



IGF-1-ELISA

KAP1581

History

Summary of change:

Previous Version: 200224-1	Current Version: 220516																																																																																																
Old DIAsource logo 	New DIAsource logo 																																																																																																
V. REAGENTS PROVIDED	V. REAGENTS PROVIDED																																																																																																
<table border="1"> <tr> <td>CONJ</td> <td>BUF</td> <td>1 vial 11.5 ml</td> <td>Ready for use</td> </tr> <tr> <td colspan="4">Conjugate buffer: Phosphate buffer with caseine and thymol</td> </tr> <tr> <td>CAL</td> <td>0</td> <td>1 vial lyophilized</td> <td>Add 1 ml reconstitution solution</td> </tr> <tr> <td colspan="4">Zero calibrator in phosphate buffer with bovine casein</td> </tr> <tr> <td>CAL</td> <td>N</td> <td>5 vials lyophilized</td> <td>Add 1 ml reconstitution solution</td> </tr> <tr> <td colspan="4">Calibrators - N = 1 to 5 (see exact values on vial labels) in phosphate buffer with bovine casein</td> </tr> <tr> <td>STOP</td> <td>SOLN</td> <td>1 vial 12 ml</td> <td>Ready for use</td> </tr> <tr> <td colspan="4">Stop solution: HCl 1M</td> </tr> <tr> <td>CHROM</td> <td>TMB</td> <td>1 vial 25 ml</td> <td>Ready for use</td> </tr> <tr> <td colspan="4">Chromogenic TMB Solution (Tetramethylbenzidine)</td> </tr> <tr> <td>NEUTR</td> <td>SOLN</td> <td>1 vial 30 ml</td> <td>Ready for use</td> </tr> <tr> <td colspan="4">Neutralization Solution containing phosphate buffer with bovine casein and azide (<0.1%)</td> </tr> </table>	CONJ	BUF	1 vial 11.5 ml	Ready for use	Conjugate buffer: Phosphate buffer with caseine and thymol				CAL	0	1 vial lyophilized	Add 1 ml reconstitution solution	Zero calibrator in phosphate buffer with bovine casein				CAL	N	5 vials lyophilized	Add 1 ml reconstitution solution	Calibrators - N = 1 to 5 (see exact values on vial labels) in phosphate buffer with bovine casein				STOP	SOLN	1 vial 12 ml	Ready for use	Stop solution: HCl 1M				CHROM	TMB	1 vial 25 ml	Ready for use	Chromogenic TMB Solution (Tetramethylbenzidine)				NEUTR	SOLN	1 vial 30 ml	Ready for use	Neutralization Solution containing phosphate buffer with bovine casein and azide (<0.1%)				<p>Removal of the column relative to color code</p> <table border="1"> <tr> <td>CONJ</td> <td>BUF</td> <td>1 vial 13 ml</td> <td>Ready for use</td> </tr> <tr> <td colspan="4">Conjugate buffer: Phosphate buffer with caseine and thymol</td> </tr> <tr> <td>CAL</td> <td>0</td> <td>1 vial 1 ml</td> <td>Ready for use</td> </tr> <tr> <td colspan="4">Zero calibrator in phosphate buffer with ovalbumin and gentamycin</td> </tr> <tr> <td>CAL</td> <td>N</td> <td>5 vials lyophilized</td> <td>Add 1 ml reconstitution solution</td> </tr> <tr> <td colspan="4">Calibrators - N = 1 to 5 in phosphate buffer with ovalbumin and gentamycin. (see exact values on vial labels)</td> </tr> <tr> <td>STOP</td> <td>SOLN</td> <td>1 vial 13 ml</td> <td>Ready for use</td> </tr> <tr> <td colspan="4">Stop solution: 0.2M H₂SO₄</td> </tr> <tr> <td>CHROM</td> <td>TMB</td> <td>2 vials 13 ml</td> <td>Ready for use</td> </tr> <tr> <td colspan="4">Chromogenic TMB Solution (Tetramethylbenzidine)</td> </tr> <tr> <td>NEUTR</td> <td>SOLN</td> <td>1 vial 30 ml</td> <td>Ready for use</td> </tr> <tr> <td colspan="4">Neutralization Solution containing phosphate buffer with bovine casein</td> </tr> </table>	CONJ	BUF	1 vial 13 ml	Ready for use	Conjugate buffer: Phosphate buffer with caseine and thymol				CAL	0	1 vial 1 ml	Ready for use	Zero calibrator in phosphate buffer with ovalbumin and gentamycin				CAL	N	5 vials lyophilized	Add 1 ml reconstitution solution	Calibrators - N = 1 to 5 in phosphate buffer with ovalbumin and gentamycin. (see exact values on vial labels)				STOP	SOLN	1 vial 13 ml	Ready for use	Stop solution: 0.2M H ₂ SO ₄				CHROM	TMB	2 vials 13 ml	Ready for use	Chromogenic TMB Solution (Tetramethylbenzidine)				NEUTR	SOLN	1 vial 30 ml	Ready for use	Neutralization Solution containing phosphate buffer with bovine casein			
CONJ	BUF	1 vial 11.5 ml	Ready for use																																																																																														
Conjugate buffer: Phosphate buffer with caseine and thymol																																																																																																	
CAL	0	1 vial lyophilized	Add 1 ml reconstitution solution																																																																																														
Zero calibrator in phosphate buffer with bovine casein																																																																																																	
CAL	N	5 vials lyophilized	Add 1 ml reconstitution solution																																																																																														
Calibrators - N = 1 to 5 (see exact values on vial labels) in phosphate buffer with bovine casein																																																																																																	
STOP	SOLN	1 vial 12 ml	Ready for use																																																																																														
Stop solution: HCl 1M																																																																																																	
CHROM	TMB	1 vial 25 ml	Ready for use																																																																																														
Chromogenic TMB Solution (Tetramethylbenzidine)																																																																																																	
NEUTR	SOLN	1 vial 30 ml	Ready for use																																																																																														
Neutralization Solution containing phosphate buffer with bovine casein and azide (<0.1%)																																																																																																	
CONJ	BUF	1 vial 13 ml	Ready for use																																																																																														
Conjugate buffer: Phosphate buffer with caseine and thymol																																																																																																	
CAL	0	1 vial 1 ml	Ready for use																																																																																														
Zero calibrator in phosphate buffer with ovalbumin and gentamycin																																																																																																	
CAL	N	5 vials lyophilized	Add 1 ml reconstitution solution																																																																																														
Calibrators - N = 1 to 5 in phosphate buffer with ovalbumin and gentamycin. (see exact values on vial labels)																																																																																																	
STOP	SOLN	1 vial 13 ml	Ready for use																																																																																														
Stop solution: 0.2M H ₂ SO ₄																																																																																																	
CHROM	TMB	2 vials 13 ml	Ready for use																																																																																														
Chromogenic TMB Solution (Tetramethylbenzidine)																																																																																																	
NEUTR	SOLN	1 vial 30 ml	Ready for use																																																																																														
Neutralization Solution containing phosphate buffer with bovine casein																																																																																																	
XII. TYPICAL DATA	XII. TYPICAL DATA																																																																																																
The following data are for illustration only and should never be used instead of the real time calibration curve.	The following data are for illustration only and should never be used instead of the real time calibration curve.																																																																																																
<table border="1"> <thead> <tr> <th>Calibrators</th> <th>ng/ml</th> <th>OD units</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>S0</td> <td>0.0</td> <td>2.704</td> </tr> <tr> <td>S1</td> <td>15.0</td> <td>2.278</td> </tr> <tr> <td>S2</td> <td>23.8</td> <td>1.944</td> </tr> <tr> <td>S3</td> <td>59.0</td> <td>1.714</td> </tr> <tr> <td>S4</td> <td>183.0</td> <td>1.104</td> </tr> <tr> <td>S5</td> <td>774.0</td> <td>0.504</td> </tr> </tbody> </table>	Calibrators	ng/ml	OD units	S0	0.0	2.704	S1	15.0	2.278	S2	23.8	1.944	S3	59.0	1.714	S4	183.0	1.104	S5	774.0	0.504	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Calibrators</th> <th>ng/ml</th> <th>OD units</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>S0</td> <td>0.0</td> <td>2.841</td> </tr> <tr> <td>S1</td> <td>18.0</td> <td>2.560</td> </tr> <tr> <td>S2</td> <td>28.6</td> <td>2.269</td> </tr> <tr> <td>S3</td> <td>56.0</td> <td>1.820</td> </tr> <tr> <td>S4</td> <td>154.0</td> <td>1.091</td> </tr> <tr> <td>S5</td> <td>643.0</td> <td>0.494</td> </tr> </tbody> </table>	Calibrators	ng/ml	OD units	S0	0.0	2.841	S1	18.0	2.560	S2	28.6	2.269	S3	56.0	1.820	S4	154.0	1.091	S5	643.0	0.494																																																						
Calibrators	ng/ml	OD units																																																																																															
S0	0.0	2.704																																																																																															
S1	15.0	2.278																																																																																															
S2	23.8	1.944																																																																																															
S3	59.0	1.714																																																																																															
S4	183.0	1.104																																																																																															
S5	774.0	0.504																																																																																															
Calibrators	ng/ml	OD units																																																																																															
S0	0.0	2.841																																																																																															
S1	18.0	2.560																																																																																															
S2	28.6	2.269																																																																																															
S3	56.0	1.820																																																																																															
S4	154.0	1.091																																																																																															
S5	643.0	0.494																																																																																															
XIII. PERFORMANCE AND LIMITATIONS	XIII. PERFORMANCE AND LIMITATIONS																																																																																																
A. Detection Limit	A. Detection Limit																																																																																																
The LoB (Limit of Blank) was calculated by measuring the blank 20 times and was calculated as the mean - 1.65 standard deviations of the distribution of these values. The LoB was calculated to be 4.5 ng/ml.	The LoB (Limit of Blank) was calculated by measuring the blank 20 times and was calculated as the mean - 1.65 standard deviations of the distribution of these values. The LoB was calculated to be 4.0 ng/ml.																																																																																																
B. Specificity	B. Specificity																																																																																																
B2. Interferences	B2. Interferences																																																																																																
The effect of potential interfering substances on samples using the DIAsource IGF-1-ELISA kit was evaluated. Different levels of Haemoglobin, Bilirubin, Triglyceride were tested on samples with different IGF-1 concentrations. Our acceptance criteria was to have interference of less than 10%. Hemolyzed and icteric samples have to be avoided. However, there is no restriction for the measurement of lipemic samples.	The effect of potential interfering substances on samples using the DIAsource IGF-1-ELISA kit was evaluated. Different levels of Haemoglobin, Bilirubin, Triglyceride were tested on samples with different IGF-1 concentrations. Our acceptance criteria was to have interference of less than 10%. Hemolyzed and icteric samples have to be avoided. However, there is no restriction for the measurement of lipemic samples.																																																																																																

Compound	IGF-1 concentration before addition of interferent (ng/ml)	Interferent added concentration (mg/dl)	IGF-1 concentration after addition of interferent	Mean variation (%)
Haemoglobin	69.8	500	58.5	-9.9
		250	60.1	
	99.9	500	100.8	
		250	89.4	
Bilirubin	69.8	100	56.1	-13.0
		50	64.1	
	99.9	100	83.3	
		50	92.1	
Triglyceride	45.6	2500	47.9	4.4
		1250	45.8	
	64.6	2500	68.2	
		1250	68.8	

C. Precision

Intra assay				Inter assay			
Sample	n	$\bar{x} \pm \text{sd}$ ng/ml	cv %	Sample	n	$\bar{x} \pm \text{sd}$ ng/ml	cv %
A	10	51,1 ± 3,1	6,1	C	15	58,4 ± 7,2	12,3
B	10	479,2 ± 42,5	8,9	D	15	127,6 ± 13,8	10,8

D. Accuracy

Sample (ng)	Added IGF-1 (ng)	Expected (ng/ml)	Measured (ng/ml)	Recovery (%)
16	15	31	32	103,2
16	30	46	48	104,3
16	100	116	120	103,4
16	250	266	256	96,2
16	400	416	431	103,6
16	600	616	681	110,6

Sample (ng)	Added IGF-1 (ng)	Expected (ng/ml)	Measured (ng/ml)	Recovery (%)
17	15	32	32	100
17	30	47	45	95,7
17	100	117	128	109,4
17	250	267	288	107,9
17	400	417	508	121,8
17	600	617	785	127,2

Sample A			Sample B		
Dil	Expected ng/ml	Measured ng/ml	Dil	Expected ng/ml	Measured ng/ml
1/1	540,0	540,0	1/1	875,0	875,0
1/2	270,0	266,0	1/2	438,0	440,0
1/4	135,0	115,0	1/4	219,0	183,0
1/8	68,0	62,0	1/8	109,0	79,0
1/16	34,0	37,0	1/16	55,0	46,1
1/32	17,0	25,3	1/32	27,0	31,1

Compound	IGF-1 concentration before addition of interferent (ng/ml)	Interferent added concentration (mg/dl)	IGF-1 concentration after addition of interferent	Mean variation (%)
Haemoglobin	320.2	500	316.0	8.4
		250	274.2	
	100.7	500	85.8	
		250	103.9	
Bilirubin	320.2	100	347.6	7.2
		50	316.3	
	100.7	100	105.2	
		50	115.3	
Triglyceride	320.2	2500	392.0	7.0
		1250	320.0	
	100.7	2500	103.9	
		1250	98.6	

C. Precision

Intra assay				Inter assay			
Sample	n	$\bar{x} \pm \text{sd}$ ng/ml	cv %	Sample	n	$\bar{x} \pm \text{sd}$ ng/ml	cv %
A	20	159,2 ± 12,3	7,7	C	10	124,4 ± 7,5	6,1
B	20	140,6 ± 9,7	6,9	D	10	187,4 ± 14,0	7,5

D. Accuracy

Sample (ng)	Added IGF-1 (ng)	Expected (ng/ml)	Measured (ng/ml)	Recovery (%)
1	15	45	51	112.5
1	30	60	60	99.5
1	100	151	130	86.4
1	250	280	290	103.5

Sample (ng)	Added IGF-1 (ng)	Expected (ng/ml)	Measured (ng/ml)	Recovery (%)
2	15	47	49	106
2	30	62	58	94.0
2	100	150	123	82.6
2	250	282	281	99.8

Sample A			Sample B		
Dil	Expected ng/ml	Measured ng/ml	Dil	Expected ng/ml	Measured ng/ml
1/1	478.8	478.8	1/1	490.4	490.4
1/2	239.4	214.0	1/2	245.2	184.0
1/4	119.7	114.5	1/4	122.6	108.3
1/8	59.8	59.2	1/8	61.3	55.4
1/16	29.9	34.7	1/16	30.7	29.7
1/32	15.0	18.6	1/32	15.3	18.3

Read entire protocol before use.

IGF1-ELISA

I. INTENDED USE

Immunoenzymetric assay for the *in vitro* quantitative measurement of human Insulin-like Growth Factor-I (IGF-I) in serum.

II. GENERAL INFORMATION

- A. **Proprietary name:** DIAsource IGF1-ELISA Kit
- B. **Catalogue number:** KAP1581: 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

Insulin-like growth factor I (IGF-I) 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-I). IGF-I 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-I 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-I, are regulated by growth hormone. IGF-I 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-I 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-I secretion in the local microenvironment of a particular organ (paracrine activities), while blood IGF-I 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 IGF-I 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-I 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-I 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 I values despite normal GH levels by conventional testing. The results of IGF-I assay must be interpreted cautiously by considering the normal variations of IGF-I during childhood and adolescence (see Rosenfeld et al).

Acromegaly: IGF-I 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-I measurements are also useful to monitor treatment.

Research: The IGF-I ELISA 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-I 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


The DIIAsource IGF1-ELISA is a solid phase Enzyme Amplified Sensitivity Immunoassay performed on polystyrene microtiterplates.

In the present kit, DIIAsource 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 ELISA assay for IGF1. The pre-treatment step used by DIIAsource is the acid-ethanol procedure of Daughaday et al.(8)

A fixed amount of IGF1-labelled with horseradish peroxidase (HRP), compete with unlabelled IGF1 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 IGF1 concentration.

A calibration curve is plotted and IGF1 concentration in samples is determined by interpolation from the calibration curve.

V. REAGENTS PROVIDED

Reagents	96 tests Kit	Reconstitution			
 Microtiterplate with 96 anti IGF1 coated wells	96 wells	Ready for use			
<table border="1" data-bbox="60 801 255 840"> <tr> <td>Ag</td> <td>HRP</td> <td>CONC</td> </tr> </table> Conjugate: HRP labelled IGF1 in phosphate buffer with caseine and thymol	Ag	HRP	CONC	1 vial 0.2 ml	Dilute 100 x with conjugate buffer
Ag	HRP	CONC			
<table border="1" data-bbox="60 929 191 967"> <tr> <td>CONJ</td> <td>BUF</td> </tr> </table> Conjugate buffer: Phosphate buffer with caseine and thymol	CONJ	BUF	1 vial 13 ml	Ready for use	
CONJ	BUF				
<table border="1" data-bbox="60 1034 191 1072"> <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="60 1140 191 1178"> <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="60 1245 231 1283"> <tr> <td>NEUTR</td> <td>SOLN</td> </tr> </table> Neutralization Solution containing phosphate buffer with bovine casein	NEUTR	SOLN	1 vial 30 ml	Ready for use	
NEUTR	SOLN				
<table border="1" data-bbox="60 1350 231 1388"> <tr> <td>CAL</td> <td>0</td> </tr> </table> Zero calibrator in phosphate buffer with ovalbumin and gentamycin	CAL	0	1 vial 1 ml	Ready for use	
CAL	0				
<table border="1" data-bbox="60 1456 231 1494"> <tr> <td>CAL</td> <td>N</td> </tr> </table> Calibrators - N = 1 to 5 in phosphate buffer with ovalbumin and gentamycin. (see exact values on vial labels)	CAL	N	5 vials lyophilized	Add 1 ml reconstitution solution	
CAL	N				
<table border="1" data-bbox="60 1606 215 1644"> <tr> <td>CONTROL</td> <td>N</td> </tr> </table> Controls - N = 1 or 2 in human plasma with thymol	CONTROL	N	2 vials lyophilized	Add 1 ml distilled water	
CONTROL	N				
<table border="1" data-bbox="60 1711 279 1749"> <tr> <td>WASH</td> <td>SOLN</td> <td>CONC</td> </tr> </table> Wash Solution (Tris-HCl)	WASH	SOLN	CONC	1 vial 10 ml	Dilute 200 x with distilled water (use a magnetic stirrer).
WASH	SOLN	CONC			
<table border="1" data-bbox="60 1783 207 1821"> <tr> <td>CHROM</td> <td>TMB</td> </tr> </table> Chromogenic TMB Solution (Tetramethylbenzidine)	CHROM	TMB	2 vials 13 ml	Ready for use	
CHROM	TMB				
<table border="1" data-bbox="60 1888 199 1926"> <tr> <td>STOP</td> <td>SOLN</td> </tr> </table> Stop solution: 0.2M H ₂ SO ₄	STOP	SOLN	1 vial 13 ml	Ready for use	
STOP	SOLN				

- Note:** 1. Use the zero calibrator for sample dilutions.
2. 1 ng of the calibrator preparation is equivalent to 1 ng of the NIBSC 1stWHO IS 02/254.

VI. SUPPLIES NOT PROVIDED

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

- High quality distilled water
- Pipettes for delivery of: 50 µl, 100 µl, 400 µl, 500 µl, 600 µl and 1 ml (the use of accurate pipettes with disposable plastic tips is recommended)
- Optional: microcentrifuge tubes in polypropylene for pre-treatment of samples (for example: Eppendorf 3810)
- Polypropylene tubes for neutralization step (for example: Falcon 352063)
- Vortex mixer
- Magnetic stirrer
- Microcentrifuge or Centrifuge
- Washer for microtiterplates
- Horizontal microtiterplate shaker capable of 500 rpm
- Microtiterplate reader capable of reading at 450 nm and 650 nm (monochromatic reading)

VII. REAGENT PREPARATION

A. Calibrators: Reconstitute the calibrators with 1 ml reconstitution solution.

B. Controls: Reconstitute the controls with 1 ml distilled water.

C. Working IGF1-HRP conjugate: Prepare an adequate volume of conjugate solution by adding for example: 20 µl of the 100 x concentrated IGF1-HRP conjugate to 2 ml of conjugate buffer. Use a vortex to homogenize. Extemporaneous preparation is recommended.

D. Working Wash solution: Prepare an adequate volume of Working Wash solution by adding 199 volumes of distilled water to 1 volume of Wash Solution (200x). 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 vial label, if kept at 2 to 8°C.
- Unused strips must be stored, at 2-8°C, in a sealed bag containing a desiccant until expiration date.
- 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.
- The concentrated Wash Solution is stable at room temperature until expiration date.
- Freshly prepared Working Wash solution should be used on the same day.
- The Working IGF1-HRP conjugate is stable for 4 hours at room temperature, avoid direct sunlight.
- Alterations in physical appearance of kit reagents may indicate instability or deterioration.

IX. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

- Serum must be kept at 2 - 8°C.
- If the test is not run within 24 hours, storage in aliquots at -20°C is recommended. Avoid subsequent freeze thaw cycles.
- Prior to use, all samples should be at room temperature. It is recommended to vortex the samples before use.
- Do not use haemolysed samples.

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. Perform calibrators, controls and samples in duplicate. Vertical alignment is recommended.

Use a clean plastic container to prepare the Wash Solution.

In order to avoid cross-contamination, use a clean disposable pipette tip for the addition of each reagent and sample.

For the dispensing of the Chromogenic Solution and the Stop Solution avoid pipettes with metal parts.

High precision pipettes or automated pipetting equipment will improve the precision.

Respect the incubation times.

To avoid drift, the time between pipetting of the first calibrator and the last sample must be limited to the time mentioned in section XIII paragraph E (Time delay).

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

Dispense the Chromogenic Solution within 15 minutes following the washing of the microtiterplate.

During incubation with Chromogenic Solution, avoid direct sunlight on the microtiterplate.

B.1. Pre-treatment step for microfuge tubes

! Do not extract calibrators

1. Label one microcentrifuge tube (for extraction) and one polypropylene tube (for neutralization) for each sample and control. Dispense 100 µl of each sample and control into microfuge tube.
2. Add 400 µl of pre-treatment solution into this tube.
3. Close the tubes, vortex and incubate 30 minutes at room temperature.
4. Centrifuge for 2 minutes at 10000 rpm.
5. Take 100 µl of the supernatant and transfer it into the polypropylene labelled tube.
6. Add 600 µl of the neutralisation solution to this tube.
7. Vortex each tube.

B.2. Pre-treatment step for other polypropylene tubes

! Do not extract calibrators

1. Label two polypropylene tubes (one for extraction and the other for neutralization) for each sample and control.
2. Dispense 100 µl of each sample and control into extraction tube.
3. Add 400 µl of pre-treatment solution into this tube.
4. Close the tubes, vortex and incubate 30 minutes at room temperature.
5. Centrifuge for 15 minutes at > or = 3000 rpm.
6. Take 100 µl of the supernatant and transfer it into the polypropylene labelled tube.
7. Add 600 µl of the neutralisation solution to this tube.
8. Vortex each tube.

C. Procedure

1. Select the required number of wells for the run. The unused wells should be resealed in the bag with a desiccant and stored at 2-8°C.
2. Secure the wells into the holding frame.
3. Pipette 50 µl of each Calibrator, extracted control and extracted sample into the appropriate wells.
4. Pipette 100 µl of IGF1-HRP conjugate solution into all the wells.
5. Incubate for 1 hour at room temperature on a shaker at 500 rpm.
6. Aspirate the liquid from each well.
7. Wash the plate 3 times by:
 - dispensing 0.4 ml of Wash Solution into each well
 - aspirating the content of each well
8. Pipette 200 µl of the Chromogenic solution into each well within 15 minutes following the washing step.
9. Incubate the microtiterplate for 15 minutes at room temperature on the shaker (500 rpm), avoid direct sunlight
10. Pipette 100 µl of Stop Solution into each well.
11. Read the absorbances at 450 nm (reference filter 630 nm or 650 nm) within 1 hour and calculate the results as described in section XI

XI. CALCULATION OF RESULTS

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

$$B/B0 (\%) = \frac{OD (\text{Calibrator, Control or Sample})}{OD (\text{Zero Calibrator})} \times 100$$

4. Using either linear-linear or semi-logarithmic graph paper, plot the (B/B0(%)) values for each calibrator point as a function of the IGF1 concentration of each calibrator point. Reject obvious outliers.
5. 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 IGF1 concentrations of the samples from the calibration curve.

XII. TYPICAL DATA

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

Calibrators	ng/ml	OD units
S0	0.0	2.841
S1	18.0	2.560
S2	28.6	2.269
S3	56.0	1.820
S4	154.0	1.091
S5	643.0	0.494

XIII. PERFORMANCE AND LIMITATIONS

A. Detection Limit

The LoB (Limit of Blank) was calculated by measuring the blank 20 times and was calculated as the mean - 1.65 standard deviations of the distribution of these values. The LoB was calculated to be 4.0 ng/ml.

B. Specificity

B1. Cross-reaction

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

Compound	Cross reactivity %
IGF-II	0.09
Insuline	ND
GH	ND

B2. Interferences

The effect of potential interfering substances on samples using the DIAsource IGF-1-ELISA kit was evaluated. Different levels of Haemoglobin, Bilirubin, Triglyceride were tested on samples with different IGF-1 concentrations. Our acceptance criteria was to have interference of less than 10%.

Hemolyzed and icteric samples have to be avoided. However, there is no restriction for the measurement of lipemic samples.

Compound	IGF-1 concentration before addition of interferent (ng/ml)	Interferant added concentration (mg/dl)	IGF-1 concentration after addition of interferent	Mean variation (%)
Haemoglobin	320.2	500	316.0	8.4
		250	274.2	
		500	85.8	
Bilirubin	100.7	250	103.9	7.2
		100	347.6	
		50	316.3	
Triglyceride	320.2	100	105.2	7.0
		50	115.3	
		2500	392.0	
	100.7	1250	320.0	7.0
		2500	103.9	
		1250	98.6	

C. Precision

Intra assay				Inter assay			
Sample	n	x ± sd ng/ml	cv %	Sample	n	x ± sd ng/ml	cv %
A	20	159.2 ± 12.3	7.7	C	10	124.4 ± 7.5	6.1
B	20	140.6 ± 9.7	6.9	D	10	187.4 ± 14.0	7.5

D. Accuracy

RECOVERY TEST

Sample (ng)	Added IGF-1 (ng)	Expected (ng/ml)	Measured (ng/ml)	Recovery (%)
1	15	45	51	112.5
1	30	60	60	99.5
1	100	151	130	86.4
1	250	280	290	103.5

Sample (ng)	Added IGF-1 (ng)	Expected (ng/ml)	Measured (ng/ml)	Recovery (%)
2	15	47	49	106
2	30	62	58	94.0
2	100	150	123	82.6
2	250	282	281	99.8

DILUTION TEST

Sample A			Sample B		
Dil	Expected ng/ml	Measured ng/ml	Dil	Expected ng/ml	Measured ng/ml
1/1	478.8	478.8	1/1	490.4	490.4
1/2	239.4	214.0	1/2	245.2	184.0
1/4	119.7	114.5	1/4	122.6	108.3
1/8	59.8	59.2	1/8	61.3	55.4
1/16	29.9	34.7	1/16	30.7	29.7
1/32	15.0	18.6	1/32	15.3	18.3

Samples were diluted after extraction with zero calibrator

Conversion factor:

From ng/ml to nmol/L: x 0.13
From nmol/L to ng/ml: x 7.65

E. Time delay between last calibrator and sample dispensing

As shown hereafter, assay results remain accurate even when a sample is dispensed 30 minutes after the calibrators have been added to the coated wells.

Time delay	
0 minute	30 minutes
994,0 ng/ml	1057,0 ng/ml
458,0 ng/ml	476,0 ng/ml

XIV. INTERNAL QUALITY CONTROL

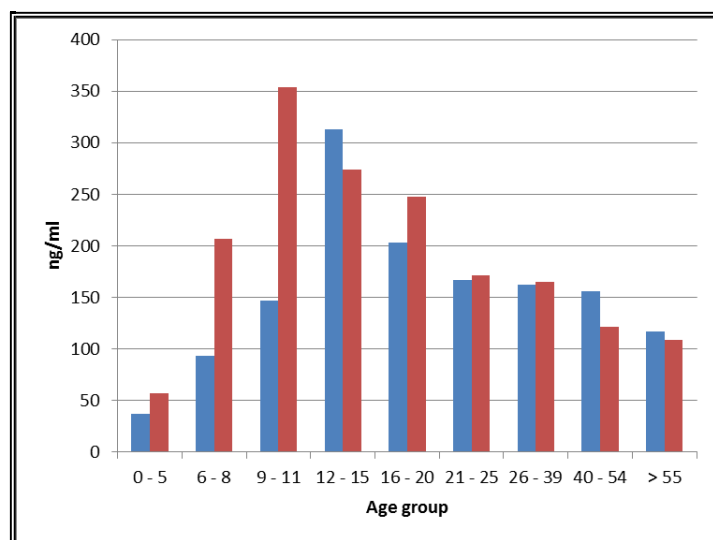
- If the results obtained for Control 1 and/or Control 2 are not within the range specified on the vial label, the results cannot be used unless a satisfactory explanation for the discrepancy has been given.
- If desirable, each laboratory can make its own pools of control samples, which should be kept frozen in aliquots. Controls which contain azide will interfere with the enzymatic reaction and cannot be used.
- Acceptance criteria for the difference between the duplicate results of the samples should rely on Good Laboratory Practises.
- It is recommended that Controls be routinely assayed as unknown samples to measure assay variability. The performance of the assay should be monitored with quality control charts of the controls.
- It is good practise to check visually the curve fit selected by the computer.

XV. REFERENCE INTERVALS

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

Age group (years)	Males (ng/ml)			Females (ng/ml)		
	n	Median	Range	n	Median	Range
0 - 5	30	37	14 - 154	50	57	21 - 262
6 - 8	20	93	45 - 213	18	207	89 - 485
9 - 11	20	147	53 - 453	19	354	99 - 708
12 - 15	24	313	103 - 753	31	274	100 - 744
16 - 20	30	203	99 - 655	29	248	73 - 522
21 - 25	9	167	115 - 304	9	171	83 - 511
26 - 39	24	162	87 - 415	20	165	101 - 267
40 - 54	35	156	69 - 343	17	121	60 - 271
> 55	25	117	33 - 232	14	109	69 - 189

These ranges are expressed as 2.5% to 97.5% percentiles.



XVI. PRECAUTIONS AND WARNINGS

Safety

For *in vitro* diagnostic use only.

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 all reagents, Stop Solution contains H₂SO₄. In case of contact, wash thoroughly with water.

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

	CALIBRATORS µl	SAMPLE(S) CONTROLS µl
PRE-TREATMENT		
Samples, controls	-	100
Pre-treatment solution	-	400
Incubation	30 minutes RT	
Centrifugation	2 minutes at 10000 rpm (microfuge tubes) or 15 minutes at > or = 3000 rpm (polypropylene tubes)	
Supernatant	-	100
Neutralization Solution	-	600
Shaking	Vortex	
INCUBATION		
Calibrators (0 to 5)	50	-
Pre-treated Samples, controls	-	50
Diluted Conjugate	100	100
Incubate for 1 hour at room temperature on a shaker at 500 rpm. Aspirate the contents of each well. Wash 3 times with 400 µl of Wash Solution and aspirate.		
Chromogenic Solution	200	200
Incubate for 15 min at room temperature on a shaker at 500 rpm		
Stop Solution	100	100
Read on a microtiterplate reader and record the absorbance of each well at 450 nm (versus 630 or 650 nm)		

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

DIAsource Catalogue Nr: KAP1581	Revision nr: 220516
------------------------------------	------------------------

Revision date: 16/05/2022

Leer todo el protocolo antes de utilizar.

IGF1-ELISA

I. USO PREVISTO

Ensayo inmunoenzimático para la medición cuantitativa *in vitro* del factor de crecimiento insulínico tipo I (IGF-I) en suero.

II. INFORMACIÓN GENERAL

- A. **Nombre registrado:** DIAsource IGF1-ELISA Kit
- B. **Número de catálogo:** KAP1581: 96 pruebas
- C. **Fabricado por:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Bélgica.

Para obtener asistencia técnica o información sobre pedidos póngase en contacto con:
Teléfono: +32 (0)10 84.99.11 **Fax: +32 (0)10 84.99.91**

III. ANTECEDENTES CLÍNICOS

A. Actividad biológica

El factor de crecimiento insulínico tipo I (IGF-I) o Somatomedina-C (SM-C) es un polipéptido básico de una sola cadena de 70 amino ácidos (PM: 7649 Da) similar a la proinsulina (50% de secuencia homóloga), y al otro miembro de la familia de la somatomedina que ha sido bien caracterizado: IGF II (67AA, 70 % de secuencia homóloga con IGF-I). IGF-I es el factor más importante en la mediación de las acciones que promueven el crecimiento por la hormona del crecimiento, una hormona pituitaria con valores sanguíneos con grandes fluctuaciones debido a la liberación pulsátil. La concentración sanguínea de IGF-I es más estable debido a que se une a las proteínas transportadoras. La concentración de la proteína de unión predominante (PM 53000) así como la producción de IGF-I, son reguladas por la hormona del crecimiento (GH). IGF-I se produce en el hígado y otros tejidos y tiene actividad endocrina, paracrina y autocrina. Estimula el crecimiento y regula la diferenciación de varios tejidos, presenta actividades tipo insulina y estimula el crecimiento del cartílago. Aunque la hormona del crecimiento es el factor más importante en el control de la secreción y la concentración de IGF-I, otros factores también son determinantes: la edad (con un pico en la adolescencia), el sexo, el estado nutricional y otras hormonas (estrógeno, tiroxina, prolactina, ...). Los estímulos tróficos específicos principalmente controlan la secreción de IGF-I en el micro ambiente local de un órgano específico (actividades paracrinas), mientras que la concentración sanguínea de IGF-I es la variable más importante para el crecimiento sistémico equilibrado (actividades endocrinas).

B. Aplicaciones clínicas

Retardo del crecimiento: El retardo del crecimiento puede deberse a varias causas, entre las cuales la producción deficiente de GH (hipopituitarismo), que está asociada con niveles sanguíneos bajos de IGF-I. Debido a las dificultades para obtener resultados que puedan interpretarse a partir de mediciones de GH (con pruebas dinámicas múltiples o de estimulación), la determinación de la concentración de IGF-I estable en plasma, a menudo se considera una prueba de detección simple para evaluar la "impregnación de la GH" en el paciente antes de decidir hacer investigaciones más exhaustivas. En varias situaciones clínicas con crecimiento retardado, se observan niveles bajos de IGF-I, no obstante la producción de GH es normal o elevada (p. ej. desnutrición, estados de enfermedades crónicas, algunos enanos por genética como los pigmeos, ...). Es interesante notar que menores con una disfunción neuro secretora individual de la GH, pueden presentar valores bajos de IGF-I a pesar de tener valores normales de GH en pruebas convencionales. Los resultados del ensayo IGF-I deben interpretarse con precaución tomando en cuenta las variaciones normales de IGF-I durante la niñez y la adolescencia (ver Rosenfeld et al).

Acromegalia: Los niveles de IGF-I están aumentados en la acromegalia (producción excesiva de GH) y pueden servir como un indicador de la gravedad de la enfermedad. Los resultados son más fáciles de interpretar porque los valores normales están definidos con mayor facilidad en adultos. La medición de IGF-I también es útil para controlar tratamientos.

Investigación: El kit IGF-I ELISA es una herramienta invaluable para estudiar las modificaciones de este factor del crecimiento durante situaciones fisiológicas (p. ej. embarazo) o patológicas (p. ej. diabetes) y la regulación local de la producción de IGF-I en relación a su actividad paracrina y autocrina (cicatrización de heridas, regeneración de órganos, crecimiento neoplásico, desarrollo fetal, regulación gonadal, etc.).

IV. PRINCIPIOS DEL MÉTODO


El DIAsource IGF1-ELISA es un inmunoensayo enzimático de sensibilidad amplificada en fase sólida realizado en microplacas de poliestireno.

En el kit actual, DIAsource ha introducido un paso de tratamiento previo para mejorar el rendimiento clínico del ensayo. Se ha establecido con claridad que las proteínas de unión interfieren con el ensayo ELISA para IGF1. El tratamiento previo utilizado por DIAsource es el procedimiento ácido-etanol de Daughaday et al. (8)

Una cantidad fija de IGF1 marcada con peroxidasa de rábano picante (HRP), compete, con IGF1 no marcada presente en los calibradores o las muestras, por un número limitado de sitios de unión de un anticuerpo específico. Después de una hora de incubación a temperatura ambiente, la placa se lava para detener la reacción competitiva. Se añade la solución cromogénica (TMB) y se incuba 15 min. La reacción se detiene añadiendo solución de parada y luego la microplaca se lee a la longitud de onda apropiada. La cantidad de sustrato utilizado se determina en forma colorimétrica midiendo la absorbancia, que es inversamente proporcional a la concentración de IGF1.

Se dibuja una curva de calibración y la concentración de IGF1 en las muestras se determina por interpolación a partir de la curva de calibración.

V. REACTIVOS SUMINISTRADOS

Reactivos	96 pruebas Kit	Reconstitución			
 Microplaca con 96 pocillos recubiertos con anti IGF1	96 pocillos	Listo para usar			
<table border="1" data-bbox="60 846 256 880"><tr><td>Ag</td><td>HRP</td><td>CONC</td></tr></table> Conjugado: IGF1 marcada con HRP en tampón de fosfato con caseína y timol	Ag	HRP	CONC	1 vial 0,2 ml	Diluir 100 x con tampón del conjugado
Ag	HRP	CONC			
<table border="1" data-bbox="60 969 193 1003"><tr><td>CONJ</td><td>BUF</td></tr></table> Tapón del conjugado: Tampón de fosfato con caseína y timol	CONJ	BUF	1 vial 13 ml	Listo para usar	
CONJ	BUF				
<table border="1" data-bbox="60 1077 193 1111"><tr><td>PRE</td><td>SOLN</td></tr></table> Solución de tratamiento previo que contiene etanol	PRE	SOLN	1 vial 20 ml	Listo para usar	
PRE	SOLN				
<table border="1" data-bbox="60 1200 193 1234"><tr><td>REC</td><td>SOLN</td></tr></table> Solución de reconstitución que contiene etanol	REC	SOLN	1 vial 10 ml	Listo para usar	
REC	SOLN				
<table border="1" data-bbox="60 1308 233 1341"><tr><td>NEUTR</td><td>SOLN</td></tr></table> Solución neutralizante que contiene tampón de fosfato con caseína bovina	NEUTR	SOLN	1 vial 30 ml	Listo para usar	
NEUTR	SOLN				
<table border="1" data-bbox="60 1435 233 1469"><tr><td>CAL</td><td>0</td></tr></table> Calibrador cero en tampón fosfato con ovoalbúmina y gentamicina	CAL	0	1 vial 1 ml	Listo para usar	
CAL	0				
<table border="1" data-bbox="60 1541 233 1574"><tr><td>CAL</td><td>N</td></tr></table> Calibradores - N = 1 al 5 en tampón fosfato con ovoalbúmina y gentamicina. (Ver valores exactos en las etiquetas de los viales)	CAL	N	5 viales liofilizados	Añadir 1 ml de solución de reconstitución	
CAL	N				
<table border="1" data-bbox="60 1709 212 1742"><tr><td>CONTROL</td><td>N</td></tr></table> Controles - N = 1 o 2 en plasma humano con timol	CONTROL	N	2 viales liofilizados	Añadir 1 ml de agua destilada	
CONTROL	N				
<table border="1" data-bbox="60 1803 284 1836"><tr><td>WASH</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table> Solución de lavado (Tris-HCl)	WASH	SOLN	CONC	1 vial 10 ml	Diluir 200 x con agua destilada (utilizando un agitador magnético).
WASH	SOLN	CONC			
<table border="1" data-bbox="60 1895 212 1928"><tr><td>CHROM</td><td>TMB</td></tr></table> Solución cromogénica TMB (Tetrametilbencidina)	CHROM	TMB	2 viales 13 ml	Listo para usar	
CHROM	TMB				
<table border="1" data-bbox="60 2000 212 2033"><tr><td>STOP</td><td>SOLN</td></tr></table> Solución de parada: 0,2M H ₂ SO ₄	STOP	SOLN	1 vial 13 ml	Listo para usar	
STOP	SOLN				

Nota: 1. Utilizar el calibrador cero para diluir muestras.

2. 1 ng de la preparación del calibrador es equivalente a 1 ng del NIBSC 1st WHO IS 02/254.

VI. MATERIALES NO SUMINISTRADOS

Los siguientes materiales son necesarios pero no son suministrados por el kit:

1. Agua destilada de alta calidad
2. Pipetas para dispensar: 50 µl, 100 µl, 400 µl, 500 µl, 600 µl y 1 ml (se recomienda utilizar pipetas precisas con puntas plásticas desechables)
3. Opcional: los microtubos para centrifuga en polipropileno para tratamiento previo de las muestras (p. ej.: Eppendorf 3810)
4. Tubos de polipropileno para el paso de neutralización (p. ej.: Falcon 352063)
5. Agitador Vortex
6. Agitador magnético
7. Micro centrifuga o centrifuga
8. Lavadora de microplacas
9. Agitador de microplacas horizontal a 500 rpm
10. Lector de microplacas que pueda leer a 450 nm y 650 nm (lectura bi cromática)

VII. PREPARACIÓN DE REACTIVOS

A. Calibradores: Reconstituir los calibradores con 1 ml de solución de reconstitución.

B. Controles: Reconstituir los controles con 1 ml de agua destilada.

C. Conjugado IGF1-HRP de trabajo: Prepare un volumen adecuado de solución d conjugado añadiendo por ejemplo: 20 µl del conjugado IGF-HRP concentrado x 100 a 2 ml de tampón del conjugado. Utilizar un agitador Vortex para homogenizar. Se recomienda preparar inmediatamente antes de utilizar.

D. Solución de lavado de trabajo: Prepare un volumen adecuado de solución de lavado de trabajo añadiendo 199 volúmenes de agua destilada a 1 volumen de solución de lavado (200x). Utilice un agitador magnético para homogenizar. Elimine la solución de lavado de trabajo no utilizada al finalizar el día.

VIII. ALMACENAJE Y FECHA DE CADUCIDAD DE LOS REACTIVOS

- Antes de abrirlos o reconstituirlos todos los componentes de los kits son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del vial, si se mantienen a 2 a 8°C.
- Los pocillos no utilizados se deben almacenar a 2-8°C, en una bolsa sellada que contiene el desecante, hasta la fecha de caducidad.
- Después de reconstituir, los calibradores y controles son estables por una semana a 2 a 8°C. Para periodos de almacenaje prolongados, se deben preparar alícuotas almacenadas a -20°C por un máximo de 3 meses. Evitar ciclos de congelación y descongelación sucesivos.
- La solución de lavado concentrada es estable a temperatura ambiente hasta la fecha de caducidad.
- La solución de lavado recién preparada, se debe utilizar el mismo día.
- El conjugado IGF1-HRP de trabajo es estable por 4 horas a temperatura ambiente, evitar luz solar directa.
- Alteraciones de la apariencia física de los reactivos del kit pueden indicar inestabilidad o deterioro.

IX. TOMA DE LA MUESTRA Y PREPARACIÓN

- El suero debe mantenerse a 2 - 8°C.
- Si la prueba no se realiza dentro de las 24 horas, se recomienda almacenar en alícuotas a -20°C. Evitar ciclos de congelación y descongelación sucesivos.
- Ante de utilizarlas, todas las muestras deben estar a temperatura ambiente. Se recomienda agita las muestras en un Vortex antes del uso.
- No utilizar muestras hemolizadas.

X. PROCEDIMIENTO

A. Notas sobre el manejo

No utilizar los componentes del kit después de la fecha de caducidad. No mezclar materiales de kits de diferentes lotes.

Dejar que todos los reactivos alcancen temperatura ambiente antes de utilizar.

Mezclar muy bien todos los reactivos y muestras agitando o girando suavemente.

Analizar los calibradores, controles y muestras en duplicado. Se recomienda la alineación vertical.

Utilizar un contenedor de plástico limpio para preparar la solución de lavado

Para evitar contaminación cruzada utilizar una punta de pipeta desechable limpia para añadir cada reactivo y muestra.

Para dispensar la solución cromogénica y la solución de parada, evitar utilizar pipetas con partes metálicas.

Pipetas de alta precisión o equipo para dispensación automática mejorarán la precisión.

Adherirse a los tiempos de incubación.

Para evitar deriva, el periodo de transcurrido entre el pipeteo del primer calibrador y la última muestra se debe limitar al tiempo mencionado en la sección XIII párrafo E (Lapso de tiempo).

Preparar la curva de calibración para cada ensayo, no utilizar los datos de ensayos previos.

Dispensar la Solución Cromogénica dentro de los 15 minutos posteriores al lavado de las microplacas.

Durante la incubación con la solución cromogénica, evitar la luz solar directa sobre la microplaca.

B.1. Paso de tratamiento previo para tubos microfuge

! No extraer los calibradores

1. Etiquetar un tubo para micro centrifuga (para extracción) y un tubo de polipropileno (para neutralización) para cada muestra y control.
2. Dispensar 100 µl de cada muestra y control en el tubo microfuge.
3. Añadir 400 µl de solución de tratamiento previo en ese tubo.
4. Tapar los tubos, agitar en Vortex e incubar 30 minutos a temperatura ambiente.
5. Centrifugar 2 minutos a 10000 rpm.
6. Extraer 100 µl del sobrenadante y transferir al tubo de polipropileno etiquetado.
7. Añadir 600 µl de la solución neutralizante en este tubo.
8. Agitar cada tubo en un Vortex.

B.2. Paso de tratamiento previo para otros tubos de polipropileno

! No extraer los calibradores

1. Etiquetar dos tubos de polipropileno (uno para extracción y otro para neutralización) para cada muestra y control.
2. Dispensar 100 µl de cada muestra y control en el tubo de extracción.
3. Añadir 400 µl de solución de tratamiento previo en ese tubo.
4. Tapar los tubos, agitar en Vortex e incubar 30 minutos a temperatura ambiente.
5. Centrifugar 15 minutos a $\omega = 3000$ rpm.
6. Extraer 100 µl del sobrenadante y transferir al tubo de polipropileno etiquetado.
7. Añadir 600 µl de la solución neutralizante en este tubo.
8. Agitar cada tubo en un Vortex.

C. Procedimiento

1. Seleccionar el número requerido de pocillos para el ensayo. Las tiras no utilizadas deben sellarse en la bolsa con un desecante y almacenadas a 2- 8°C.
2. Fijar las tiras en el marco de sostén.
3. Pipetear 50 µl de cada calibrador, control extraído y muestra extraída en el pocillo correspondiente
4. Pipetear 100 µl de solución del conjugado IGF1-HRP en todos los pocillos.
5. Incubar 1 hora a temperatura ambiente en un agitador a 500 rpm.
6. Aspirar el líquido de cada pocillo.
7. Lavar la placa 3 veces:
 - dispensando 0,4 ml de solución de lavado en cada pocillo
 - aspirando el contenido de cada pocillo
8. Pipetear 200 µl de solución cromogénica en cada pocillo dentro de 15 minutos después del paso de lavado.
9. Incubar la microplaca durante 15 minutos a temperatura ambiente en el agitador (500 rpm), evitar la luz solar directa
10. Pipetear 100 µl de solución de parada en cada pocillo.
11. Leer las absorbancias a 450 nm (filtro de referencia 630 nm o 650 nm) en 1 hora y calcular los resultados como se ha descrito en la sección XI.

XI. CÁLCULO DE RESULTADOS

1. Leer la placa a 450 nm contra un filtro de referencia a 650 nm (o 630 nm).
2. Calcular la media de los duplicados.
3. Calcular para cada calibrador, control y muestra:

$$B/B0 (\%) = \frac{DO (\text{Calibrador, Control o Muestra})}{DO (\text{Calibrador cero})} \times 100$$

4. Utilizando papel de gráfico semi logarítmico lineal-lineal dibujar los valores (B/B0(%)) para cada punto de los calibradores como función de la concentración de IGF1 de cada punto de calibración. Eliminar los valores extremos.
5. El análisis de datos asistido por un ordenador también puede utilizarse para construir una curva de calibración. Si se utiliza un sistema de procesamiento automático, se recomienda el ajuste de la curva dada por la función logística de 4 parámetros.

Interpolando los valores (B/B0 (%)) de la muestra, determinar la concentración IGF1 de las muestras de la curva de calibración

XII. DATOS TÍPICOS

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

Calibradores	ng/ml	Unidades DO
S0	0.0	2.841
S1	18.0	2.560
S2	28.6	2.269
S3	56.0	1.820
S4	154.0	1.091
S5	643.0	0.494

XIII. RENDIMIENTO Y LIMITACIONES

A. Límite de detección

El LoB (Límite de blanco) se calculó midiendo el blanco 20 veces y se calculó como la media - 1.65 desviaciones estándar de la distribución de estos valores. El LoB se calculó en 4.0 ng / ml.

B. Especificidad

B1. Reacción cruzada

Los porcentajes de reacción cruzada estimada en comparación con la concentración que produce un 50% de inhibición son respectivamente:

Compuesto	Reacción cruzada %
IGF-II	0,09
Insulina	ND
GH	ND

B2 Interferencias

Se evaluó el efecto de posibles sustancias interferentes en las muestras que utilizan el kit DIAsource IGF-1-ELISA. Se probaron diferentes niveles de hemoglobina, bilirrubina, triglicéridos en muestras con diferentes concentraciones de IGF-1. Nuestro criterio de aceptación fue tener una interferencia de menos del 10%.

Se deben evitar las muestras hemolizadas e ictericas. Sin embargo, no hay restricción para la medición de muestras lipémicas.

Compuesta	Concentración de IGF-1 antes de la adición de interferente (ng / ml)	Concentración agregada interferente (mg / dl)	Concentración de IGF-1 después de la adición de interferente	Variación media (%)
Hemoglobina	320.2	500	316.0	8.4
		250	274.2	
	100.7	500	85.8	
		250	103.9	
Bilirrubina	320.2	100	347.6	7.2
		50	316.3	
	100.7	100	105.2	
		50	115.3	
Triglicéridos	320.2	2500	392.0	7.0
		1250	320.0	
	100.7	2500	103.9	
		1250	98.6	

C. Precisión

Intra ensayo				Entre ensayos			
Muestra	n	$x \pm sd$ ng/ml	cv %	Muestra	n	$x \pm sd$ ng/ml	cv %
A	20	159.2 ± 12.3	7.7	C	10	124.4 ± 7.5	6.1
B	20	140.6 ± 9.7	6.9	D	10	187.4 ± 14.0	7.5

D. Exactitud

PRUEBA DE RECUPERACIÓN

Muestra (ng)	IGF-1 añadido (ng)	Esperado (ng/ml)	Medido (ng/ml)	Recuperación (%)
1	15	45	51	112.5
1	30	60	60	99.5
1	100	151	130	86.4
1	250	280	290	103.5

Muestra (ng)	IGF-1 añadido (ng)	Esperado (ng/ml)	Medido (ng/ml)	Recuperado (%)
2	15	47	49	106
2	30	62	58	94.0
2	100	150	123	82.6
2	250	282	281	99.8

PRUEBA DE DILUCIÓN

Muestra A			Muestra B		
Dil	Esperado ng/ml	Medido ng/ml	Dil	Esperado ng/ml	Medido ng/ml
1/1	478.8	478.8	1/1	490.4	490.4
1/2	239.4	214.0	1/2	245.2	184.0
1/4	119.7	114.5	1/4	122.6	108.3
1/8	59.8	59.2	1/8	61.3	55.4
1/16	29.9	34.7	1/16	30.7	29.7
1/32	15.0	18.6	1/32	15.3	18.3

Después de la extracción, las muestras se diluyeron con

calibrador cero Factor de conversión:

De ng/ml a nmol/l: x 0,13

De nmol/l a ng/ml: x 7,65

E. Lapso de tiempo entre la dispensación del último calibrador y la muestra

Como se muestra más adelante, los resultados del ensayo continúan siendo precisos aun cuando la muestra se añade 30 minutos después que los calibradores han sido añadidos a los pocillos recubiertos

Lapso de tiempo	
minuto 0	30 minutos
994,0 ng/ml	1057,0 ng/ml
458,0 ng/ml	476,0 ng/ml

XV. CONTROL DE CALIDAD INTERNO

- Si los resultados obtenidos para el Control 1 y/o Control 2 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 preparar sus propios grupos de muestras de control, las que deben almacenarse en alícuotas congeladas. Los controles que contienen azida interferirán con la reacción enzimática y no se deben utilizar.
- Los criterios de aceptación de las diferencias entre los resultados de los duplicados de las muestras deben depender de las Buenas Prácticas de Laboratorio

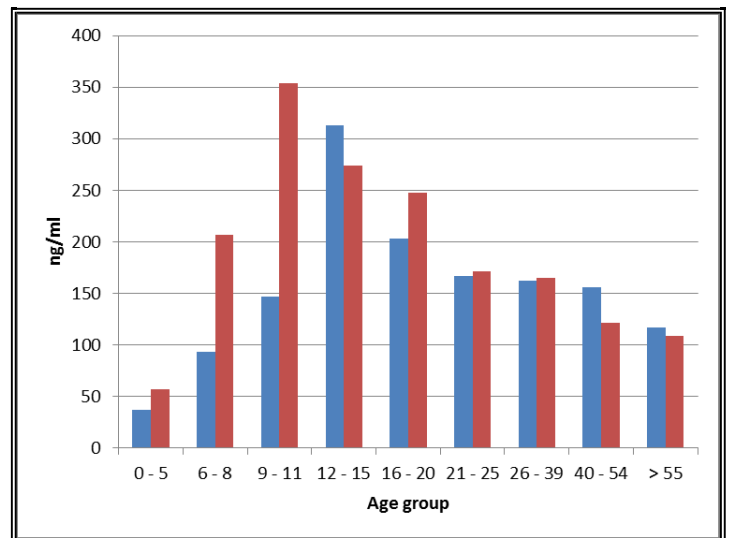
- Recomendamos que los controles sean incluidos rutinariamente en los ensayos como muestras desconocidas para medir la variabilidad del ensayo. El funcionamiento del ensayo debe ser controlado con gráficos de control de calidad de los controles
- Se considera como buena práctica controlar visualmente el ajuste de la curva seleccionada por el ordenador.

XIV. INTERVALOS DE REFERENCIA

Estos valores son solo una guía, cada laboratorio debe establecer su propio rango de valores normales.

Grupo etario (años)	n	Hombres (ng/ml)		n	Mujeres (ng/ml)	
		Mediana	Rango		Mediana	Rango
0 - 5	30	37	14 - 154	50	57	21 - 262
6 - 8	20	93	45 - 213	18	207	89 - 485
9 - 11	20	147	53 - 453	19	354	99 - 708
12 - 15	24	313	103 - 753	31	274	100 - 744
16 - 20	30	203	99 - 655	29	248	73 - 522
21 - 25	9	167	115 - 304	9	171	83 - 511
26 - 39	24	162	87 - 415	20	165	101 - 267
40 - 54	35	156	69 - 343	17	121	60 - 271
> 55	25	117	33 - 232	14	109	69 - 189

Estos rangos están expresados como percentiles 2,5% a 97,5%.



XVI. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

Seguridad

Solo para uso de diagnóstico *in vitro*.

Los componentes de sangre humana utilizados en este kit han sido analizados con métodos aprobados en Europa y/o la FDA resultando negativos para HBsAg, anti-VHC, anti-VIH-1 y 2. No se conoce ningún método que asegure que los derivados de la sangre humana no transmitan hepatitis, SIDA u otras infecciones. Por lo tanto el manejo de los reactivos y muestras de suero o plasma se hará de acuerdo con los procedimientos de seguridad locales.

Todos los productos animales y derivados de éstos, han sido obtenidos a partir de animales sanos. Componentes bovinos originales de países donde BSE no ha sido informado. Sin embargo, los componentes que contienen sustancias animales deberán ser considerados como potencialmente infecciosos.

Evitar contacto de la piel con todos los reactivos, la Solución de Parada contiene H₂SO₄. En caso de contacto, lavar con abundante agua. No fumar, beber, comer o utilizar cosméticos en el área de trabajo. No pipetear con la boca. Utilizar ropa de protección y guantes.

XVII. BIBLIOGRAFÍA

- 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.
- 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. RESUMEN DEL PROTOCOLO

	CALIBRADORES µl	MUESTRA(S) CONTROLES µl
TRATAMIENTO PREVIO		
Muestras, controles	-	100
Solución de tratamiento previo	-	400
Incubación	30 minutos TA	
Centrifugación	2 minutos a 10000 rpm (tubos microfuge) o 15 minutos a > o = 3000 rpm (tubos de polipropileno)	
Sobrenadante	-	100
Solución de neutralización	-	600
Agitación	Vortex	
INCUBACIÓN		
Calibradores (0 a 5)	50	-
Muestras con tratamiento previo, controles	-	50
Conjugado diluido	100	100
Incubar 1 hora a temperatura ambiente en un agitador a 500 rpm. Aspirar el contenido de cada pocillo. Lavar 3 veces con 400 µl de solución de lavado y aspirar.		
Solución cromogénica	200	200
Incubar 15 min a temperatura ambiente en un agitador a 500 rpm		
Solución de parada	100	100
Leer en un lector de microplaca y registrar la absorbancia de cada pocillo a 450 nm (versus 630 o 650 nm)		

DIASource Catálogo Nr: KAP1581	Revisión nr: 220516
-----------------------------------	------------------------

Fecha de revisión: 16/05/2022

Przed zastosowaniem należy przeczytać cały protokół.

IGF1-ELISA

I. PRZEZNACZENIE

Oznaczenie immunoenzymatyczne do ilościowego pomiaru *in vitro* ludzkiego insulinopochodnego czynnika wzrostu I (IGF-I) w surowicy.

II. INFORMACJE OGÓLNE

- A. Nazwa firmowa:** DIAsource IGF1-ELISA
- B. Numer katalogowy:** KAP1581: 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

Insulinopochodny czynnik wzrostu I (IGF-I) lub somatomedyna C (SM-C) jest jednołańcuchowym polipeptydem składającym się z 70 aminokwasów (masa cząsteczkowa: 7649) i przypomina proinsulinę (50% homologia sekwencji) oraz inną dobrze znaną somatomedynę: IGF-II (67 aminokwasów, 70% homologia sekwencji z IGF-I). IGF-I jest najważniejszym czynnikiem, który promuje działanie hormonu wzrostu, hormonu przysadkowego, który w związku z okresowym wydzielaniem charakteryzuje się dużymi wahaniami poziomów we krwi obwodowej. Stężenie IGF-I we krwi jest bardziej stabilne ze względu na wiązanie się z nośnikami białkowymi. Stężenie dominującego białka wiążącego (masa cząsteczkowa 53000) podobnie jak produkcja IGF-I są regulowane przez hormon wzrostu. IGF-I jest wytwarzany przez wątrobę i inne tkanki i ma właściwości endokrynowe, parakrynowe i autokrynowe. Stymuluje wzrost i ma wpływ na różnicowanie różnych tkanek, przejawia aktywność przypominającą insulinę i ułatwia wzrost chrząstki. Chociaż GH jest najważniejszym czynnikiem mającym wpływ na wydzielanie i stężenie IGF-I, inne czynniki są również istotne: wiek (szczytowe wartości w czasie pokwitania), płeć, stan odżywienia i inne hormony (estrogeny, tyroksyna, prolaktyna,...). Wydzielanie IGF-I w lokalnym środowisku w określonej tkance jest kontrolowane przez swoiste stymuliny troficzne (działanie parakrynowe), podczas gdy na stężenie IGF-I we krwi największy wpływ ma zbilansowany proces wzrostu całego ustroju (działanie endokrynowe).

B. Zastosowanie kliniczne

Upośledzenie wzrostu: Upośledzenie wzrostu może wynikać z wielu przyczyn, między innymi z powodu niedoboru wytwarzania GH (niewydolność przysadkowa), który związany jest z niskimi poziomami IGF-I we krwi. Ze względu na trudności związane z uzyskaniem właściwych do interpretacji wyników pomiarów GH (konieczność wykonywania badań dynamicznych lub testów stymulacji), określenie stabilnego stężenia IGF-I w osoczu jest często brane pod uwagę jako proste badanie przesiewowe w celu określenia "nasylenia GH" u pacjenta przez rozpoczęciem bardziej szczegółowej diagnostyki. W niektórych stanach klinicznych związanych z zaburzeniami wzrostu, niskie poziomy IGF-I mogą być obserwowane pomimo prawidłowej lub wysokiej produkcji GH (np.: w niedożywieniu, przewlekłych stanach chorobowych, w niektórych rodzajach karłowatości wrodzonej np.: u Pigmejów,...). Ciekawym zjawiskiem jest występowanie niskich poziomów IGF-I u dzieci z niewielką dysfunkcją neuro-wydzielniczą GH pomimo prawidłowych poziomów GH wykrywanych w badaniach konwencjonalnych. Biorąc pod uwagę fizjologiczną zmienność IGF-I w dzieciństwie i okresie dojrzewania, wyniki oznaczenia IGF-I muszą być interpretowane z ostrożnością (szczegóły w opracowaniu Rosenfeld i wsp.).

Akromegalia: Poziomy IGF-I są podwyższone w akromegalii (nadmierna produkcja GH) i mogą służyć jako wskaźnik stopnia ciężkości choroby. Wyniki mogą być łatwiej interpretowane z uwagi na to, że u dorosłych wartości referencyjne mogą być łatwiej określone. Pomiar IGF-I są również przydatne do monitorowania leczenia.

Badania naukowe: Zestaw do badania IGF-I ELISA jest dostępnym narzędziem do badania modyfikacji tego czynnika wzrostu w warunkach fizjologicznych (np.: ciąży) lub patologicznych (np.: cukrzyca), oraz do oceny miejscowej regulacji wytwarzania IGF-I w odniesieniu do działania parakrynowego i autokrynowego (leczenie ran, regeneracja narządów, wzrost nowotworowy, rozwój płodu, regulacje związane z narządami płciowymi itp.)

IV. ZAGADNIENIA DOTYCZĄCE METODY


Test DAsource IGF1-ELISA jest przeprowadzany w fazie stałej oznaczeniem immunoenzymatycznym z amplifikacją czułości, wykonywanym na mikroplatkach polistyrenowych.

W obecnym zestawie, DAsource wprowadził etap przygotowawczy, którego celem jest polepszenie charakterystyki klinicznej testu. Interferencja białek wiążących z testem ELISA do oznaczania IGF1 została dobrze udokumentowana. Etap przygotowawczy wykorzystywany w oznaczeniu DAsource jest procedurą etanolową w środowisku kwaśnym, opisaną przez Daughaday'a i wsp. (8).

Znana ilość IGF1 znakowanego peroksydazą chrzanową (HRP), współzawodniczy z nieznaną ilością IGF1 obecną w kalibratorach, kontrolach i próbkach o ograniczonej liczbie miejsc wiążących swoistego przeciwciała. Po jednogodzinnej inkubacji w temperaturze pokojowej, mikroplata jest przemywana w celu zatrzymania reakcji współzawodnictwa. Następnie dodawany jest roztwór chromogenny (TMB) i przeprowadzana 15-minutowa inkubacja. Reakcja jest zatrzymywana przez dodanie roztworu hamującego reakcję i następnie mikroplata jest odczytywana przy odpowiedniej długości fali. Ilość związanego substratu jest oznaczana kolorymetrycznie, poprzez pomiar absorpcji, której wartość jest odwrotnie proporcjonalna do stężenia IGF1.

Wykreślana jest krzywa kalibracyjna a stężenia IGF1 w próbkach są określane przez interpolację z krzywej kalibracyjnej.

V. ODCZYNNIKI DOSTARCZONE

Odczynniki	Zestaw 96 oznaczeń	Rekonstrukcja			
 Mikroplata z 96 studzienkami pokrytymi przeciwciałami anti-IGF1	96 studzienek	Gotowy do zastosowania			
<table border="1"><tr><td>Ag</td><td>HRP</td><td>CONC</td></tr></table> Koniugat: IGF1 znakowane HRP w buforze fosforanowym z kazeiną i tymolem	Ag	HRP	CONC	1 fiolka 0,2 ml	Rozcieńcz 100 x buforem koniugatu
Ag	HRP	CONC			
<table border="1"><tr><td>CONJ</td><td>BUF</td></tr></table> Bufor koniugatu: Bufor fosforanowy z kazeiną i tymolem	CONJ	BUF	1 fiolka 13 ml	Gotowy do zastosowania	
CONJ	BUF				
<table border="1"><tr><td>PRE</td><td>SOLN</td></tr></table> Roztwór przygotowawczy zawierający etanol	PRE	SOLN	1 fiolka 20 ml	Gotowy do zastosowania	
PRE	SOLN				
<table border="1"><tr><td>REC</td><td>SOLN</td></tr></table> Roztwór do rekonstrukcji zawierający etanol	REC	SOLN	1 fiolka 10 ml	Gotowy do zastosowania	
REC	SOLN				
<table border="1"><tr><td>NEUTR</td><td>SOLN</td></tr></table> Roztwór neutralizujący zawierający bufor fosforanowy z kazeiną bydlęcą	NEUTR	SOLN	1 fiolka 30 ml	Gotowy do zastosowania	
NEUTR	SOLN				
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>0</td></tr></table> Kalibrator zerowy w buforze fosforanowym z owalbuminą i gentamycyną	CAL	0	1 fiolka 1 ml	Gotowy do zastosowania	
CAL	0				
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>N</td></tr></table> Kalibratory - N = od 1 do 5 w buforze fosforanowym z owalbuminą i gentamycyną (dokładne wartości na etykietach fiolek)	CAL	N	5 fiolek materiał liofilizowany	Dodaj 1 ml roztworu do rekonstrukcji	
CAL	N				
<table border="1"><tr><td>CONTROL</td><td>N</td></tr></table> Kontrola - N = od 1 do 2 w plazmie ludzkiej z tymolem	CONTROL	N	2 fiołki materiał liofilizowany	Dodać 1 ml wody destylowanej	
CONTROL	N				
<table border="1"><tr><td>WASH</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table> Roztwór płuczący (TRIS HCl)	WASH	SOLN	CONC	1 fiolka 10 ml	Rozcieńczyć 200x wodą destylowaną (wykorzystać mieszadło magnetyczne).
WASH	SOLN	CONC			
<table border="1"><tr><td>CHROM</td><td>TMB</td></tr></table> Chromogenny roztwór TMB (tetrametylobenzodyna)	CHROM	TMB	2 fiołki 13 ml	Gotowy do zastosowania	
CHROM	TMB				
<table border="1"><tr><td>STOP</td><td>SOLN</td></tr></table> Roztwór hamujący reakcję: 0.2M H ₂ SO ₄	STOP	SOLN	1 fiolka 13 ml	Gotowy do zastosowania	
STOP	SOLN				

Uwaga: 1. Dla rozcieńczeń próbek należy stosować kalibrator zerowy.
2. 1 ng przygotowanego kalibratora jest równoważny 1 ng

pierwszego wzorca WHO IS 02/254 - NIBSC.

VI. MATERIAŁY WYMAGANE, ALE NIEDOSTARCZONE

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

1. Wysokiej jakości woda destylowana
2. Pipety do dozowania: 50 µl, 100 µl, 400 µl, 500 µl, 600 µl i 1 ml (zaleca się korzystanie z dokładnych pipet z jednorazowymi końcówkami plastikowymi)
3. Opcjonalnie: próbki do mikrowirowania w polipropylenie do przygotowywania próbek (przykładowo: Eppendorf 3810)
4. Probówki polipropylenowe dla etapu neutralizacji (przykładowo: Falcon 352063)
5. Mieszadło wirowe
6. Mieszadło magnetyczne
7. Mikrowirówka lub wirówka
8. Przemycarka dla mikroplatek
9. Pozioma wytrząsarka mikroplatek o prędkości 500 rpm
10. Czytnik mikroplatek o możliwości odczytu w pasmach 450 nm i 650 nm (odczyt monochromatyczny)

VII. PRZYGOTOWANIE ODCZYNNIKÓW

A. Kalibratory: Rekonstruować kalibratory przy pomocy 1 ml roztworu do rekonstrukcji.

B. Kontrola: Kontrola należy rekonstruować przy pomocy 1 ml wody destylowanej.

C. Roboczy roztwór koniugatu IGF1-HRP: Przygotować właściwą objętość roztworu koniugatu poprzez dodanie, przykładowo: 20 µl rozcieńczonego 100 x stężonego koniugatu IGF1-HRP do 2 ml buforu koniugatu. Homogenizować roztwór wortexem. Zalecane jest doraźne przygotowanie roztworu.

D. Roboczy roztwór płuczący: Właściwą objętość roboczego roztworu płuczącego należy przygotować dodając 199 objętości wody destylowanej do 1 objętości roztworu płuczącego (200x). Do homogenizacji należy wykorzystać mieszadło magnetyczne. Niewykorzystany roboczy roztwór płuczący należy wylać pod koniec dnia.

VIII. PRZECHOWYWANIE I DATA WAŻNOŚCI ODCZYNNIKÓW

- Przed otwarciem lub rekonstrukcją wszystkie składniki zestawu zachowują trwałość do daty ważności przedstawionej na etykiecie, jeżeli są przechowywane w temperaturze od 2 do 8°C.
- Niezużyte paski muszą być przechowywane do momentu upływu daty ważności w temperaturze 2-8°C, w szczelnym woreczku z substancją osuszającą.
- Po rekonstrukcji, kalibratory i kontrola zachowują trwałość przez 1 tydzień, pod warunkiem przechowywania w temperaturze od 2 do 8°C. W celu dłuższego przechowywania, należy zamrozić w małych objętościach. Możliwe jest wówczas przechowywanie przez maksymalnie 3 miesiące, w temperaturze -20°C. Unikać powtórnego zamrażania i rozmrażania.
- Stężony roztwór płuczący jest stabilny w temperaturze pokojowej do momentu upływu daty ważności.
- Świeżo przygotowany roboczy roztwór płuczący powinien być wykorzystany w tym samym dniu.
- Roboczy roztwór IGF1-HRP jest stabilny przez 4 godziny w temperaturze pokojowej; unikać bezpośredniego światła słonecznego.
- Zmiany w wyglądzie fizycznym odczynników w zestawie mogą wskazywać na ich niestabilność lub zużycie.

IX. POBIERANIE I PRZYGOTOWANIE MATERIAŁU DO BADANIA

- Próbkę surowicy muszą być przechowywane w temperaturze 2-8°C.
- Jeżeli oznaczenie nie jest wykonywane w ciągu 24 godzin, niewielkie objętości należy przechowywać w temperaturze -20°C. Unikać powtarzanych cykli zamrażania-odmrażania.

- Przd użyciem, wszystkie próbki powinny osiągnąć temperaturę pokojową. Zaleca się worteksowanie próbek przed użyciem.
- Nie należy wykorzystywać próbek zhemolizowanych.

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.

Kalibratory, kontrole i próbki oznacz podwójnie. Zalecane jest ustawienie pionowe.

Do przygotowania roztworu płuczącego użyj czystego,

8. W czasie 15 minut od momentu zakończenia przepłukiwania, plastikowego pojemnika.

Aby uniknąć zanieczyszczenia krzyżowego, do dodawania poszczególnych odczynników i próbek należy wykorzystywać czyste końcówki jednorazowe pipet.

Do odmierzania roztworu chromogenego i roztworu hamującego reakcję należy unikać stosowania pipet z metalowymi końcówkami.

Pipety wysokiej precyzji lub pipety automatyczne poprawiają precyzję wykonania oznaczenia.

Przestrzegać czasów inkubacji.

W celu uniknięcia płynięcia parametrów, czas pomiędzy odmierzeniem pipetą pierwszego kalibratora i ostatniej próbki musi być ograniczony do czasu podanego w akapicie E sekcji XIII (Opóźnienie czasowe).

Przygotować krzywą kalibracyjną dla każdego cyklu pomiarowego, nie wolno wykorzystywać danych z poprzednich oznaczeń.

Odmierzyć roztwór chromogeny w czasie 15 minut od momentu przemycia mikropłytki.

Podczas inkubacji roztworu chromogenego należy unikać narażania mikropłytki na bezpośrednie działanie światła słonecznego.

B.1. Etapy przygotowania próbek do mikrowirowania

! Nie ekstrahować kalibratorów

1. Dla każdej próbki i kontroli, oznaczyć jedną próbkę do mikrowirowania (do ekstrakcji) i jedną próbkę polipropylenową (do neutralizacji).
2. Odmierzyć 100 µl każdej próbki i kontroli do próbki do mikrowirowania.
3. Do tej próbki dodać 400µl roztworu przygotowawczego.
4. Zamknąć próbki, worteksować i inkubować 30 minut w temperaturze pokojowej.
5. Odwirować przez 2 minuty w 10000 rpm.
6. Odciągnąć 100 µl supernatantu i przenieść do oznaczonej próbki polipropylenowej.
7. Do próbki tej dodać 600 µl roztworu neutralizującego.
8. Każda próbka musi być wymieszana przez wirowanie.

B.2. Etapy przygotowania dla innych próbek polipropylenowych

! Nie ekstrahować kalibratorów

1. Dla każdej próbki i kontroli, oznaczyć dwie próbki polipropylenowe (jedną do ekstrakcji i jedną do neutralizacji).
2. Odmierzyć 100 µl każdej próbki i kontroli do próbki do ekstrakcji.
3. Do tej próbki dodać 400µl roztworu przygotowawczego.
4. Zamknąć próbki, worteksować i inkubować 30 minut w temperaturze pokojowej.
5. Odwirować przez 15 minut w > lub = 3000 rpm.
6. Odciągnąć 100 µl supernatantu i przenieść do oznaczonej próbki polipropylenowej.
7. Do próbki tej dodać 600 µl roztworu neutralizującego.
8. Każda próbka musi być wymieszana przez wirowanie.

C. Procedura

1. Wybrać żadaną liczbę studzienek do oznaczenia. Nieużyte studzienki powinny być ponownie zamknięte w szczelnym woreczku ze środkiem osuszającym i przechowywane w temperaturze 2-8°C.
2. Umieścić studzienki w oprawie.
3. Odmierzyć pipetą 50 µl każdego z kalibratorów, ekstrahowanej kontroli i ekstrahowanej próbki do odpowiednich studzienek.
4. Odmierzyć pipetą do wszystkich studzienek po 100 µl roztworu koniugatu IGF1-HRP.
5. Inkubować przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej na wstrząsarce z prędkością 500 rpm.
6. Zaaspirować płyn z każdej studzienki.
7. Trzykrotnie przepłukać płytkę:
 - odmierzyć do każdej studzienki po 0,4 ml roztworu płuczącego;
 - zaaspirować zawartość każdej studzienki.

odmierzyć do każdej studzienki po 200 µl roztworu chromogenego.

9. Inkubować mikropłytkę przez 15 minut w temperaturze pokojowej; na wstrząsarce z prędkością 500 rpm; unikać bezpośredniego światła słonecznego.
10. Odmierzyć pipetą do wszystkich studzienek po 100 µl roztworu hamującego reakcję.
11. W czasie 1 godziny odczytać absorbancje dla 450 nm (filtr referencyjny 630 nm lub 650 nm) i wyliczyć wyniki w sposób opisany w sekcji XI.

XI. OBLICZANIE WYNIKÓW

1. Odczytać płytkę dla 450 nm z użyciem filtra referencyjnego ustawionego na 650 nm (lub 630 nm).
2. Obliczyć średnią oznaczeń podwójnych.
3. Obliczyć wartości dla każdego kalibratora, kontroli i próbki:

$$B/B0 (\%) = \frac{OD (\text{Kalibrator, Kontrol lub próbki})}{OD (\text{Kalibrator zerowy})} \times 100$$

4. Na papierze milimetrycznym liniowo-liniowym lub półlogarytmicznym wykreślić wartości (B/B0(%)) dla każdego punktu kalibratora jako funkcję stężenia IGF-I każdego punktu kalibratora. Odrzucić oczywiste wartości graniczne.
5. Do opracowania krzywej kalibracyjnej mogą być wykorzystane również metody wspomaganie komputerowego. Jeżeli ma być zastosowane automatyczne przetwarzanie wyników, zaleca się dopasowanie krzywej logistycznej 4 parametrowej.

Nakładając wartości (B/B0 (%)) próbki należy określić stężenia IGF-I w próbkach z krzywej kalibracyjnej.

XII. PRZYKŁAD DANYCH TYPOWYCH

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

Kalibratory	ng/ml	Jednostki OD
S0	0.0	2.841
S1	18.0	2.560
S2	28.6	2.269
S3	56.0	1.820
S4	154.0	1.091
S5	643.0	0.494

XIII. DZIAŁANIE I OGRANICZENIA

A. Granica wykrywania

LoB (Limit ślepej próby) obliczono mierząc ślepą próbę 20 razy i obliczono jako średnią - 1,65 odchylenia standardowego rozkładu tych wartości. Obliczono LoB na 4.0 ng / ml.

B. Swoistość

B1. Reakcja krzyżowa

Odsetki reaktywności krzyżowej uzyskane przez porównanie stężenia uzyskującego 50% hamowanie są następujące:

Składnik	Reaktywność krzyżowa (%)
IGF-II	0,09
Insuline	Brak
GH	Brak

B2. Zakłócenia

Oceniono wpływ potencjalnych substancji zakłócających na próbki przy użyciu zestawu DAsource IGF-1-ELISA. Różne poziomy hemoglobiny, bilirubiny, trójglicerydu badano na próbkach o różnych stężeniach IGF-1. Nasze kryteria akceptacji miały interferencję mniejszą niż 10%. Należy unikać próbek hemolizowanych i żółtaczkowych. Jednak nie ma ograniczeń dla pomiaru próbek lipemicznych.

Złożony	Stężenie IGF-1 przed dodaniem interferencji (ng / ml)	Dodane stężenie interferenta (mg / dl)	Stężenie IGF-1 po dodaniu interferenta	Średnia zmienność (%)
Hemoglobina	320.2	500	316.0	8.4
		250	274.2	
	100.7	500	85.8	
		250	103.9	
Bilirubina	320.2	100	347.6	7.2
		50	316.3	
	100.7	100	105.2	
		50	115.3	
Trójgliceryd	320.2	2500	392.0	7.0
		1250	320.0	
	100.7	2500	103.9	
		1250	98.6	

C. Precyzja

Wewnątrztestowa				Międzytestowa			
Surowica	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)	Surowica	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)
A	20	159.2 ± 12.3	7.7	C	10	124.4 ± 7.5	6.1
B	20	140.6 ± 9.7	6.9	D	10	187.4 ± 14.0	7.5

SD: Odchylenie standardowe; CV: Współczynnik zmienności

D. Dokładność

BADANIE ODZYSKU

Próbka (ng)	Dodana IGF-1 (ng)	Wartość oczekiwana (ng/ml)	Wartość zmierzona (ng/ml)	Odzysk (%)
1	15	45	51	112.5
1	30	60	60	99.5
1	100	151	130	86.4
1	250	280	290	103.5
Próbka (ng)	Dodana IGF-1 (ng)	Wartość oczekiwana (ng/ml)	Wartość zmierzona (ng/ml)	Odzysk (%)
2	15	47	49	106
2	30	62	58	94.0
2	100	150	123	82.6
2	250	282	281	99.8

BADANIE ROZCIEŃCZENIA

Próbka A			Próbka B		
Rozc.	Wartość oczekiwana ng/ml	Wartość zmierzona ng/ml	Rozc.	Wartość oczekiwana ng/ml	Wartość zmierzona ng/ml
1/1	478.8	478.8	1/1	490.4	490.4
1/2	239.4	214.0	1/2	245.2	184.0
1/4	119.7	114.5	1/4	122.6	108.3
1/8	59.8	59.2	1/8	61.3	55.4
1/16	29.9	34.7	1/16	30.7	29.7
1/32	15.0	18.6	1/32	15.3	18.3

Po ekstrakcji, próbki zostały rozcieńczone za pomocą kalibratora zerowego.

Współczynnik przeliczeniowy:

Z ng/ml na nmol/l: x 0,13
Z nmol/l na ng/ml: x 7,65

E. Odstęp czasowy pomiędzy dozowaniem ostatniego kalibratora i próbki

Jak tutaj wykazano, wyniki testu pozostają dokładne nawet wówczas, gdy próbka zostanie dozowana w 30 minut po dodaniu kalibratorów do opłaszczonych studzienek.

Opóźnienie	
0 minut	30 minut
994,0 ng/ml	1057,0 ng/ml
458,0 ng/ml	476,0 ng/ml

XIV. WEWNĘTRZNA KONTROLA JAKOŚCI

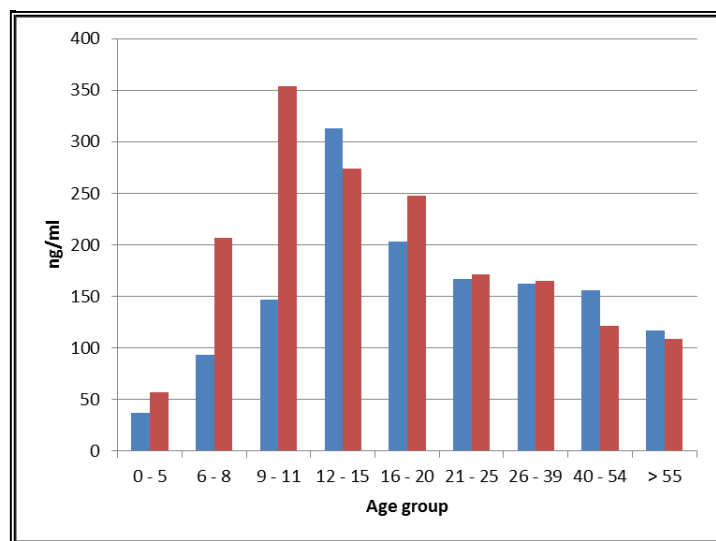
- Jeżeli wyniki uzyskane dla kontroli 1 i 2 nie znajdują się w zakresie określonym na etykiecie fiołki, wyniki nie mogą zostać wykorzystane dopóki nie uda się znaleźć właściwego wyjaśnienia tego odchylenia.
- Jeżeli to konieczne, każde laboratorium może wykonać własne próbki zbiorcze w celach kontrolnych, które powinny być zamrożone w małych objętościach. Kontrole zawierające azydek interferują z reakcją enzymatyczną i nie mogą być stosowane.
- Dopuszczalne kryteria dotyczące różnicy pomiędzy wynikami oznaczeń podwójnych próbek powinny być zgodne z zasadami prawidłowej pracy w laboratorium
- Zaleca się, aby w celu określenia zmienności oznaczenia rutynowo oznaczać kontrole jako nieznaną próbki. Charakterystyki kliniczne testu powinny być monitorowane z użyciem arkuszy kontroli jakości kontroli.
- Dobrą praktyką jest wzrokowe sprawdzanie dopasowania krzywej wybranej przez komputer.

XV. ZAKRESY REFERENCYJNE

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

Grupa wiekowa (lata)	n	Mężczyźni (ng/ml)		n	Kobiety (ng/ml)	
		Mediana	Zakres		Mediana	Zakres
0 – 5	30	37	14 – 154	50	57	21 – 262
6 – 8	20	93	45 – 213	18	207	89 – 485
9 – 11	20	147	53 – 453	19	354	99 – 708
12 – 15	24	313	103 – 753	31	274	100 – 744
16 – 20	30	203	99 – 655	29	248	73 – 522
21 – 25	9	167	115 – 304	9	171	83 – 511
26 – 39	24	162	87 – 415	20	165	101 – 267
40 – 54	35	156	69 – 343	17	121	60 – 271
> 55	25	117	33 – 232	14	109	69 – 189

Powyższe zakresy odpowiadają percentylom od 2,5% do 97,5%.



XVI. ŚRODKI OSTROŻNOŚCI I OSTRZEŻENIA

Bezpieczeństwo

Tylko do diagnostyki *in vitro*.

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. Roztwór hamujący reakcję zawiera H_2SO_4 . W razie kontaktu, należy dokładnie przemyć miejsce wodą.

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 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. PODSUMOWANIE PROTOKOŁU

	KALIBRATORY µl	PRÓBKİ KONTROLE µl
PRZYGOTOWANIE		
Próbki, kontrole	-	100
Roztwór przygotowawczy	-	400
Inkubacja Odwirowanie	30 minut RT 2 minuty przy 10000 rpm (próbki do mikrowirowania) lub 15 minut przy > lub = 3000 rpm (próbki polipropylenowe)	
Supernatant	-	100
Roztwór neutralizujący	-	600
Wytrząsanie	Mieszadło wirowe	
INKUBACJA		
Kalibratory (0 - 5)	50	-
Próbki przygotowawcze, kontrole	-	50
Rozcieńczony koniugat	100	100
Inkubować przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej na wytrząsarce z prędkością 500 rpm. Zaaspirować zawartość każdej studzienki. Przeplukać trzykrotnie z użyciem 400 µl roztworu płuczącego i zaaspirować.		
Roztwór chromogeny	200	200
Inkubować przez 15 minut w temperaturze pokojowej na wytrząsarce z prędkością 500 rpm.		
Roztwór hamujący reakcję	100	100
Odczytać na czytniku mikroplitek i zarejestrować absorbancję każdej studzienki przy 450 nm (względem 630 lub 650 nm).		

Nr katalogowy DIASource: KAP1581	Nr aktualizacji: 220516
-------------------------------------	----------------------------

Data wydania: 16/05/2022