVI, MATERIALI E STRUMENTAZIONE

3.1. Reattivi e materiali forniti nel kit

1. Calibrators (6 flaconi, liofilici)

CAL0	REF DCE002/18606-0
CAL1	REF DCE002/18607-0
CAL2	REF DCE002/18608-0
CAL3	REF DCE002/18609-0
CAL4	REF DCE002/18610-0
CAL5	REF DCE002/18611-0

2. Controls (2 flaconi, liofilici)

Control 1	REF DCE045/18603A-0
Control 2	REF DCE045/18603B-0

La concentrazione dei Controlli è lotto-specifica ed è indicata sul Certificato di Analisi

3. Conjugate (1 flacone, 0,2 mL, concentrato 101X) IGF-1 coniugato con Perossidasi di rafano (HRP)

REF DCE002/18602-0

4. Conjugate buffer (1 flacone, 11,5 mL)

Buffer fosfato con conservanti **REF** DCE002/18601-0

5. Coated Microplate (1 micropiastra)

Anticorpi anti IGF-1 adsorbiti sulla micropiastra
REF DCE002/18603-0

6. TMB Substrate (1 flacone, 25 mL)

H₂O₂-TMB (0,26 g/L) (*evitare il contatto con la pelle*)
REF DCE004/18604-0

7. Stop Solution (1 flacone, 12 mL)

Acido cloridrico 1N (*evitare il contatto con la pelle*)
REF DCE005/18605-0

8. 200X Conc. Wash Solution (1 flacone, 10 mL)

Tampone Tris-HCl **REF** DCE067/18667-0

9. Pre-treatment solution (1 flacone, 20 mL)

Buffer solution with ethanol **REF** DCE068/18668-0

10. Reconstitution solution (1 flacone, 10 mL)

Buffer solution with ethanol **REF** DCE066/18666-0

11. Neutralization solution (1 flacone, 30 mL)

Buffer fosfato con sodio azide **REF** DCE069/18669-0

3.2. Reattivi necessari non forniti nel kit

Acqua distillata.

3.3. Materiale e strumentazione ausiliari

Dispensatori automatici.

Lettore per micropiastre (450 nm, 630-650 nm).

Tubi in polipropilene per lo step di neutralizzazione

(opzionali: tubi da microcentrifuga)

Microcentrifuga o Centrifuga

Note

Conservare tutti i reattivi a 2-8°C, al riparo dalla luce.

Aprire la busta del Reattivo 5 (Coated Microplate) solo dopo averla riportata a temperatura ambiente e chiuderla subito dopo il prelievo delle strip da

utilizzare; una volta aperta è stabile fino alla data di scadenza del kit.

4. AVVERTENZE

- Questo test kit è per uso in vitro, da eseguire da parte di personale esperto. Non per uso interno o esterno su esseri Umani o Animali.
- Usare i previsti dispositivi di protezione individuale mentre si lavora con i reagenti forniti.
- Seguire le Buone Pratiche di Laboratorio (GLP) per la manipolazione di prodotti derivati da sangue.
- Tutti i reattivi di origine umana usati nella preparazione dei reagenti sono stati testati e sono risultati negativi per la presenza di anticorpi anti-HIV 1&2, per HbsAg e per anticorpi anti-HCV. Tuttavia nessun test offre la certezza completa dell'assenza di HIV, HBV, HCV o di altri agenti infettivi. Pertanto, i reagenti devono essere maneggiati come materiali potenzialmente infettivi.
- Materiali di origine animale usati per la preparazione di questo kit sono stati ottenuti da animali sani e le proteine bovine sono state ottenute da paesi non affetti da BSE, ma comunque questi materiali dovrebbero essere usati come potenzialmente contagiosi.
- Alcuni reagenti contengono piccole quantità di Sodio Azide (NaN₃) o di Timolo come conservante. Evitare il contatto con la pelle e le mucose.
- La Sodio Azide può essere tossica se ingerita o assorbita attraverso la cute o gli occhi; inoltre, può reagire con le tubature di piombo o rame formando azidi metalliche potenzialmente esplosive. Se si usa un lavandino per eliminare i reagenti, lasciar scorrere grandi quantità di acqua per prevenire la formazione di azidi.
- Il TMB Substrato contiene un irritante, che può essere dannoso se inalato, ingerito o assorbito attraverso la cute. Per prevenire lesioni, evitare l'inalazione, l'ingestione o il contatto con la cute e con gli occhi.
- La Stop Solution è costituita da una soluzione di acido cloridrico diluito. L'acido cloridrico è velenoso e corrosivo e può essere tossico se ingerito. Per prevenire possibili ustioni chimiche, evitare il contatto con la cute e con gli occhi.
- Evitare l'esposizione del reagente TMB/H₂O₂ a luce solare diretta, metalli o ossidanti. Non congelare la soluzione.

5. PRECAUZIONI

- Si prega di attenersi rigorosamente alla sequenza dei passaggi indicata in questo protocollo. I risultati presentati qui sono stati ottenuti usando specifici reagenti elencati in queste Istruzioni per l'Uso.
- Tutti i reattivi devono essere conservati a temperatura controllata di 2-8°C nei loro contenitori originali. Eventuali eccezioni sono chiaramente indicate. I reagenti sono stabili fino alla data di scadenza se conservati e trattati seguendo le istruzioni fornite.

- Prima dell'uso lasciare tutti i componenti dei kit e i campioni a temperatura ambiente (22-28°C) e mescolare accuratamente.
- Non scambiare componenti dei kit di lotti diversi. Devono essere osservate le date di scadenza riportate sulle etichette della scatola e di tutte le fiale. Non utilizzare componenti oltre la data di scadenza.
- Qualora si utilizzi strumentazione automatica, è responsabilità dell'utilizzatore assicurarsi che il kit sia stato opportunamente validato.
- Un lavaggio incompleto o non accurato dei pozzetti può causare una scarsa precisione e/o un'elevato background.
- Per la riproducibilità dei risultati, è importante che il tempo di reazione di ogni pozzetto sia lo stesso. Per evitare il time shifting durante la dispensazione degli reagenti, il tempo di dispensazione dei pozzetti non dovrebbe estendersi oltre i 10 minuti. Se si protrae oltre, si raccomanda di seguire lo stesso ordine di dispensazione. Se si utilizza più di una piastra, si raccomanda di ripetere la curva di calibrazione in ogni piastra.
- L'aggiunta del TMB Substrato dà inizio ad una reazione cinetica, la quale termina con l'aggiunta della Stop Solution. L'aggiunta del TMB Substrato e della Stop Solution deve avvenire nella stessa sequenza per evitare tempi di reazione differenti.
- Osservare le linee guida per l'esecuzione del controllo di qualità nei laboratori clinici testando controlli e/o pool di sieri.
- Osservare la massima precisione nella ricostituzione e dispensazione dei reagenti.
- Non usare campioni microbiologicamente contaminati, altamente lipemici o emolizzati.
- I lettori di micropiastre leggono l'assorbanza verticalmente. Non toccare il fondo dei pozzetti.

6. PROCEDIMENTO

6.1. Preparazione dei Calibratori (C₀...C₅)

Ricostituire i Calibratori con **1,0 mL di Reconstitution solution**.

La concentrazione dei Calibratori è indicata sulle etichette.

Dopo la ricostituzione i Calibratori sono stabili 1 settimana a 2-8°C. Per periodi più lunghi, aliquotare i Calibratori e conservarli a -20°C per al massimo 3 mesi; evitare cicli di congelamento e scongelamento. Il riferimento internazionale per i Calibratori è il NIBSC 1st WHO IS 02/254 (1 ng di calibratore corrisponde ad 1 ng di riferimento internazionale).

6.2. Preparazione dei Controlli

Ricostituire i Controlli con **1,0 mL di acqua deionizzata**.

La concentrazione dei Controlli è indicata sul Certificato di Analisi.

Dopo la ricostituzione i Controlli sono stabili 1 settimana a 2-8°C. Per periodi più lunghi, aliquotare i Controlli e conservarli a -20°C per al massimo 3 mesi; evitare cicli di congelamento e scongelamento.

6.3. Preparazione del Coniugato

Immediatamente prima del dosaggio, diluire il Coniugato concentrato 101X (reagente 3) con il Conjugate buffer (reagente 4); per esempio, diluire 20 µL di 101X Conjugate in 2 mL di Conjugate buffer. Usare un vortex per omogeneizzare bene. Il Coniugato diluito è stabile 4 ore a temperatura ambiente (22-28°C).

Evitare l'esposizione del Coniugato concentrato e diluito alla luce solare diretta.

6.4. Preparazione del Campione

La determinazione di IGF-1 con questo kit deve essere effettuata su siero umano.

Il siero deve essere conservato a 2-8°C; se il dosaggio non viene effettuato lo stesso giorno del prelievo conservare il campione a -20°C. Evitare cicli di congelamento e scongelamento del campione.

Prima dell'uso portare il campione a temperatura ambiente (22-28°C); si raccomanda di vortexare il campione prima dell'uso.

Se si ha la necessità di diluire il campione, utilizzare il Calibratore 0.

6.5. Preparazione della Wash Solution

Prima dell'uso, diluire il contenuto necessario di "200X Conc. Wash Solution" con acqua distillata; per esempio, diluire 1 mL di wash solution concentrata con 199 mL di acqua distillata. Miscelare bene prima dell'uso. La soluzione diluita non utilizzata va scartata alla fine del dosaggio.

Una volta aperta, la "200X Conc. Wash Solution" è stabile a 2-8°C fino alla data di scadenza.

6.6. Procedimento

- **Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (22-28°C).** Al termine del dosaggio riporre immediatamente tutti i reagenti a 2-8°C: evitare lunghi periodi a temperatura ambiente.
- Le strisce di pozzetti non utilizzate devono essere rimesse immediatamente nella busta richiudibile contenente il materiale essiccante e conservate a 2-8°C.
- Per evitare potenziali contaminazioni microbiche e/o chimiche non rimettere i reagenti inutilizzati nei flaconi originali
- Al fine di aumentare l'accuratezza dei risultati del test è necessario operare in doppio, allestendo due pozzetti per ogni punto della curva di calibrazione (C₀-C₅), due per ogni Controllo e due per ogni Campione.

Prima di procedere con il dosaggio sulla micropiastra, è necessario pre-trattare ogni campione e controllo (**non i calibratori**) seguendo una delle due procedure di seguito riportate.

6.6.1. Pre-trattamento con tubo da microcentrifuga

1. Etichettare un tubo da microcentrifuga (per l'estrazione) e un tubo in polipropilene (per la neutralizzazione) per ogni campione e controllo
2. Dispensare 100 µL di ogni campione e controllo nel tubo da microcentrifuga.

3. Aggiungere 400 µL di "Pre-treatment solution" nel tubo
4. Chiudere il tubo, vortexare e incubare 30 minuti a temperatura ambiente (22-28°C)
5. Centrifugare per 2 minuti a 10000 rpm
6. Prelevare 100 µL di surnatante e trasferirlo nel tubo di polipropilene etichettato
7. Aggiungere 600 µL di "Neutralization solution" nel tubo
8. Vortexare il tubo, e utilizzare questo campione in accordo alla procedura del dosaggio.

6.6.2. Pre-trattamento con tubo in polipropilene

Se non si dispone di tubi da microcentrifuga e di una microcentrifuga, procedere come segue.

1. Etichettare due tubi in polipropilene (uno per l'estrazione, l'altro per la neutralizzazione) per ogni campione e controllo
2. Dispensare 100 µL di ogni campione controllo nel tubo per l'estrazione
3. Aggiungere 400 µL di "Pre-treatment solution" nel tubo
4. Chiudere il tubo, vortexare e incubare 30 minuti a temperatura ambiente (22-28°C)
5. Centrifugare per 15 minuti a 3000 rpm
6. Prelevare 100 µL di surnatante e trasferirlo nell'altro tubo di polipropilene etichettato
7. Aggiungere 600 µL di "Neutralization solution" nel tubo
8. Vortexare il tubo, e utilizzare questo campione in accordo alla procedura del dosaggio.

6.6.3. Procedura del dosaggio

Reagente	Calibratore	Campioni e controlli pre-trattati
Calibratore C ₀ -C ₅	50 µL	
Campione/ Controllo pre-trattati		50 µL
Conjugate	100 µL	100 µL
Incubare 1 ora a temperatura ambiente (22-28°C) in agitazione su shaker a 500 rpm. Allontanare la miscela di reazione. Lavare i pozzetti 3 volte con 400 µL di wash solution diluita. Nota importante: ad ogni step di lavaggio, agitare delicatamente la piastra per 5 secondi e successivamente rimuovere l'eccesso di soluzione di lavaggio sbattendo delicatamente la micropiastra invertita su fogli di carta assorbente.		
TMB Substrate	200 µL	200 µL
Incubare 15 minuti al buio a temperatura ambiente (22±28°C) in agitazione su shaker a 500 rpm.		
Stop Solution	100 µL	100 µL
Agitare delicatamente la piastra. Leggere l'assorbanza (E) a 450 nm contro una lunghezza d'onda di riferimento di 630-650 nm entro 5 minuti.		

7. RISULTATI

1. Leggere la piastra a 450 nm contro un filtro di riferimento fissato a 650 nm (o 630 nm).
2. Calcolare la media delle assorbanze in duplicato.
3. Calcolare per ogni calibratore, controllo e campione:

$$B/B_0 (\%) = \frac{OD (\text{Calibratore o Controllo o Campione})}{OD (\text{Calibratore } 0)} \times 100$$

4. Utilizzando una carta millimetrata lineare-lineare o semi-logaritmica, tracciare i valori B/B₀ (%) per ciascun punto di calibrazione in funzione della concentrazione di IGF-1 specifica.
5. Per costruire la curva di calibrazione possono essere utilizzati anche metodi computerizzati. In tal caso si raccomanda di utilizzare una curva del tipo "Four Parameter Logistic".
6. Determinare la concentrazione di IGF-1 nel campione interpolando sulla curva ottenuta il valore B/B₀ (%) del campione.

Fattore di conversione:

$$\text{ng/mL} = \text{nmol/L} \times 0,13$$

$$\text{nmol/L} = \text{ng/mL} \times 7.65$$

8. CONTROLLO QUALITA'

Ogni laboratorio dovrebbe analizzare i campioni per il controllo delle prestazioni dell'analisi. Questi campioni dovrebbero essere trattati come ignoti ed i valori determinati in ogni test effettuato. **Controlli contenenti sodio azide interferiscono con il dosaggio, pertanto evitare l'uso di sodio azide per i controlli interni di laboratorio.**

Occorrerebbe compilare delle tabelle di controllo di qualità per seguire le prestazioni dei reagenti forniti. Si suggerisce di utilizzare metodi statistici adeguati per verificare il trend. Il laboratorio dovrebbe fissare i limiti di accettabilità di prestazioni dell'analisi. Altri parametri che dovrebbero essere controllati includono le intercette di 80, 50 e 20% della curva di calibrazione per valutare la riproducibilità. Inoltre, la capacità di assorbimento massima dovrebbe essere costante con le prove precedenti. La deviazione significativa dalle prestazioni stabilite può indicare il cambiamento non osservato delle condizioni sperimentali o la degradazione dei reagenti del kit. In questo caso si consiglia di utilizzare reagenti freschi per determinare il motivo delle variazioni.

9. VALORI DI RIFERIMENTO

I seguenti valori sono da intendersi come linea guida:

Maschi (ng/mL)			
Età (anni)	n	Mediana	Range*
0 - 5	30	37	14 - 154
6 - 8	20	93	45 - 213
9 - 11	20	147	53 - 453
12 - 15	24	313	103 - 753
16 - 20	30	203	99 - 655
21 - 25	9	167	115 - 304
26 - 39	24	162	87 - 415
40 - 54	35	156	69 - 343
> 55	25	117	33 - 232

Femmine (ng/mL)			
Età (anni)	n	Mediana	Range*
0 - 5	50	57	21 - 262
6 - 8	18	207	89 - 485
9 - 11	19	354	99 - 708
12 - 15	31	274	100 - 744
16 - 20	29	248	73 - 522
21 - 25	9	171	83 - 511
26 - 39	20	165	101 - 267
40 - 54	17	121	60 - 271
> 55	14	109	69 - 189

* I range sono espressi da 2,5% a 97,5% percentile. È importante tenere presente che la determinazione di un range di valori attesi in un dato metodo per una popolazione "normale" è dipendente da molteplici fattori, quali la specificità e sensibilità del metodo in uso, e la popolazione in esame. Perciò ogni laboratorio dovrebbe considerare i range indicati dal Fabbricante come un'indicazione generale e produrre

range di valori attesi propri basati sulla popolazione indigena dove il laboratorio risiede.

10. PARAMETRI CARATTERISTICI

10.1. Precisione

10.1.1. Intra-Assay

La variabilità all'interno dello stesso dosaggio è stata determinata replicando (10x) la misura di due differenti sieri. La variabilità intra-assay è 8,9%.

10.1.2. Inter-Assay

La variabilità tra dosaggi differenti è stata determinata replicando (10x) la misura di due differenti sieri con kit appartenenti a lotti diversi. La variabilità inter-assay è 12,9%.

10.2. Specificità

Le percentuali di cross-reazione per l'anticorpo anti IGF-1 stimate dal confronto con la concentrazione che dà una inibizione del 50% sono rispettivamente:

IGF-1	100%
IGF-2	0.7%
Insulina	ND
GH	ND

10.3. Accuratezza

La prova di recupero condotta su campioni arricchiti con 15-30-100-250-400-600 ng/mL di IGF-1 ha dato un valore medio (\pm SD) di 106,9% \pm 9,5%.

La prova di diluizione è stata condotta fino ad una diluizione di 1:32 effettuata con calibratore 0 dopo l'estrazione del campione; il test di diluizione ha dato un valore medio (\pm SD) di 100,4% \pm 9,0%.

10.4. Limite di deteazione

La concentrazione minima di IGF-1 misurabile che può essere distinta dal Calibratore 0 è 7,8 ng/mL.

11. DISPOSIZIONI PER LO SMALTIMENTO

I reagenti devono essere smaltiti in accordo con le leggi locali.

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.

Ed. 01/2015

DCM186-1

DiaMetra S.r.l. Headquater: Via Calabria 15,
20090 SEGRATE (MI) Italy

Tel. +39-02-2139184

Fax +39-02-2133354

Manufactory: Via Pozzuolo 14,
06038 SPELLO (PG) Italy

Tel. +39-0742-24851

Fax +39-0742-316197

E-mail: info@diametra.com



DCM186-1
Ed. 01/2015

IGF-1

for routine analysis

Quantitative immunoenzymatic determination of human Insulin-like Growth Factor 1 (IGF-1) in human serum

IVD



LOT

See external label

2°C - 8°C



$\Sigma = 96$ tests

REF DKO186

INTENDED USE

Immunoenzymatic colorimetric assay for the quantitative determination of human Insulin-like Growth Factor 1 (IGF-1) concentration in human serum.

IGF-1 kit is intended for laboratory use only.

1. CLINICAL SIGNIFICANCE

Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) or Somatomedin-C (SM-C) is a basic 70 amino acid single chain polypeptide (MW : 7649 Da) similar to proinsulin (50% sequence homology), and to the other well-characterized member of the somatomedin family : IGF II (67AA, 70 % sequence homology with IGF-1). IGF-1 is the most important factor, which mediates the growth promoting actions of growth hormone, a pituitary hormone with highly fluctuating blood levels due to pulsatile release. The blood concentration of IGF-1 is more stable due to the binding to carrier proteins. The concentration of the predominant binding protein (MW 53000) as well as the production of IGF-1, are regulated by growth hormone. IGF-1 is produced by the liver, and other tissues, and it has endocrine, paracrine and autocrine activities. It stimulates growth and regulates differentiation of various tissues, displays insulin-like activities and promotes cartilage growth. Although GH is the most important factor controlling IGF-1 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 IGF-1 secretion in the local microenvironment of a particular organ (paracrine activities), while blood IGF-1 concentration is the most important variable for balanced systemic growth (endocrine activities).

Clinical applications

Growth retardation: Growth retardation may be due to several causes, among which deficient GH production (hypopituitarism), which is associated with low IGF-1 blood levels. Because of the difficulties to get interpretable results from GH measurements (by dynamic multiple or stimulation tests), the determination of the stable IGF-1 concentration in plasma is often considered as a simple screening test to evaluation "GH impregnation" of the patient before

deciding more extensive investigations. In several clinical situations with impaired growth, low IGF-1 levels may be observed despite normal or high GH production (i.e. malnutrition, chronic diseases states, some genetic dwarfs like Pygmies, ...). Interestingly, children with discrete GH neuro-secretory dysfunction may display low IGF-1 values despite normal GH levels by conventional testing. The results of IGF-1 assay must be interpreted cautiously by considering the normal variations of IGF-1 during childhood and adolescence (see Rosenfeld et al).

Acromegaly: IGF-1 levels are elevated in acromegaly (excess production of GH) and may serve as an indicator of disease severity. Results are more readily interpreted because the normal values are more easily defined in adults. IGF-1 measurements are also useful to monitor treatment.

Research: IGF-1 kit is an invaluable tool to study the modifications of this growth factor during physiologic (i.e. pregnancy) or pathologic (i.e. diabetes) situations, and the local regulation of IGF-1 production in relation to its paracrine and autocrine activities (wound healing, organ regeneration, neoplastic growth, foetal development, gonadal regulation, etc).

2. PRINCIPLE OF THE METHOD

Diametra IGF-1 kit is a solid phase immunoenzymatic assay performed on polystyrene microtiterplates.

In the present kit, Diametra 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 assay for IGF-1. The pre-treatment step used by Diametra is the acid-ethanol procedure of Daughaday et al. (8).

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

absorbance, which is inversely proportional to the IGF-1 concentration.

A calibration curve is plotted and IGF-1 concentration in samples is determined by interpolation from the calibration curve.

3. REAGENTS, MATERIALS AND INSTRUMENTATION

3.1. Reagents and materials supplied in the kit

1. Calibrators (6 vials, lyophilized)

CAL0	REF	DCE002/18606-0
CAL1	REF	DCE002/18607-0
CAL2	REF	DCE002/18608-0
CAL3	REF	DCE002/18609-0
CAL4	REF	DCE002/18610-0
CAL5	REF	DCE002/18611-0

2. Controls (2 vials, lyophilized)

Control 1	REF	DCE045/18603A-0
Control 2	REF	DCE045/18603B-0

Controls concentration is lot-specific and is indicated on the Certificate of Analysis

3. Conjugate (1 vial, 0.2 mL, 101X concentrate)

IGF-1 conjugated with Horseradish peroxidase (HRP)

REF DCE002/18602-0

4. Conjugate buffer (1 vial, 11.5 mL)

Phosphate buffer with preservatives

REF DCE002/18601-0

5. Coated Microplate (1 microplate)

Anti IGF-1 antibodies coated on the microplate

REF DCE002/18603-0

6. TMB Substrate (1 vial, 25 mL)

H₂O₂-TMB 0.26 g/L (avoid any skin contact)

REF DCE004/18604-0

7. Stop Solution (1 vial, 12 mL)

Hydrochloric acid 1N (avoid any skin contact)

REF DCE005/18605-0

8. 200X Conc. Wash Solution (1 vial, 10 mL)

Tris HCl buffer

REF DCE067/18667-0

9. Pre-treatment solution (1 vial, 20 mL)

Buffer solution with ethanol

REF DCE068/18668-0

10. Reconstitution solution (1 vial, 10 mL)

Buffer solution with ethanol

REF DCE066/18666-0

11. Neutralization solution (1 vial, 30 mL)

Phosphate buffer with sodium azide

REF DCE069/18669-0

3.2. Reagents necessary not supplied

Distilled water.

3.3. Auxiliary materials and instrumentation

Automatic dispenser.

Microplates reader (450 nm, 630-650 nm)

Polypropylene tubes for neutralization step (optional: microcentrifuge tubes)

Microcentrifuge or Centrifuge

Notes

Store all reagents at 2-8°C in the dark.

Open the bag of reagent 5 (Coated Microplate) only when it is at room temperature and close it immediately after use; once opened, it is stable up to the expiry date of the kit.

4. WARNINGS

- This kit is intended for in vitro use by professional persons only. Not for internal or external use in Humans or Animals.
- Use appropriate personal protective equipment while working with the reagents provided.
- Follow Good Laboratory Practice (GLP) for handling blood products.
- All human source material used in the preparation of the reagents has been tested and found negative for antibody to HIV 1&2, HbsAg, and HCV. No test method however can offer complete assurance that HIV, HBV, HCV or other infectious agents are absent. Therefore, the reagents should be handled in the same manner as potentially infectious material.
- Material of animal origin used in the preparation of the kit has been obtained from animals certified as healthy and the bovine protein has been obtained from countries not infected by BSE, but these materials should be handled as potentially infectious.
- Some reagents contain small amounts of Thymol or Sodium Azide (NaN₃) as preservative. Avoid the contact with skin or mucosa.
- Sodium Azide may be toxic if ingested or absorbed through the skin or eyes; moreover it may react with lead or copper plumbing to form potentially explosive metal azides. If you use a sink to remove the reagents, allow scroll through large amounts of water to prevent azide build-up.
- The TMB Substrate contains an irritant, which may be harmful if inhaled, ingested or absorbed through the skin. To prevent injury, avoid inhalation, ingestion or contact with skin and eyes.
- The Stop Solution consists of a diluted hydrochloric acid solution. Hydrochloric acid is poisonous and corrosive and can be toxic if ingested. To prevent chemical burns, avoid contact with skin and eyes.
- Avoid the exposure of reagent TMB/H₂O₂ to directed sunlight, metals or oxidants. Do not freeze the solution.

5. PRECAUTIONS

- Please adhere strictly to the sequence of pipetting steps provided in this protocol. The performance data represented here were obtained using specific reagents listed in this Instruction For Use.
- All reagents should be stored refrigerated at 2-8°C in their original container. Any exceptions are clearly indicated. The reagents are stable until the expiry date when stored and handled as indicated.
- Allow all kit components and specimens to reach room temperature (22-28°C) and mix well prior to use.

- Do not interchange kit components from different lots. The expiry date printed on box and vials labels must be observed. Do not use any kit component beyond their expiry date.
- If you use automated equipment, the user has the responsibility to make sure that the kit has been appropriately tested.
- The incomplete or inaccurate liquid removal from the wells could influence the assay precision and/or increase the background.
- It is important that the time of reaction in each well is held constant for reproducible results. Pipetting of samples should not extend beyond ten minutes to avoid assay drift. If more than 10 minutes are needed, follow the same order of dispensation. If more than one plate is used, it is recommended to repeat the dose response curve in each plate
- Addition of the TMB Substrate solution initiates a kinetic reaction, which is terminated by the addition of the Stop Solution. Therefore, the TMB Substrate and the Stop Solution should be added in the same sequence to eliminate any time deviation during the reaction.
- Observe the guidelines for performing quality control in medical laboratories by assaying controls and/or pooled sera.
- Maximum precision is required for reconstitution and dispensation of the reagents.
- Samples microbiologically contaminated, highly lipemic or haemolysed should not be used in the assay.
- Plate readers measure vertically. Do not touch the bottom of the wells.

6. PROCEDURE

6.1. Preparation of Calibrators (C₀...C₅)

Reconstitute the Calibrators with **1.0 mL** of **Reconstitution solution**.

Calibrators concentration is indicated on the labels. After reconstitution, the Calibrators are stable 1 week at 2-8°C. For longer period, aliquot the Calibrators and store at -20°C for maximum 3 months; avoid successive freezing and thawing.

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

6.2. Preparation of Controls

Reconstitute the Controls with **1.0 mL** of **distilled water**.

Controls concentration is indicated on the Certificate of Analysis.

After reconstitution, the Controls are stable 1 week at 2-8°C. For longer period, aliquot the Controls and store at -20°C for maximum 3 months; avoid successive freezing and thawing.

6.3. Preparation of Conjugate

Just before the assay, dilute the Conjugate 101X concentrate (reagent 3) with Conjugate buffer (reagent 4); for example, dilute 20 µL of 101X Conjugate in 2 mL of Conjugate buffer. Use a vortex to homogenize. The diluted Conjugate is stable for 4 hours at room temperature (22-28°C).

Avoid exposure of concentrated and diluted Conjugate to direct sunlight.

6.4. Preparation of the Sample

The determination of IGF-1 with this kit must be performed in human serum.

The serum should be stored at 2-8°C or at -20°C if the determination is not performed on the same day of the sample collection. Avoid repetitive freezing and thawing of samples.

Prior to use all samples should be at room temperature (22-28°C); it is recommended to vortex the samples before using.

If you need to dilute the samples, use the Calibrator 0.

6.5. Preparation of Wash Solution

Before assaying, dilute the amount needed of the "200X Conc. Wash Solution" with distilled water; for example, dilute 1 mL of concentrated wash solution with 199 mL of distilled water. Mix well before using. Discard unused diluted wash solution at the end of the day.

Once opened, the "200X Conc. Wash Solution" is stable at 2-8°C until the expiry date.

6.6. Procedure

- **Allow all reagents to reach room temperature (22-28°C).** At the end of the assay, store immediately the reagents at 2-8°C: avoid long exposure to room temperature.
- Unused coated microwell strips should be released securely in the foil pouch containing desiccant and stored at 2-8°C.
- To avoid potential microbial and/or chemical contamination, unused reagents should never be transferred into the original vials.
- As it is necessary to perform the determination in duplicate in order to improve accuracy of the test results, prepare two wells for each point of the calibration curve (C₀-C₅), two for each Control and two for each sample.

Before assaying into the microplate, you need to pre-treat each sample and control (**not the calibrators**) according to one of the following procedures.

6.6.1. Pre-treatment step with a microcentrifuge tube

1. Label one microcentrifuge tube (for extraction) and one polypropylene tube (for neutralization) for each sample and control.
2. Dispense 100 µL of each sample and control into the microfuge tube.
3. Add 400 µL of "Pre-treatment solution" into the tube.
4. Close the tube, vortex and incubate 30 minutes at room temperature (22-28°C).
5. Centrifuge for 2 minutes at 10000 rpm.
6. Take 100 µL of the supernatant and transfer it into the polypropylene labelled tube.
7. Add 600 µL of the "Neutralization solution" to the tube.

- Vortex the tube to mix, and assay the sample according to the assay procedure.

6.6.2. Pre-treatment step with a polypropylene tube

If you don't have a microcentrifuge tube and a microcentrifuge, you can proceed as follow.

- Label two polypropylene tubes (one for extraction, the other one for neutralization) for each sample and control.
- Dispense 100 µL of each sample and control into the extraction tube.
- Add 400 µL of "Pre-treatment solution" into the tube.
- Close the tube, vortex and incubate 30 minutes at room temperature (22-28°C).
- Centrifuge for 15 minutes at 3000 rpm.
- Take 100 µL of the supernatant and transfer it into the other polypropylene labelled tube.
- Add 600 µL of the "Neutralization solution" to the tube.
- Vortex the tube to mix, and assay the sample according to the assay procedure.

6.6.3. Assay procedure

Reagent	Calibrator	Pre-treated Sample/ Control
Calibrator C ₀ -C ₅	50 µL	
Pre-treated Sample/ Control		50 µL
Conjugate	100 µL	100 µL
Incubate 1 hour at room temperature (22-28°C) on a shaker at 500 rpm. Remove the contents from each well. Wash the wells 3 times with 400 µL of diluted wash solution. Important note: during each washing step, gently shake the plate for 5 seconds and remove excess solution by tapping the inverted plate on an absorbent paper towel.		
TMB Substrate	200 µL	200 µL
Incubate 15 minutes in the dark at room temperature (22÷28°C) on a shaker at 500 rpm.		
Stop Solution	100 µL	100 µL
Shake the microplate gently. Read the absorbance (E) at 450 nm against a reference wavelength of 630-650 nm within 5 minutes.		

7. RESULTS

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

$$B/B_0 (\%) = \frac{OD (\text{Calibrator or Control or Sample})}{OD (\text{Calibrator } 0)} \times 100$$

- Using either linear-linear or semi-logarithmic graph paper, plot the B/B₀ (%) values for each calibrator point as a function of the IGF-1 concentration of each calibrator point. Reject obvious outliers.
- Computer assisted methods can also be used to construct the calibration curve. If automatic result processing is used, a 4-parameter logistic function curve fitting is recommended.
- By interpolation of the sample B/B₀ (%) values, determine the IGF-1 concentrations of the samples from the calibration curve

Conversion factor:

$$\text{ng/mL} = \text{nmol/L} \times 0.13$$

$$\text{nmol/L} = \text{ng/mL} \times 7.65$$

8. QUALITY CONTROL

Each laboratory should assay controls for monitoring assay performance. These controls should be treated as unknowns and values determined in every test procedure performed. **Controls containing sodium azide interfere with the assay, thus use of sodium azide must be avoided.**

Quality control charts should be maintained to follow the performance of the supplied reagents. Pertinent statistical methods should be employed to ascertain trends. The individual laboratory should set acceptable assay performance limits. Other parameters that should be monitored include the 80, 50 and 20% intercepts of the calibration curve for run-to-run reproducibility. In addition, maximum absorbance should be consistent with past experience. Significant deviation from established performance can indicate unnoticed change in experimental conditions or degradation of kit reagents. Fresh reagents should be used to determine the reason for the variations.

9. REFERENCE VALUES

These values are given only for guidance.

Males (ng/mL)			
Age (years)	n	Median	Range*
0 - 5	30	37	14 - 154
6 - 8	20	93	45 - 213
9 - 11	20	147	53 - 453
12 - 15	24	313	103 - 753
16 - 20	30	203	99 - 655
21 - 25	9	167	115 - 304
26 - 39	24	162	87 - 415
40 - 54	35	156	69 - 343
> 55	25	117	33 - 232

Females (ng/mL)			
Age (years)	n	Median	Range*
0 - 5	50	57	21 - 262
6 - 8	18	207	89 - 485
9 - 11	19	354	99 - 708
12 - 15	31	274	100 - 744
16 - 20	29	248	73 - 522
21 - 25	9	171	83 - 511
26 - 39	20	165	101 - 267
40 - 54	17	121	60 - 271
> 55	14	109	69 - 189

*The ranges are expressed as 2.5% to 97.5% percentiles.

Please pay attention to the fact that the determination of a range of expected values for a "normal" population in a given method is dependent on many factors, such as specificity and sensitivity of the method used and type of population under investigation. Therefore each laboratory should consider the range given by the Manufacturer as a general indication and produce their own range of expected values based on the indigenous population where the laboratory works.

10. PERFORMANCE AND CHARACTERISTICS

10.1. Precision

10.1.1. Intra Assay

Within run variation was determined by replicate (10x) the measurement of two different sera in one assay. The within assay variability is 8.9%.

10.1.2. Inter Assay

Between run variation was determined by replicate (10x) the measurement of two different sera in different lots. The between assay variability is 12.9%.

10.2. Specificity

The percentages of cross-reaction for the anti IGF-1 estimated by comparison of the concentration yielding a 50% inhibition are respectively:

IGF-1	100%
IGF-2	0.7%
Insuline	ND
GH	ND

10.3. Accuracy

The recovery of 15-30-100-250-400-600 ng/mL of IGF-1 added to samples gave an average value (\pm SD) of 106.9% \pm 9.5% with reference to the original concentrations.

Dilution test was conducted by diluting two samples until 1:32 with Calibrator 0 after extraction; dilution test gave an average value (\pm SD) of 100.4% \pm 9.0%

10.4. Detection limit

The lowest detectable concentration of IGF-1 that can be distinguished from the Calibrator 0 is 7.8 ng/mL.

11. WASTE MANAGEMENT

Reagents must be disposed off in accordance with local regulations.

BIBLIOGRAPHY

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

Ed. 01/2015

DCM186-1

DiaMetra S.r.l. Headquarter: Via Calabria 15,
20090 SEGRATE (MI) Italy

Tel. +39-02-2139184

Fax +39-02-2133354

Manufactory: Via Pozzuolo 14,
06038 SPELLO (PG) Italy

Tel. +39-0742-24851

Fax +39-0742-316197

E-mail: info@diametra.com



DCM186-1
Ed. 01/2015

IGF-1

para análisis de rutina

Determinación inmunoenzimática cuantitativa de "Insulin-like Growth Factor 1" (IGF-1) en suero humano

IVD



LOT

Ver etiqueta externa



$\Sigma = 96$ ensayos

REF DKO186

USO PREVISTO

Método inmunoenzimático colorimétrico para la determinación cuantitativa de la concentración de "Insulin-like Growth Factor 1" (IGF-1) en suero humano.

El kit IGF-1 está destinado al uso en laboratorio exclusivamente.

1. IMPORTANCIA CLÍNICA

La proteína IGF-1 (o somatomedina-C) es un polipéptido de 70 aminoácidos de cadena única (peso: 7.649 Da) similares a proinsulina (50% de homología de secuencia) y el otro miembro de la familia de somatomedina IGF II (de 67 aminoácidos y que tiene un 70% de homología de secuencia con IGF-1).

IGF-1 es el factor más importante como mediador de crecimiento, ya que actúa directamente sobre la hormona del crecimiento, una hormona pituitaria que se caracteriza por niveles sanguíneos altamente fluctuantes. La concentración en sangre de IGF-1, por el contrario, es más estable debido a la unión a las proteínas de transporte; tanto la concentración de la proteína de unión predominante como la producción de IGF-1 están reguladas por la hormona del crecimiento.

El IGF-1 es producido por el hígado y otros tejidos, y tiene actividad endocrina, paracrina y autocrina. IGF-1 estimula el crecimiento y regula la diferenciación de diversos tejidos, presenta actividad similar a la insulina y promueve el crecimiento del cartílago. Aunque GH es el factor más importante que controla la concentración y secreción de IGF-1, otros factores también juegan un papel determinante: edad (máximo durante la adolescencia), sexo, estado nutricional y otras hormonas (estrógenos, tiroxina, prolactina...). Los estímulos tróficos específicos controlar principalmente la secreción de IGF-1 en el microambiente local de un órgano particular (actividad paracrina), mientras que la concentración en sangre de IGF-1 es la variable más importante para el crecimiento sistémico equilibrado (actividad endocrina).

Aplicaciones clínicas

Retraso en el crecimiento: un retraso en el crecimiento puede deberse a varias causas, incluida la producción deficiente de GH (hipopituitarismo), que se asocia con bajos niveles de IGF-1 en la sangre.

Debido a las dificultades para obtener resultados interpretables de las mediciones de GH, la determinación de la concentración de IGF-1 en plasma se considera una simple prueba de detección de pacientes antes de llevar a cabo nuevas investigaciones. Se pueden observar bajos niveles de IGF-1 en varias situaciones clínicas demoradas en el crecimiento, a pesar de la producción de GH normal o alta. Curiosamente, los niños con disfunción de GH secretoria neural pueden mostrar bajos niveles de IGF-1, a pesar de los niveles normales de GH. Los resultados del ensayo IGF-1 deben interpretarse con precaución, teniendo en cuenta los cambios normales en IGF-1 durante la infancia y la adolescencia (ver Rosenfeld et al).

Acromegalia: los niveles de IGF-1 son elevados en casos de acromegalia (producción excesiva de GH) y pueden servir como un indicador de la gravedad de la enfermedad. Los resultados se interpretan más fácilmente porque los valores normales se definen más fácilmente en adultos. La medición de IGF-1 también es útil para controlar el tratamiento.

Buscar: la dosis de IGF-1 es una valiosa herramienta para estudiar los cambios de este factor de crecimiento durante los estados fisiológicos (por ejemplo, embarazo) o condiciones patológicas (tales como diabetes), y el ajuste local de la producción de IGF-1 en relación con su actividad paracrina y autocrina (implicada en: curación de heridas, regeneración de órganos, crecimiento neoplásico, desarrollo fetal, regulación de las gónadas, etc.).

2. PRINCIPIO DEL MÉTODO

El kit Diametra IGF-1 es un inmunoensayo enzimático en fase sólida. En este kit, Diametra ha introducido una fase de pretratamiento de las muestras para mejorar el rendimiento clínico del ensayo. Es bien sabido que las proteínas que se unen a IGF-1 interfieren con el ensayo. La fase de pretratamiento utilizada en el kit se desarrolla de acuerdo con el procedimiento informado en Daughaday et al. (8).

Una cantidad fija de IGF-1 marcado con peroxidasa de rábano (HRP) compite con el no marcado IGF-1 presente en los calibradores, controles y muestras para un número limitado de sitios de unión reconocidos por un anticuerpo específico. Después de 1 hora de incubación a temperatura ambiente, la

microplaca se lava para detener la reacción de competición. Posteriormente, se agrega la solución de cromógeno (TMB) y la microplaca se incuba durante 15 minutos. La reacción se bloquea con la adición de Stop Solution, después de lo cual se lee la microplaca a la longitud de onda adecuada. La absorbancia medida es inversamente proporcional a la concentración de IGF-1. La concentración de IGF-1 en las muestras se determina por interpolación de la curva de calibración.

3. REACTIVOS, MATERIALES E INSTRUMENTOS

3.1 Reactivos y materiales incluidos en el kit

1. Calibradores (6 frascos, liofilizados)

CAL0	REF	DCE002/18606-0
CAL1	REF	DCE002/18607-0
CAL2	REF	DCE002/18608-0
CAL3	REF	DCE002/18609-0
CAL4	REF	DCE002/18610-0
CAL5	REF	DCE002/18611-0

2. Controles (2 frascos, liofilizados)

Control 1	REF	DCE045/18603A-0
Control 2	REF	DCE045/18603B-0

La concentración del Control se indica en el certificado de análisis (Certificate of Analysis)

3. Conjugado (1 frasco, 0,2 mL, conc. 101X)

IGF-1 conjugado con peroxidasa de rábano (HRP)	REF	DCE002/18602-0
--	------------	-----------------------

4. Tampón para Conjugado (1 frasco, 11,5 mL)

Tampón de fosfato	REF	DCE002/18601-0
-------------------	------------	-----------------------

5. Microplaca recubierta (1 microplaca divisible)

Anticuerpo anti IGF-1 absorbido en la microplaca	REF	DCE002/18603-0
--	------------	-----------------------

6. Substrato TMB (1 frasco, 25 mL)

H ₂ O ₂ -TMB (0,26 g/L) (<i>evítese el contacto con la piel</i>)	REF	DCE004/18604-0
--	------------	-----------------------

7. Solución de parada (1 frasco, 12 mL)

Ácido clorhídrico 1N (<i>evítese el contacto con la piel</i>)	REF	DCE005/18605-0
---	------------	-----------------------

8. Solución de lavado conc. 200X (1 frasco, 10 mL)

Tampón Tris-HCl	REF	DCE067/18667-0
-----------------	------------	-----------------------

9. Solución de pretratamiento (1 frasco, 20 mL)

Tampón con etanol	REF	DCE068/18668-0
-------------------	------------	-----------------------

10. Solución de reconstitución (1 frasco, 10 mL)

Tampón con etanol	REF	DCE066/18666-0
-------------------	------------	-----------------------

11. Solución de neutralización (1 frasco, 30 mL)

Tampón de fosfato con Azida de Sodio	REF	DCE069/18669-0
--------------------------------------	------------	-----------------------

3.2 Reactivos necesarios no incluidos en el kit

Agua destilada

3.3 Material e instrumental auxiliar

Dispensadores automáticos

Lector de microplacas (450 nm, 630-650 nm).

Tubos de polipropileno para el paso de neutralización (opcional: tubos de microcentrífuga)

Microcentrífuga o centrífuga

Notas

Conservar los reactivos a oscuras, a temperatura entre 2 y 8 °C.

Llevar a temperatura ambiente la bolsa del reactivo 5 (microplaca recubierta) antes de abrirla; cerrarla de inmediato después de sacar las tiras que se han de utilizar; una vez abierta, la microplaca se mantiene estable hasta la fecha de caducidad indicada.

4. ADVERTENCIAS

- Este kit de ensayo está previsto para usarse in vitro y por personal experto. No es para uso interno o externo en humanos o animales.
- Usar los equipos de protección individual previstos al trabajar con los reactivos suministrados.
- Siga las Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP) en el manejo de las muestras sanguíneas y sus derivados.
- Materiales de origen animal utilizados para la elaboración de este kit se obtuvieron a partir de animales sanos y las proteínas de bovino se obtuvieron de los países no afectados por la EEB, aun así estos materiales se deben manejar como potencialmente infecciosos.
- Todos los reactivos de origen humano usados en la preparación de los reactivos se han comprobado y han resultado negativos para la presencia de anticuerpos anti-VIH, para HbsAg y para anticuerpos anti-VHC. Sin embargo, ningún ensayo ofrece seguridad absoluta de la ausencia de VIH, VHB, VHC o de otros agentes infecciosos. Por lo tanto, los Calibradores y los Controles deben manipularse como material potencialmente infeccioso.
- Algunos reactivos contienen pequeñas cantidades de Azida de Sodio o Timol como conservante. Evite el contacto con la piel y las mucosas.
- La Azida de Sodio, usada como conservante, puede ser tóxica si se ingiere o se absorbe a través de la piel o de los ojos; además, puede reaccionar con las tuberías de plomo o cobre formando azidas metálicas potencialmente explosivas. Dejar que corra gran cantidad de agua, si se usa un lavabo para eliminar los reactivos, para prevenir la formación de azidas.
- El cromógeno TMB contiene un irritante que puede ser dañino si se inhala, se ingiere o se absorbe a través de la piel. Para prevenir lesiones, evitar la inhalación, la ingestión o el contacto con la piel y con los ojos.
- La solución de parada está formada por una solución de ácido clorhídrico diluido. El ácido clorhídrico es venenoso y corrosivo, y puede ser tóxico si se ingiere. Para prevenir posibles quemaduras químicas, evitar el contacto con la piel y con los ojos.
- Evite la exposición de los reactivos TMB/H₂O₂ a la luz solar directa, metales u oxidantes. No congelar la solución.

5. PRECAUCIONES

- Respetar rigurosamente la secuencia de los pasos indicados en este protocolo. Los resultados aquí presentados se han obtenido utilizando los

reactivos específicos que figuran en estas instrucciones de uso.

- Todos los reactivos deben conservarse a una temperatura controlada de 2-8 °C en sus recipientes originales. Todas las excepciones están claramente marcadas. Los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad cuando se almacenan y manipulan de acuerdo con las instrucciones proporcionadas.
- Antes del uso, esperar hasta que todos los componentes del kit y las muestras se encuentren a temperatura ambiente (22-28°C) y mezclar cuidadosamente.
- No mezclar componentes de kits de lotes distintos. Se debe observar la fecha de caducidad indicada en la etiqueta de la caja y de todas las ampollas. No usar componentes después de la fecha de caducidad.
- Si utiliza un equipo automático, es responsabilidad del usuario asegurar que la metodología aplicada ha sido debidamente validada.
- Un lavado incompleto o impreciso y la aspiración insuficiente del líquido de los micropozos ELISA pueden causar una precisión pobre y/o un elevado fondo. Para mejorar el rendimiento del kit en los sistemas automatizados, se recomienda aumentar el número de lavados.
- Para la reproducibilidad de los resultados, es importante que el tiempo de reacción sea igual para cada pocillo. El tiempo de dispensación de los pocillos no debe superar los 10 minutos; si se prolongara más allá de los 10 minutos, respétese el orden de dispensación. Si utiliza más de una placa, se recomienda repetir la curva de calibración en cada placa.
- Al añadir el sustrato TMB inicia una reacción cinética que termina al agregar la solución de Parada. Tanto el sustrato como la solución de Parada deben agregarse en la misma secuencia para evitar diferentes tiempos de reacción.
- Observar las directrices para la ejecución del control de calidad en los laboratorios clínicos al comprobar controles y/o pool de sueros.
- Observar la máxima precisión en la reconstitución y dispensación de los reactivos.
- No use muestras con contaminación microbiana, altamente lipémicas o hemolizadas.
- Los lectores de microplacas lean las DO verticalmente, por tanto no debe tocarse el fondo de los pocillos.

6. PROCEDIMIENTO

6.1. Preparación de los Calibradores (C₀...C₅)

Los calibradores deben reconstituirse **con 1,0 mL de Solución de reconstitución**.

Las concentraciones de los Calibradores se muestran en las etiquetas.

Después de la reconstitución, los Calibradores son estables durante 1 semana a 2-8°C; por periodos mas largos, los Calibradores reconstituídos deben almacenarse -20°C por un máximo de 3 meses; evitar ciclos de congelación y descongelación.

Los Calibradores están calibrados contra el estándar internacional NIBSC 1st WHO IS 02/254 (1 ng de calibrador corresponde a 1 ng de "Estándar Internacional").

6.2. Preparación de los Controles

Los calibradores deben reconstituirse **con 1,0 mL de agua desionizada**.

Las concentraciones de los Controles se muestran en el Certificado de Análisis.

Después de la reconstitución, los controles son estables durante 1 semana a 2-8°C; por periodos mas largos, los Controles reconstituídos deben almacenarse -20°C por un máximo de 3 meses; evitar ciclos de congelación y descongelación.

6.3. Preparación del Conjugado

Inmediatamente antes del uso, prepare la cantidad necesaria de Conjugado diluyendo el Conjugado 101X (reactivo 3) con el Tampón para Conjugado (reactivo 4); por ejemplo, diluir 20 µL de Conjugado 101X en 2 mL de Tampón para Conjugado.

Use un "vortex" para homogeneizar bien.

El conjugado diluido es estable 4h a temperatura ambiente (22-28°C).

Evite la exposición del conjugado concentrado y diluido a la luz solar directa.

6.4. Preparación de la muestra

La determinación de IGF-1 con este kit se puede realizar en siero humano.

El suero debe almacenarse a 2-8°C; si la dosificación no se realiza el mismo día del recolección, conserve la muestra a -20°C.

Evite los ciclos de congelación y descongelación de la muestra.

Llevar la muestra a temperatura ambiente (22-28°C) antes de su uso; se recomienda mezclar bien la muestra antes de su uso.

Si necesita diluir la muestra, use Calibrator 0.

6.5. Preparación de la solución de lavado

Antes del uso, diluya el contenido requerido de "Solución de lavado conc. 200X" con agua destilada; por ejemplo, diluya 1 mL de solución concentrada de lavado con 199 mL de agua destilada. Mezcle bien antes de usar. La solución diluida no utilizada debe desecharse al final de la dosis.

Una vez abierto, la "Solución de lavado conc. 200X" es estable a 2-8°C hasta la fecha de vencimiento.

6.6. Procedimiento

- **Esperar hasta que todos los reactivos se encuentren a temperatura ambiente (22-28°C).** Al final del ensayo inmediatamente poner todos los reactivos a 2-8°C para evitar largos periodos a temperatura ambiente.
- Las tiras de pocillos no utilizados se deben guardar de inmediato en la bolsa desechable que contiene desecantes y almacenarse a 2-8°C.
- Para evitar la contaminación microbiana y/o química no regrese porciones de reactivos no usados en los viales originales.

- Para aumentar la precisión de los resultados de la prueba es necesario trabajar en duplicado: preparar dos pocillos para cada punto de la curva de calibración (C₀-C₅), dos para cada control, dos para cada muestra.

Antes de continuar con el ensayo en la microplaca, es necesario pretratar cada muestra y control (**no los calibradores**) siguiendo uno de los dos procedimientos siguientes.

6.6.1. Pretratamiento con tubo de microcentrífuga

1. Etiquete un tubo de microcentrífuga (para la extracción) y un tubo de polipropileno (para la neutralización) para cada muestra y control.
2. Pipetee 100 µL de cada muestra y control en el tubo de microcentrífuga.
3. Agregue 400 µL de "Solución de pretratamiento" en el tubo
4. Cierre el tubo, vortex e incube durante 30 minutos a temperatura ambiente (22-28°C)
5. Centrifugar durante 2 minutos a 10000 rpm
6. Tomar 100 µL de sobrenadante y transferirlo al tubo de polipropileno marcado
7. Agregue 600 µL de "Solución de neutralización" en el tubo
8. Agite en vórtex el tubo y use esta muestra de acuerdo con el procedimiento de ensayo.

6.6.2. Pretratamiento con tubo de polipropileno

Si no tiene tubos de microcentrífuga y una microcentrífuga, proceda de la siguiente manera.

1. Etiquete dos tubos de polipropileno (uno para la extracción y el otro para la neutralización) para cada muestra y control
2. Pipetee 100 µL de cada muestra en el tubo de extracción
3. Agregue 400 µL de "Solución de pretratamiento" en el tubo
4. Cierre el tubo, vortex e incube durante 30 minutos a temperatura ambiente (22-28°C)
5. Centrifugar durante 15 minutos a 3000 rpm
6. Tomar 100 µL de sobrenadante y transferirlo al otro tubo de polipropileno marcado
7. Agregue 600 µL de "Solución de neutralización" en el tubo
8. Agite en vórtex el tubo y use esta muestra de acuerdo con el procedimiento de ensayo.

6.6.3. Procedimiento

Reactivo	Calibrad.	Muestra/ Control pretratados
Calibradores C ₀ -C ₅	50 µL	
Muestra/ Control tratadas		50 µL
Conjugado	100 µL	100 µL
<p>Incubar 60 minutos a temperatura ambiente (22±28°C) en agitación (500 rpm).</p> <p>Retirar la mezcla de reacción. Lave los pozos 3 veces con 0,4 mL de solución de lavado diluida.</p> <p>Nota importante: agite suavemente la placa durante 5 segundos en cada paso del lavado. Después del último lavado asegúrese haber eliminado completamente la solución de lavado de los pozos, invierta la placa y golpéela repetidas veces contra una servilleta de papel absorbente.</p>		
Substrato TMB	200 µL	200 µL
<p>Incubar 15 minutos a temperatura ambiente (22±28°C), protegida de la luz en agitación (500 rpm).</p>		
Solución de parada	100 µL	100 µL
<p>Agitar suavemente la placa.</p> <p>Leer la absorbancia (E) a 450 nm frente una segunda lectura de referencia a 630-650 nm entre 5 minutos.</p>		

7. RESULTADOS

1. Lea la placa a 450 nm contra un filtro de referencia ajustado a 650 nm (o 630 nm).
2. Calcule el promedio de las absorbancias por duplicado.
3. Calcule para cada calibrador, control y muestra:

$$B/B_0 (\%) = \frac{OD (\text{Calibrador o Control o Muestra})}{OD (\text{Calibrador 0})} \times 100$$

4. Utilizando un papel cuadriculado lineal-lineal o semilogarítmico, grafique los valores B/B₀ (%) para cada punto de calibración según la concentración específica de IGF-1.
5. Los métodos computarizados también se pueden usar para construir la curva de calibración. En este caso, se recomienda utilizar una curva de tipo "Cuatro parámetros logísticos".
6. Determine la concentración de IGF-1 en la muestra interpolando el valor B/B₀ (%) de la muestra en la curva obtenida.

Factor de conversión:

ng/mL = nmol/L x 0,13

nmol/L = ng/mL x 7.65

8. CONTROL DE CALIDAD

Cada laboratorio debe analizar sueros control para los rangos bajo, medio y alto de IGF-1 para supervisar el rendimiento del análisis. Estas muestras deben tratarse como desconocidas y los valores deben determinarse en cada ensayo realizado. **Los controles que contienen azida sódica interfieren con el ensayo, por lo tanto, evite el uso de azida sódica para los controles internos del laboratorio.**

Se deben mantener los gráficos de control de calidad para seguir el rendimiento de los reactivos suministrados. Se deben emplear métodos estadísticos adecuados para determinar las tendencias. El laboratorio debe establecer los límites de aceptabilidad del rendimiento del análisis. Entre otros parámetros que se deben controlar, se incluyen las intersecciones de 80, 50 y 20% de la curva de calibración para evaluar la reproducibilidad. Además, la capacidad de absorción máxima debe ser constante con la experiencia anterior. Una desviación significativa del rendimiento establecido puede indicar un cambio inadvertido en las condiciones experimentales o la degradación de los reactivos del kit. Se deben usar reactivos frescos para determinar la causa de las variaciones.

9. VALORES DE REFERENCIA

Los siguientes valores se deben entender como pautas:

Hombres (ng/mL)			
Edad (años)	n	Mediana	Rango*
0 - 5	30	37	14 - 154
6 - 8	20	93	45 - 213
9 - 11	20	147	53 - 453
12 - 15	24	313	103 - 753
16 - 20	30	203	99 - 655
21 - 25	9	167	115 - 304
26 - 39	24	162	87 - 415
40 - 54	35	156	69 - 343
> 55	25	117	33 - 232

Mujeres (ng/mL)			
Edad (años)	n	Mediana	Rango*
0 - 5	50	57	21 - 262
6 - 8	18	207	89 - 485
9 - 11	19	354	99 - 708
12 - 15	31	274	100 - 744
16 - 20	29	248	73 - 522
21 - 25	9	171	83 - 511
26 - 39	20	165	101 - 267

40 - 54	17	121	60 - 271
> 55	14	109	69 - 189

* Los rangos se expresan de 2.5% a 97.5% percentil.

Es importante señalar que la determinación de un rango de valores esperados en un método dado para una población "normal" depende de muchos factores, tales como la especificidad y sensibilidad del método en uso, y la población en estudio. Por lo tanto, cada laboratorio debe considerar el intervalo especificado por el fabricante como una guía general y producir su propio rango de valores calculados en base al estadístico obtenido por el laboratorio, donde reside la población local.

10. CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO**10.1 Precisión***10.1.1 Intra ensayo*

La variabilidad dentro del mismo kit se determinó repitiendo dos niveles diferentes de muestra. La variabilidad dentro del ensayo es 8,9%.

10.1.2 Entre ensayos

La variabilidad entre kits diferentes se determinó repitiendo dos niveles diferentes de muestra con kit de lotes diferentes. La variabilidad entre ensayos es 12,9%.

10.2 Especificidad

Los porcentajes de reacción cruzada para el anticuerpo anti-IGF-1 estimado a partir de la comparación con la concentración que da una inhibición del 50% son, respectivamente::

IGF-1	100%
IGF-2	0.7%
Insulina	ND
GH	ND

10.3 Exactitud

La prueba de recuperación realizada en una muestra enriquecida con 15-30-100-250-400-600 ng/mL de IGF-1 ha dado un valor medio (\pm DE) de 106,9% \pm 9,5%.

La prueba de dilución conducta hasta una dilución 1:32 (realizada con el calibrador 0 después de la extracción de la muestra) dió una media (\pm DE) de 100,4% \pm 9,0%.

10.4 Límite de detección

La concentración mínima de IGF-1 detectable que puede distinguirse del Calibrador 0 es de 7,8 ng/mL.

11. INDICACIONES PARA LA ELIMINACIÓN

Eliminar los reactivos conforme con la normativa local sobre la materia.

BIBLIOGRAFÍA

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.

Ed. 01/2015

DCM186-1

DiaMetra S.r.l. Headquarter: Via Calabria 15,
20090 SEGRATE (MI) Italy
Tel. +39-02-2139184
Fax +39-02-2133354

Manufactory: Via Pozzuolo 14,
06038 SPELLO (PG) Italy
Tel. +39-0742-24851
Fax +39-0742-316197
E-mail: info@diametra.com

	DE ES FR GB IT PT	In vitro Diagnostikum Producto sanitario para diagnóstico In vitro Dispositif medical de diagnostic in vitro In vitro Diagnostic Medical Device Dispositivo medico-diagnostico in vitro Dispositivos medicos de diagnostico in vitro		DE ES FR GB IT PT	Hergestellt von Elaborado por Fabriqué par Manufacturer Produttore Produzido por
	DE ES FR GB IT PT	Achtung, Begleitdokumente Precaución, consulte los documentos adjuntos Attention, veuillez consulter les documents d'accompagnement Caution, consult accompanying documents Attenzione, consultare la documentazione allegata Atenção, consultar os documentos de acompanhamento	 yyyy-mm	DE ES FR GB IT PT	Herstellungs datum Fecha de fabricacion Date de fabrication Date of manufacture Data di produzione Data de produção
 yyyy-mm-dd	DE ES FR GB IT PT	Verwendbar bis Establa hasta (usar antes de último día del mes) Utiliser avant (dernier jour du mois indiqué) Use by (last day of the month) Utilizzare prima del (ultimo giorno del mese) Utilizar (antes ultimo dia do mês)		DE ES FR GB IT PT	Biogefährdung Riesco biológico Risque biologique Biological risk Rischio biologico Risco biológico
	DE ES FR GB IT PT	Gebrauchsanweisung beachten Consultar las instrucciones Consulter le mode d'emploi Consult instructions for use Consultare le istruzioni per l'uso Consultar instruções para uso	LOT	DE ES FR GB IT PT	Chargenbezeichnung Codigo de lote Numero de lot Batch code Codice del lotto Codigo do lote
 $\Sigma = xx$	DE ES FR GB IT PT	Ausreichend für "n" Tests Contenido suficiente para "n" tests Contenu suffisant pour "n" tests Contains sufficient for "n" tests Contenuto sufficiente per "n" saggi Contém o suficiente para "n" testes	CONT	DE ES FR GB IT PT	Inhalt Contenido del estuche Contenu du coffret Contents of kit Contenuto del kit Conteúdo do kit
 Max Min	DE ES FR GB IT PT	Temperaturbereich Límitación de temperatura Limites de température de conservation Temperature limitation Limiti di temperatura Temperaturas limites de conservação	REF	DE ES FR GB IT PT	Bestellnummer Número de catálogo Références du catalogue Catalogue number Numero di Catalogo Número do catálogo
	DE ES FR GB IT PT	Vor direkter Sonneneinstrahlung schützen Mantener alejado de la luz solar Tenir à l'écart de la lumière du soleil Keep away from sunlight Tenere lontano dalla luce solare Mantenha longe da luz solar			

SUGGERIMENTI PER LA RISOLUZIONE DEI PROBLEMI/TROUBLESHOOTING**ERRORE CAUSE POSSIBILI/ SUGGERIMENTI****Nessuna reazione colorimetrica del saggio**

- mancata dispensazione del coniugato
- contaminazione del coniugato e/o del Substrato
- errori nell'esecuzione del saggio (es. Dispensazione accidentale dei reagenti in sequenza errata o provenienti da flaconi sbagliati, etc.)

Reazione troppo blanda (OD troppo basse)

- coniugato non idoneo (es. non proveniente dal kit originale)
- tempo di incubazione troppo breve, temperatura di incubazione troppa bassa

Reazione troppo intensa (OD troppo alte)

- coniugato non idoneo (es. non proveniente dal kit originale)
- tempo di incubazione troppo lungo, temperatura di incubazione troppa alta
- qualità scadente dell'acqua usata per la soluzione di lavaggio (basso grado di deionizzazione,)
- lavaggi insufficienti (coniugato non completamente rimosso)

Valori inspiegabilmente fuori scala

- contaminazione di pipette, puntali o contenitori- lavaggi insufficienti (coniugato non completamente rimosso)

CV% intrasaggio elevato

- reagenti e/o strip non portate a temperatura ambiente prima dell'uso
- il lavatore per micropiastre non lava correttamente (suggerimento: pulire la testa del lavatore)

CV% intersaggio elevato

- condizioni di incubazione non costanti (tempo o temperatura)
- controlli e campioni non dispensati allo stesso tempo (con gli stessi intervalli) (controllare la sequenza di dispensazione)
- variabilità intrinseca degli operatori

ERROR POSSIBLE CAUSES / SUGGESTIONS**No colorimetric reaction**

- no conjugate pipetted reaction after addition
- contamination of conjugates and/or of substrate
- errors in performing the assay procedure (e.g. accidental pipetting of reagents in a wrong sequence or from the wrong vial, etc.)

Too low reaction (too low ODs)

- incorrect conjugate (e.g. not from original kit)
- incubation time too short, incubation temperature too low

Too high reaction (too high ODs)

- incorrect conjugate (e.g. not from original kit)
- incubation time too long, incubation temperature too high
- water quality for wash buffer insufficient (low grade of deionization)
- insufficient washing (conjugates not properly removed)

Unexplainable outliers

- contamination of pipettes, tips or containers
- insufficient washing (conjugates not properly removed) too high within-run
- reagents and/or strips not pre-warmed to CV% Room Temperature prior to use
- plate washer is not washing correctly (suggestion: clean washer head)
- too high between-run - incubation conditions not constant (time, CV % temperature)
- controls and samples not dispensed at the same time (with the same intervals) (check pipetting order)
- person-related variation

ERROR / POSIBLES CAUSAS / SUGERENCIAS**No se produce ninguna reacción colorimétrica del ensayo**

- no se ha dispensado el conjugado
- contaminación del conjugado y/o del sustrato
- errores en la ejecución del ensayo (p. ej., dispensación accidental de los reactivos en orden incorrecto o procedentes de frascos equivocados, etc.)

Reacción escasa (DO demasiado bajas)

- conjugado no idóneo (p. ej., no procedente del kit original)
- tiempo de incubación demasiado corto, temperatura de incubación demasiado baja

Reacción demasiado intensa (DO demasiado altas)

- conjugado no idóneo (p. ej., no procedente del kit original)
- tiempo de incubación demasiado largo, temperatura de incubación demasiado alta
- calidad escasa del agua usada para la solución de lavado (bajo grado de desionización)
- lavados insuficientes (el conjugado no se ha retirado completamente)

Valores inexplicablemente fuera de escala

- contaminación de pipetas, puntas o contenedores- lavados insuficientes (el conjugado no se ha retirado completamente)

CV% intraensayo elevado

- los reactivos y/o tiras no se encontraban a temperatura ambiente antes del uso
- el lavador de microplacas no funciona correctamente (sugerencia: limpiar el cabezal del lavador)

CV% interensayo elevado

- condiciones de incubación no constantes (tiempo o temperatura)
- controles y muestras no dispensados al mismo tiempo (con los mismos intervalos) (controlar la secuencia de dispensación)
- variación en función de los operadores

ERREUR CAUSES POSSIBLES / SUGGESTIONS**Aucune réaction colorimétrique de l'essai**

- non distribution du conjugué
- contamination du conjugué et/ou du substrat
- erreurs dans l'exécution du dosage (par ex., distribution accidentelle des réactifs dans le mauvais ordre ou en provenance des mauvais flacons, etc.)

Réaction trop faible (DO trop basse)

- conjugué non approprié (par ex., ne provenant pas du coffret original)
- temps d'incubation trop court, température d'incubation trop basse

Réaction trop intense (DO trop élevée)

- conjugué non approprié (par ex., ne provenant pas du coffret original)
- temps d'incubation trop long, température d'incubation trop élevée
- mauvaise qualité de l'eau utilisée pour la solution de lavage (bas degré de déionisation)
- lavages insuffisants (conjugué non entièrement éliminé)

Valeurs inexplicablement hors plage

- contamination des pipettes, embouts ou récipients - lavages insuffisants (conjugué non entièrement éliminé)

CV% intra-essai élevé

- les réactifs et/ou les bandes n'ont pas atteint la température ambiante avant usage
- le laveur de microplaques ne lave pas correctement (suggestion : nettoyer la tête du laveur)

CV% inter-essai élevé

- conditions d'incubation non constantes (temps ou température)
- contrôles et échantillons non distribués en même temps (avec les mêmes intervalles) (contrôler l'ordre de distribution)
- variabilité intrinsèque des opérateurs