

# SM-C-RIA-CT

Catalog #: KIP1589



ENGLISH

## I. INTENDED USE

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

## II. GENERAL INFORMATION

- A. Proprietary name :** DIAsource SM-C-RIA-CT Kit  
**B. Catalog number :** KIP1589 : 96 tests  
**C. Manufactured by :** DIAsource ImmunoAssays S.A.

## III. CLINICAL BACKGROUND

### A. Biological activities

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

growth (endocrine activities).

## **B. Clinical applications**


- **Growth retardation:** Growth retardation may be due to several causes, among which deficient GH production (hypopituitarism), which is associated with low SM-C blood levels. Because of the difficulties to get interpretable results from GH measurements (by dynamic multiple or stimulation tests), the determination of the stable SM-C concentration in plasma is often considered as a simple screening test to evaluate "GH impregnation" of the patient before deciding more extensive investigations. In several clinical situations with impaired growth, low SM-C levels may be observed despite normal or high GH production (i.e. malnutrition, chronic diseases states, some genetic dwarfs like Pygmies, ...). Interestingly, children with discrete GH neuro-secretory dysfunction may display low SM-C values despite normal GH levels by conventional testing. The results of SM-C assay must be interpreted cautiously by considering the normal variations of SM-C during childhood and adolescence (see Rosenfeld et al).
- **Acromegaly:** SM-C levels are elevated in acromegaly (excess production of GH) and may serve as an indicator of disease severity. Results are more readily interpreted because the normal values are more easily defined in adults. SM-C measurements are also useful to monitor treatment.
- **Research:** The SM-C RIA kit is an invaluable tool to study the modifications of this growth factor during physiologic (i.e. pregnancy) or pathologic (i.e. diabetes) situations, and the local regulation of SM-C production in relation to its paracrine and autocrine activities (wound healing, organ regeneration, neoplastic growth, foetal development, gonadal regulation, etc).

## **IV. PRINCIPLES OF THE METHOD**

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

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

## V. REAGENTS PROVIDED

Reagents	96 Test Kit	Colour Code	Reconstitution			
 Tubes coated with anti SM-C	2 x 48	green	Ready for use			
<table border="1" data-bbox="277 427 427 483"> <tr> <td>Ag</td> <td><sup>125</sup>I</td> </tr> </table> TRACER: <sup>125</sup> Iodine labelled SM-C (HPLC grade) in phosphate buffer with bovine casein and azide (<0.1%)	Ag	<sup>125</sup> I	1 vial 50 ml 145 kBq	red	Ready for use	
Ag	<sup>125</sup> I					
<table border="1" data-bbox="277 622 427 667"> <tr> <td>CAL</td> <td>0</td> </tr> </table> Zero calibrator in phosphate buffer with ovalbumin and azide (<0.1%)	CAL	0	1 vial lyophilised	yellow	Add 3 ml reconstitution solution	
CAL	0					
<table border="1" data-bbox="277 757 427 801"> <tr> <td>CAL</td> <td>N</td> </tr> </table> Calibrators - N = 1 to 5 (see exact values on vial labels) in phosphate buffer with ovalbumin and azide (<0.1%)	CAL	N	5 vials lyophilised	yellow	Add 1 ml reconstitution solution	
CAL	N					
<table border="1" data-bbox="229 920 496 965"> <tr> <td>REC</td> <td>SOLN</td> </tr> </table> Reconstitution Solution containing ethanol	REC	SOLN	1 vial 10 ml	blue	Ready for use	
REC	SOLN					
<table border="1" data-bbox="229 1025 496 1070"> <tr> <td>PRE</td> <td>SOLN</td> </tr> </table> Pre-treatment Solution containing ethanol	PRE	SOLN	1 vial 20 ml	black	Ready for use	
PRE	SOLN					
<table border="1" data-bbox="229 1137 496 1182"> <tr> <td>NEUTR</td> <td>SOLN</td> </tr> </table> Neutralization Solution containing phosphate buffer with bovine casein and azide (<0.1%)	NEUTR	SOLN	1 vial 30 ml	green	Ready for use	
NEUTR	SOLN					
<table border="1" data-bbox="220 1294 505 1339"> <tr> <td>WASH</td> <td>SOLN</td> <td>CONC</td> </tr> </table> Wash solution (TRIS-HCl)	WASH	SOLN	CONC	1 vial 10 ml	brown	Dilute 70 x with distilled water (use a magnetic stirrer).
WASH	SOLN	CONC				
<table border="1" data-bbox="229 1391 451 1435"> <tr> <td>CONTROL</td> <td>N</td> </tr> </table> Controls - N = 1 or 3 in human serum with thymol	CONTROL	N	3 vials lyophilised	silver	Add 0.5 ml distilled water	
CONTROL	N					

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

## VI. SUPPLIES NOT PROVIDED

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

1. Distilled water
2. Pipettes for delivery of: 100 µl, 400 µl, 500 µl, 600 µl, 1 ml and 3 ml (the use of accurate pipettes with disposable plastic tips is recommended)
3. Vortex mixer
4. Magnetic stirrer
5. 5 ml automatic syringe (Cornwall type) for washing
6. Aspiration system (optional)

7. Plastic tubes for pre-treatment of samples
8. Tube shaker (1200 rpm)
9. Centrifuge (3000 g)
10. Incubator at 2-8°C
11. Any gamma counter capable of measuring 125I may be used (minimal yield 70%).

## **VII. REAGENT PREPARATION**

**A. Calibrators:** Reconstitute the zero calibrator with 3 ml reconstitution solution and other calibrators with 1 ml reconstitution solution.

**B. Controls:** Reconstitute the controls with 0.5 ml distilled water.

**C. Working Wash solution:** Prepare an adequate volume of Working Wash solution by adding 69 volumes of distilled water to 1 volume of Wash Solution (70x). Use a magnetic stirrer to homogenize. Discard unused Working Wash solution at the end of the day.

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

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

## **IX. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION**

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

## **X. PROCEDURE**

### **A. Handling notes**

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

Thoroughly mix all reagents and samples by gentle agitation or swirling.

In order to avoid cross-contamination, use a clean disposable pipette tip for the addition of each reagent and sample.  
High precision pipettes or automated pipetting equipment will improve the precision.  
Respect the incubation times.  
Prepare a calibration curve for each run, do not use data from previous runs.

### **B. Pre-treatment step**

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

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

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

- 1-8. See pre-treatment step.
9. Store the neutralized extract at –20°C for 1 h, then centrifuge immediately at 3000g for 30 min at 4°C.
10. Decant the supernatant into fresh tubes and assay it as described below.

### **D. Procedure**

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

## **XI. CALCULATION OF RESULTS**

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

$$B/B0(\%) = \frac{\text{Counts (Calibrator or sample)}}{\text{Counts (Zero Calibrator)}} \times 100$$

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

## **XII. TYPICAL DATA**

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

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

## **XIII. PERFORMANCE AND LIMITATIONS**

### **A. Detection limit**

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

### **B. Specificity**

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

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

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

### C. Precision

#### INTRA-ASSAY PRECISION INTER-ASSAY PRECISION

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

SD: Standard Deviation; CV: Coefficient of variation

### D. Accuracy

#### DILUTION TEST

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

Samples were diluted with the zero calibrator.

#### RECOVERY TEST

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

Conversion factor:

From ng/ml to nmol/L: x 0.1307

From nmol/L to ng/ml: x 7.649

### XIV. INTERNAL QUALITY CONTROL

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

- Acceptance criteria for the difference between the duplicate results of the samples should rely on Good Laboratory Practises.

## **XV. REFERENCE INTERVALS**

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

Normal subjects

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

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

## **XVI. PRECAUTIONS AND WARNINGS**

### **Safety**

For in vitro diagnostic use only.

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

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

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

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

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

All animal products and derivatives have been collected from healthy animals.

Bovine components originate from countries where BSE has not been reported. Nevertheless, components containing animal substances should be treated as potentially infectious.

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

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

## ***XVII. BIBLIOGRAPHY***

1. DAUGHADAY W.H. and ROTWEIN P. (1989)

**Insulin-like growth factors I and II. peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum and tissue concentrations.**

Endocrine Rev., 10(1) : 68-91.

2. FROESCH E.R. and ZAPF J. (1985)

**Insulin-like growth factors and insulin : comparative aspects.**

Diabetologia, 28 : 485-493.

3. FURLANETTO R.W., UNDERWOOD L., VAN WYK J.J., D'ERCOLE A.J. (1977)

**Estimation of somatomedin-C levels in normals and patients with pituitary disease by radioimmunoassay.**

J. Clin. Invest. 60 : 648.

4. ROSENFELD R.G., WILSON D.M., LEE P.D.K. and HINTZ R.L. (1986)

**Insulin-like growth factors I and II in evaluation of growth retardation.**

J. Pediatr., 109 : 428.

5. RUDMAN D., KUTNER M.H. and CHAWLA R.K. (1985)

**The short child with subnormal plasma somatomedin-C.**

Pediatric Res., 19(10) : 975-980.

6. ALBERTSSON-WIKLAND K. and HALL K. (1987)

**Growth hormone treatment in short children : relationship between growth and serum insulin-like growth factor I and II levels.**

J. Clin. Endocrinol Metab., 65 : 671.

7. WASS J.A.H., CLEMMONS D.R., UNDERWOOD L.E., BARROW L., BESSER G.M. and VAN WYK J.J. (1982)

**Changes in circulating somatomedin-C levels in bromocriptine treated acromegaly.**

Clin. Endocrinol., 17 : 369-377.

8. DAUGHADAY W.H., MARIZ I.K. and BLETHEN S.L. (1980)

**Inhibition of access of bound somatomedin to membrane receptor and immunobinding sites - a comparison of radioreceptor and radioimmunoassay of somatomedin in native and acid-ethanol extracted serum.**

J. Clin. Endocrinol. Metab., 51 : 781.

9. BREIERB.H., GALLAHER B.W. and GLUCKMAN P.D. (1991)

**Radioimmunoassay for insulin-like growth factor-I : solutions to some potential problems and pitfalls.**

Journal of Endocrinology, 128 : 347-357.

10. SCHOUTEN J.S.A.G. and al. (1993)

**IGF1 : a prognostic factor of knee osteoarthritis.**

British J. Rheumatol., 32 : 274-280.

11. GRONBAEK H., SKJAERBAEK C., NIELSEN B., FRYSTYK J., FOEGH M.L., FLYVBJERG A., ORSKOV H. (1995)

**Growth hormone and insulin-like growth factor-I: a suggested role in renal transplantation and graft vessel disease.**

Transplant. Proceed., 27/3 : 2133-2136.

12. TSITOURAS P.D., ZHONG Y.G., SPUNGEN A.M., BAUMAN W.A. (1995)

**Serum testosterone and growth hormone insulin-like growth factor-I in adults with spinal cord injury.**

Hormone and metabolic Research , 27/6 : 287-292.

13. KOCH A., DORR H.G., GERLING S., BEHRENS R., BOHLES H.J. (1995)

**Effect of growth hormone on IDF-I levels in patients with growth hormone deficiency and Wilson disease.**

Hormone Research, 44/1 : 40-44.

**XVIII. SUMMARY OF THE PROTOCOL**

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

DIAsource Catalogue Nr : KIP1589	P.I Number : 1700478/en	Revision nr : 110218/1
-------------------------------------	----------------------------	---------------------------

DEUTSCH

## **I. VERWENDUNGSZWECK**

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

## **II. ALLGEMEINE INFORMATION**

- A. Handelsbezeichnung :** DIAsource SM-C-RIA-CT Kit  
**B. Katalognummer :** KIP1589 : 96 Tests  
**C. Hergestellt von:** DIAsource ImmunoAssays S.A.

## **III. KLINISCHER HINTERGRUND**

### **A. Biologische Aktivität**

Der Somatomedin-C (SM-C) oder Insulin ähnliche Wachstumsfaktor I (IGF-I) ist ein Polypeptid von 70 Aminosäuren (7650 Dalton) und ähnelt Proinsulin (50%ige Sequenzhomologie) und dem anderen gut charakterisierten Mitglied der Gruppe der Somatomedine: IGF-II (67AA, 70%ige Sequenzhomologie mit IGF-I). SM-C ist der wichtigste Faktor, der die wachstumsfördernden Effekte von Wachstumshormon (GH) beeinflusst, ein Hypophysenhormon mit starken Schwankungen der Konzentration im Blut, da es in Schüben ausgeschüttet wird. Die Konzentration von SM-C im Blut ist durch die Träger-Bindungsproteine stabiler. Die Konzentration des Hauptbindungsproteins (53000 Dalton) sowie die Produktion von SM-C werden durch Wachstumshormon gesteuert. SM-C wird durch die Leber und andere Gewebe produziert, und er hat endokrine, parakrine und autokrine Wirkungen. Er stimuliert das Wachstum und reguliert die Differenzierung verschiedener Gewebe, zeigt Insulin ähnliche Wirkungen und fördert das Wachstum von Knorpel. Obwohl GH der wichtigste Kontrollfaktor für die Sekretion und Konzentration des SM-C ist, gibt es noch andere determinierende Faktoren: Alter (mit einer Spitze in der Adoleszenz), Geschlecht, Nahrungsstatus und andere Hormone (Östrogen, Thyroxin, Prolaktin, usw.). Vor allem spezifische trophische Stimuli regulieren die SM-C Sekretion im lokalen Mikroumfeld eines bestimmten Organs (parakrine Wirkungen), während die SM-C Konzentration im Blut die wichtigste Variable für ein ausgeglichenes systemisches Wachstum ist (endokrine Wirkungen).

### **B. Klinische Anwendungen**

· **Wachstumsretardierung:** Wachstumsretardierung kann mehrere Ursachen haben, unter anderem eine mangelnde Produktion von GH (Hypopituitarismus), die mit niedrigen SM-C Konzentrationen im Blut verbunden ist. Wegen der Schwierigkeit, interpretierbare Resultate aus GH-Messungen (durch dynamische multiple oder Stimulationstests) zu erhalten, wird die Bestimmung der stabilen SM-C Konzentration im Plasma oft als einfacher Screeningtest zur Beurteilung der ‚GH-Imprägation‘ des Patienten betrachtet, bevor zu extensiveren Untersuchungen übergegangen wird. In mehreren klinischen Situationen mit Wachstumsbehinderung können niedrige SM-C Konzentrationen trotz normaler oder hoher GH-Produktion beobachtet werden (z. B. Mangelernährung, chronische Krankheitszustände, manche Fälle genetisch bedingten Minderwuchses wie Pygmäen, usw.). Interessanterweise können Kinder

mit diskontinuierlicher neurosekretorischer GH-Dysfunktion bei konventionellen Tests trotz eines normalen GH-Spiegels niedrige SM-C Werte aufweisen. Die Resultate des SM-C Assay müssen unter Berücksichtigung der normalen Schwankungen von SM-C während der Kindheit und Jugend vorsichtig interpretiert werden (siehe Rosenfeld et al).


· **Akromegalie:** Die SM-C Konzentrationen sind bei Akromegalie (überhöhter GH-Produktion) erhöht und können als Hinweis auf die Schwere der Krankheit dienen. Die Resultate werden leichter interpretiert, weil die Normalwerte bei Erwachsenen einfacher bestimmt werden. SM-C Messungen sind auch zur Kontrolle der Behandlung nützlich.

· **Forschung:** Der SM-C RIA Kit ist ein unschätzbares Instrument zur Untersuchung der Veränderungen dieses Wachstumsfaktors während physiologischer (z. B. Schwangerschaft) oder pathologischer (z. B. Diabetes) Situationen sowie zur Untersuchung der lokalen Regulierung der SM-C Produktion in Bezug auf die parakrinen und autokrinen Wirkungen dieses Faktors (Wundheilung, Organregeneration, neoplastisches Wachstum, fetale Entwicklung, Steuerung der Gonaden, usw.).

#### **IV. GRUNDSÄTZLICHES ZUR DURCHFÜHRUNG**

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

## V. MITGELIEFERTE REAGENZIEN

Reagenz	96 Test Kit	Farbcode	Rekonstitution			
 Mit anti SM-C-beschichtete Röhrchen	2 x 48	grün	<b>Gebrauchsfertig</b>			
<table border="1" data-bbox="268 421 419 465"> <tr> <td>Ag</td> <td><sup>125</sup>I</td> </tr> </table> Tracer : <sup>125</sup> Iod markiertes SM-C (HPLC grade) in Phosphatpuffer mit Rinderserumalbumin und Azid (<0,1%)	Ag	<sup>125</sup> I	1 Gefäß 50 ml 145 kBq	rot	<b>Gebrauchsfertig</b>	
Ag	<sup>125</sup> I					
<table border="1" data-bbox="284 589 435 633"> <tr> <td>CAL</td> <td>0</td> </tr> </table> Null Kalibrator in Phosphatpuffer mit Ovalbumin und Azid (<0,1%)	CAL	0	1 Gefäß lyophilisiert	gelb	3 ml Rekonstitutionslösung <b>zugeben</b>	
CAL	0					
<table border="1" data-bbox="284 701 435 745"> <tr> <td>CAL</td> <td>N</td> </tr> </table> Kalibratoren SM-C : N = 1 bis 5 (genaue Werte auf Gefäß-Etiketten) in Phosphatpuffer mit Ovalbumin und Azid (<0,1%)	CAL	N	5 Gefäße lyophilisiert	Gelb	1 ml Rekonstitutionslösung <b>zugeben</b>	
CAL	N					
<table border="1" data-bbox="236 857 499 902"> <tr> <td>REC</td> <td>SOLN</td> </tr> </table> Rekonstitutionslösung mit Ethanol	REC	SOLN	1 Gefäß 10 ml	Blau	<b>Gebrauchsfertig</b>	
REC	SOLN					
<table border="1" data-bbox="236 947 499 992"> <tr> <td>PRE</td> <td>SOLN</td> </tr> </table> Vorbehandlungslösung mit Ethanol	PRE	SOLN	1 Gefäß 20 ml	Schwarz	<b>Gebrauchsfertig</b>	
PRE	SOLN					
<table border="1" data-bbox="236 1037 499 1081"> <tr> <td>NEUTR</td> <td>SOLN</td> </tr> </table> Neutralisierungslösung in Phosphatpuffer mit Rinder-casein und Azid (<0,1%)	NEUTR	SOLN	1 Gefäß 30 ml	Grün	<b>Gebrauchsfertig</b>	
NEUTR	SOLN					
<table border="1" data-bbox="220 1171 483 1216"> <tr> <td>WASH</td> <td>SOLN</td> <td>CONC</td> </tr> </table> Waschlösung (TRIS-HCl)	WASH	SOLN	CONC	1 Gefäß 10 ml	Braun	70x mit dest. Wasser (Magnetrührer verwenden) <b>verdünnen</b> .
WASH	SOLN	CONC				
<table border="1" data-bbox="252 1283 451 1328"> <tr> <td>CONTROL</td> <td>N</td> </tr> </table> Kontrollen : N = 1 oder 3 in Humanserum und Thymol	CONTROL	N	3 Gefäße lyophilisiert	Silber	0,5 ml dest. Wasser <b>zugeben</b>	
CONTROL	N					

### Bemerkung :

1. Benutzen Sie den Null Kalibrator zur Probenverdünnung.
2. 1 ng der Standardzubereitung ist äquivalent zu 1 ng 1st IS 91/554.

## VI. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL

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

1. Dest. Wasser
2. Pipetten: 100 µl, 400 µl, 500 µl, 600 µl, 1 ml und 3 ml (Verwendung von Präzisionspipetten mit Einwegpipettenspitzen wird empfohlen)
3. Kunststoffröhrchen zur Vorbehandlung von Proben
4. Vortexmixer
5. Magnetrührer
6. 5 ml automatische Spritze (Cornwall-Typ) zum Waschen
7. Absaugsystem (optional)
8. Schüttler für Röhrchen (1200 rpm)

9. Zentrifuge (3.000 g)
10. Inkubator bei 2 bis 8°C
11. Jeder Gamma-Counter, der 125I messen kann, kann verwendet werden. Maximale Messeffizienz sollte gewährleistet sein.

## **VII. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN**

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

## **VIII. AUFBEWAHRUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN**

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

## **IX. PROBENSAMMLUNG UND -VORBEREITUNG**

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

## **X. DURCHFÜHRUNG**

### **A. Bemerkungen zur Durchführung**

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

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

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

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

## **B. Vorbehandlungsschritt**

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

## **C. Variante des Vorbehandlungsverfahrens**

Bei Niereninsuffizienz empfehlen wir eine Variante des Extraktionsverfahrens.

- 1-8. Siehe Vorbehandlungsschritt.
9. Lagern Sie den neutralisierten Extrakt 1 Stunde lang bei -20°C, dann sofort 30 Minuten lang bei 4°C auf 3.000 g zentrifugieren.
10. Dekantieren Sie den Überstand in frische Röhrchen und führen Sie den Assay wie unten beschrieben durch.

## **D. Durchführung**

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

## **XI. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE**

1. Berechnen Sie den Durchschnitt aus den Doppelbestimmungen.

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

$$B/B_0 (\%) = \frac{\text{Aktivität (Kalibrator oder Probe)}}{\text{Aktivität (Null-Kalibrator)}} \times 100$$

3. Verwenden Sie semi-logarithmisches oder doppelt-logarithmisches Millimeterpapier (über 3 Größenordnungen) drucken Sie die (B/B<sub>0</sub>(%)) Werte für jeden Kalibratorpunkt als Funktion der SM-C-Konzentration für jeden Kalibratorpunkt, schließen Sie offensichtliche „Ausreißer“ aus.

4. Computergestützte Methoden können ebenfalls zur Erstellung der Kalibrationskurve verwendet werden. Falls die Ergebnisberechnung mit dem Computer durchgeführt wird, empfehlen wir die Berechnung mit einer „4 Parameter“-Kurvenfunktion.

5. Bestimmen Sie die SM-C-Konzentrationen der Proben über Interpolation der Probenwerte B/B<sub>0</sub>(%) der Referenzkurve.

6. Die auf der Kalibrierungskurve abgelesenen Werte müssen mit 35 multipliziert werden (Verdünnungsfaktor).

7. Bei jedem Assay muss der Prozentsatz des gesamten gebundenen Tracers ohne unmarkiertes SM-C (B<sub>0</sub>/T) geprüft werden.

## XII. TYPISCHE WERTE

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

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

## XIII. LEISTUNGSMERKMALE UND GRENZEN DER METHODIK

### A. Nachweisgrenze

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

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

### B. Spezifität

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

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

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

### C. Präzision

#### INTRA-ASSAY PRÄZISION INTER-ASSAY PRÄZISION

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

SD : Standardabweichung; CV: Variationskoeffizient

### D. Genauigkeit

#### VERDÜNNUNGSTEST

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

Die Proben wurden mit Null-Kalbrator verdünnt.

#### WIEDERFINDUNGSTEST

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

Umrechnungsfaktor:

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

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

#### **XIV. INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE**

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

#### **XV. ZU ERWARTENDER BEREICH**

Diese Werte sind nur Richtwerte; jedes Laor muss seinen eigene Normalwertbereich ermitteln.

Gesunde Personen

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

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

#### **XV. VORSICHTMASSNAHMEN UND WARNUNGEN**

##### Sicherheit

Nur für diagnostische Zwecke.

Dieser Kit enthält <sup>125</sup>I (Halbwertszeit: 60 Tagen) , das ionisierende X (28 keV) und  $\gamma$  (35.5 keV) Strahlungen emittiert.

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

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

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

Die menschlichen Blutkomponenten in diesem Kit wurden mit europäischen und in USA erprobten FDA-Methoden getestet, sie waren negativ für HBsAg, anti-HCV und anti-HIV 1 und 2. Keine bekannte Methode kann jedoch vollkommene Sicherheit liefern, dass menschliche Blutbestandteile nicht Hepatitis, AIDS oder andere Infektionen übertragen. Deshalb sollte der Umgang mit Reagenzien, Serum oder Plasmaproben in Übereinstimmung mit den Sicherheitsbestimmungen erfolgen. Alle tierischen Produkte und deren Derivate wurden von gesunden Tieren gesammelt. Komponenten von Rindern stammen aus Ländern in denen BSE nicht nachgewiesen wurde. Trotzdem sollten Komponenten, die tierische Substanzen enthalten, als potentiell ansteckend behandelt werden.

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

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

## **XVII. LITERATUR**

1. DAUGHADAY W.H. and ROTWEIN P. (1989)

**Insulin-like growth factors I and II. peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum and tissue concentrations.**

Endocrine Rev., 10(1) : 68-91.

2. FROESCH E.R. and ZAPF J. (1985)

**Insulin-like growth factors and insulin : comparative aspects.**

Diabetologia, 28 : 485-493.

3. FURLANETTO R.W., UNDERWOOD L., VAN WYK J.J., D'ERCOLE A.J. (1977)

**Estimation of somatomedin-C levels in normals and patients with pituitary disease by radioimmunoassay.**

J. Clin. Invest. 60 : 648.

4. ROSENFELD R.G., WILSON D.M., LEE P.D.K. and HINTZ R.L. (1986)

**Insulin-like growth factors I and II in evaluation of growth retardation.**

J. Pediatr., 109 : 428.

5. RUDMAN D., KUTNER M.H. and CHAWLA R.K. (1985)

**The short child with subnormal plasma somatomedin-C.**

Pediatric Res., 19(10) : 975-980.

6. ALBERTSSON-WIKLAND K. and HALL K. (1987)

**Growth hormone treatment in short children : relationship between growth and serum insulin-like growth factor I and II levels.**

J. Clin. Endocrinol Metab., 65 : 671.

7. WASS J.A.H., CLEMMONS D.R., UNDERWOOD L.E., BARROW L., BESSER G.M. and VAN WYK J.J. (1982)

**Changes in circulating somatomedin-C levels in bromocriptine treated acromegaly.**

Clin. Endocrinol., 17 : 369-377.

8. DAUGHADAY W.H., MARIZ I.K. and BLETHEN S.L. (1980)

**Inhibition of access of bound somatomedin to membrane receptor and immunobinding sites - a comparison of radioreceptor and radioimmunoassay of somatomedin in native and acid-ethanol extracted serum.**

J. Clin. Endocrinol. Metab., 51 : 781.

9. BREIERB.H., GALLAHER B.W. and GLUCKMAN P.D. (1991)

**Radioimmunoassay for insulin-like growth factor-I : solutions to some potential problems and pitfalls.**

Journal of Endocrinology, 128 : 347-357.

10. SCHOUTEN J.S.A.G. and al. (1993)

**IGF1 : a prognostic factor of knee osteoarthritis.**

British J. Rheumatol., 32 : 274-280.

11. GRONBAEK H., SKJAERBAEK C., NIELSEN B., FRYSTYK J., FOEGH M.L., FLYVBJERG A., ORSKOV H. (1995)

**Growth hormone and insulin-like growth factor-I: a suggested role in renal transplantation and graft vessel disease.**

Transplant. Proceed., 27/3 : 2133-2136.

12. TSITOURAS P.D., ZHONG Y.G., SPUNGEN A.M., BAUMAN W.A. (1995)

**Serum testosterone and growth hormone insulin-like growth factor-I in adults with spinal cord injury.**

Hormone and metabolic Research , 27/6 : 287-292.

13. KOCH A., DORR H.G., GERLING S., BEHRENS R., BOHLES H.J. (1995)

**Effect of growth hormone on IGF-I levels in patients with growth hormone deficiency and Wilson disease.**

Hormone Research, 44/1 : 40-44.

## XVIII.ZUSAMMENFASSUNG DES PROTOKOLLS

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

DIAsource Katalognummer : KIP1589	Beipackzettel- nummer : 1700478/de	Nummer der Originalausgabe : 110218/1
--------------------------------------	---------------------------------------	---