

Instruction

EURIA-Glucagon

Glucagon radioimmunoassay
For in vitro diagnostic use only



Document No.E-23-0002-16

February, 2016

EURIA-Glucagon

English:	page	2
Francais:	page	16
Espanol:	página	30
Deutsch:	Seite	44
Italiano:	pagina	58
Svenska:	sida.....	72

REF RB 310

IVD



INTRODUCTION

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

Glucagon is involved in carbohydrate, fat and protein metabolism. Basal amounts of glucagon are essential for the maintenance of normoglycemia and a physiological role for glucagon is to prevent hypoglycemia. Increases in the plasma glucagon level affect glucose production first by stimulating a transient phase of glycogenolysis and then a prolonged period of glyconeogenesis (4,5).

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

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

CLINICAL CONSIDERATIONS

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

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

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

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

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

PRINCIPLE OF THE METHOD

The intended use of these reagents is for assay of glucagon in human plasma. Glucagon in plasma is assayed by the competitive radioimmunoassay using a rabbit antiserum raised against a glucagon-albumin conjugate. Glucagon in standards and samples compete with ^{125}I -labelled glucagon in binding to the antibodies in a two steps incubation.

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

The antiserum used in this assay shows less than 0.1% cross reaction with gut-GLI (14). For professional use within a laboratory.

PRECAUTIONS

For in vitro diagnostic use only.

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

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

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

The following precautions should be observed when handling radioactive materials:

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

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

COMPOSITION OF THE REAGENT KIT

The reagents provided in each kit is sufficient for 100 tubes.

1. Anti-glucagon (Reagent A)

Rabbit antiserum raised against porcine glucagon, conjugated to human serum albumin. Lyophilized in 5.0 mL 2.0 M glycine buffer, pH 8.8, 2.5% human serum albumin, 0.5% sodium azide and aprotinin (Trasylo[®] or equivalent). Reconstitution in 52 mL distilled water. The reconstituted reagent contains 500 KIU aprotinin (Trasylo[®] or equivalent)/mL. Colour: Yellow.

2. ¹²⁵I-Glucagon (Reagent B)

Total radioactivity: 0.75 μ Ci or 28 KBq at reference date. Produced by iodination of synthetic human glucagon. HPLC-purified, monoiodinated.

Specific activity: 1700-2100 μ Ci/nmol (62-77 MBq/nmol). Lyophilized in 5.0 mL 2.0 M glycine buffer, pH 8.8, 2.5% human serum albumin, 0.5% sodium azide and aprotinin (Trasylo[®] or equivalent). Reconstitution in 52 mL distilled water. The reconstituted reagent contains 500 KIU aprotinin (Trasylo[®] or equivalent) /mL. Colour: Blue.

3. Double antibody solid phase (Reagent C)

Anti-rabbit-Ig coupled to cellulose particles in 0.01 M phosphate buffer pH 6.8 with 0.25% human serum albumin, 0.045% NaCl, 0.05% NaN₃, 0.185% EDTA and 0.05% Tween 80. Volume: 11 mL suspension.

4. Assay diluent (Reagent D)

50 mL of 0.2 M glycine buffer, pH 8.8, containing 0.25% human serum albumin, 0.05% sodium azide and 500 KIU aprotinin (Trasylo[®] or equivalent) /mL.

To be used for the preparation of glucagon working standards and instead of antiserum in non-specific binding control tubes.

5. Glucagon standard (Reagent E)

5.00 mL standard. Concentration: 300 pmol/L (1044 pg/mL) of synthetic human glucagon. Lyophilized in 0.2 M glycine buffer, pH 8.8, containing 0.25% human serum albumin, 0.05% sodium azide and 500 KIU aprotinin (Trasylo[®] or equivalent) /mL. Reconstitution in 5.00 mL distilled water.

6. Controls (Reagent F-G)

Lyophilized controls. 2.00 mL of each control after reconstitution. The glucagon concentrations of the controls are given on the labels of the vials.

Contains 0.05% sodium azide.

REAGENTS AND EQUIPMENT REQUIRED BUT NOT PROVIDED

Distilled water
Disposable test tubes of polystyrene: 11-13x55 mm
Pipettes with disposable tips: 200 and 500 μ L
Glass pipettes 1.00 mL and 5.00 mL (for standard preparation)
Vortex mixer
Centrifuge, refrigerated, giving a minimum of 1700 x g.
Gamma counter

REAGENT PREPARATION AND STORAGE

Store all reagents at 2-8° C before reconstitution and use.
The water used for reconstitution of the lyophilized reagents should be distilled in an all-glass apparatus or be of corresponding purity. Dissolve the contents in the vials by gentle inversion and avoid foaming.
The stability for each reagent is found on the label of the vial. For the lyophilized reagents the expiry date is valid for the unreconstituted reagents. The reconstituted reagents are stable for 10 weeks (or to the expiry date for the labelled glucagon) when stored according to the instructions below.

Reagent A: Anti-Glucagon

Reconstitute with 52 mL of distilled water.
Store at 2-8° C.

Reagent B: ¹²⁵I-Glucagon

Reconstitute with 52 mL of distilled water.
Store at -18° C or lower if reused.

Reagent C: Double antibody solid phase

Ready for use. Stir continuously during pipetting this reagent.
Store at 2-8° C.

Reagent D: Assay diluent

Ready for use. Store at 2-8° C.

Reagent E: Glucagon standard

Reconstitute with 5.00 mL distilled water.
Store at -18° C or lower if reused.

Reagent F-G: Controls

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

SPECIMEN COLLECTION

Vein blood is collected in tubes containing EDTA and aprotinin (Trasylo[®] or equivalent) (5000 KIU aprotinin (Trasylo[®] or equivalent) in a 10 mL vacutainer). The sample is cooled in an ice-bath immediately. Plasma is separated by centrifugation (refrigerated centrifuge is preferred). The plasma should be frozen within 2 hours and stored at -18° C or lower until assayed. Repeated freezing and thawing must be avoided.

ASSAY PROCEDURE

Reconstitute the reagents as specified. Accuracy in all pipetting steps is essential. All tests (standards, samples and controls) should be performed in duplicate. For an overview of the assay procedure see page 10.

A complete assay includes:

Standard (St-tubes): 7 concentrations: 0, 4.7, 9.4, 18.8, 37.5, 75, 150 pmol/L
(= 0, 16.3, 32.6, 65.3, 131, 261, 522 pg/mL).

Controls (C-tubes): Two different controls with known concentrations of glucagon for quality control.

Samples (S-tubes)

Tubes for determination of the **non-specific binding (NSB-tubes)**

Tubes for determination of the **total radioactivity added (TOT-tubes)**

1. Reconstitute the reagents according to the instructions.
2. Prepare the glucagon working standards by dilution of the 300 pmol/L standard (Reagent E) with the assay diluent (Reagent D) according to the following:
a/ 1.00 mL standard 300 pmol/L + 1.00 mL assay diluent = 150 pmol/L
b/ 1.00 mL standard 150 pmol/L + 1.00 mL assay diluent = 75 pmol/L
c/ 1.00 mL standard 75 pmol/L + 1.00 mL assay diluent = 37.5 pmol/L
d/ 1.00 mL standard 37.5 pmol/L + 1.00 mL assay diluent = 18.8 pmol/L
e/ 1.00 mL standard 18.8 pmol/L + 1.00 mL assay diluent = 9.4 pmol/L
f/ 1.00 mL standard 9.4 pmol/L + 1.00 mL assay diluent = 4.7 pmol/L
g/ Assay diluent = 0 pmol/L
Store the standard solutions a-g and Reagent E at -18° C or lower if reused.
3. Pipette 200 µL of the standards a-g, samples and controls in their respective tubes (duplicates).
4. Pipette 200 µL of the assay diluent in the NSB-tubes for standard.

5. Pipette 500 μ L anti-glucagon (Reagent A) in all tubes except the NSB- and TOT-tubes.
6. Pipette 500 μ L assay diluent (Reagent D) in the NSB-tubes.
7. Vortex-mix and incubate for 20-24 hours at 2-8° C.
8. Pipette 500 μ L 125 I-Glucagon (Reagent B) in all tubes. The TOT-tubes are sealed and kept aside.
9. Vortex-mix and incubate for 20-24 hours at 2-8° C.
10. Add 100 μ L double antibody solid phase (Reagent C) to all tubes except the TOT-tubes. Stir continuously during pipetting this reagent
11. Vortex-mix and incubate for 30-60 minutes at 2-8° C.
12. Centrifuge the tubes for 15 minutes at +4° C (1700 x g).
Note: The correct centrifugation force is important for accurate performance.
13. Decant the liquid immediately after centrifugation.
Note: The accurateness and coherency in handling of supernatants are crucial for the assay precision.
14. Count the radioactivity of the pellets in a gammacounter. The counting time should be at least 2 minutes.

CALCULATION OF RESULTS

1. Subtract the average count rate (CPM) of the non-specific binding tubes for standard from the count rate (CPM) of the replicates of the standard tubes, the sample tubes and control tubes.
2. A standard curve is generated by plotting the bound CPM (in CPM or % B/TOT) against the concentration of the glucagon standards.
3. Interpolate the glucagon concentrations in the samples and controls from the generated standard curve.
4. The standard curve and the calculation of the concentrations of the samples can be done by a suitable computer program. A spline algorithm may be used.
5. A typical standard curve is shown on page 11.
A typical run is shown on page 12.

QUALITY CONTROL

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

1. The found concentrations of the controls

The found concentrations of the controls (Reagent F and G) should be within the limits given on the labels of the vials.

2. Total counts

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

3. Maximum binding (Bo/TOT)

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

$$\frac{B_0}{TOT} \times 100 \%$$

4. Non-specific binding (NSB/TOT)

Calculate for each assay the % non-specific binding: $\frac{NSB}{TOT} \times 100$

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

5. Slope of standard curve

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

ASSAY CHARACTERISTICS

Sensitivity

The lowest detectable concentration in the assay is 3 pmol/L.

This figure corresponds to a decrease in binding of 2 x SD of the bound radioactivity in the zero-standard.

Precision

Intra assay variation:

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

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

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

Accuracy

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

Specificity

The following cross reactions have been found:

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

Correlation

Euria-Glucagon assay correlates with WHO 69/194 standard.

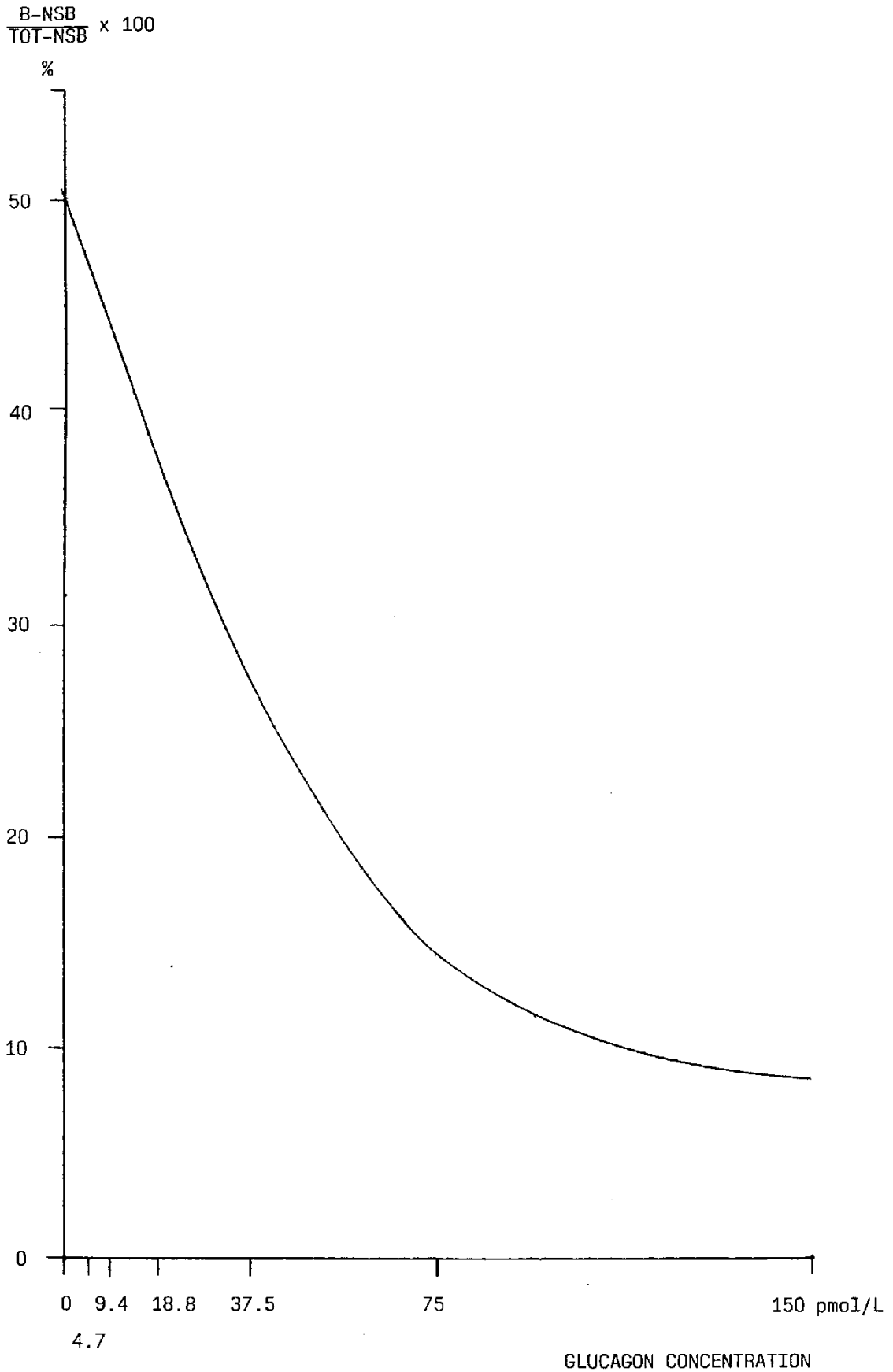
Interference

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

OUTLINE OF THE RIA PROCEDURE

Type of tubes	Tube no	Standard sample or control	Anti-glucagon (A)	Assay diluent (D)		¹²⁵ I-glucagon (B)		Double antibody solid phase (C)	
TOT	1-2	-	-	-	Vortex-mix and incubate for 20-24 hours at 2-8° C.	500 µL	Vortex-mix and incubate for 20-24 hours at 2-8° C.	-	Vortex-mix and incubate for 30-60 min. at 2-8° C. Centrifuge 15 min. at 1700 x g at +4° C. Decant and count the radioactivity of the precipitates.
NSB _{st}	3-4	200 µL	-	500		500 µL		100 µL	
Stand 0	5-6	200 µL	500 µL	-		500 µL		100 µL	
Stand 4.7	7-8	200 µL	500 µL	-		500 µL		100 µL	
Stand 9.4	9-10	200 µL	500 µL	-		500 µL		100 µL	
Stand 18.8	11-12	200 µL	500 µL	-		500 µL		100 µL	
Stand 37.5	13-14	200 µL	500 µL	-		500 µL		100 µL	
Stand 75	15-16	200 µL	500 µL	-		500 µL		100 µL	
Stand 150	17-18	200 µL	500 µL	-		500 µL		100 µL	
Control (F)	19-20	200 µL	500 µL	-		500 µL		100 µL	
Control (G)	21-22	200 µL	500 µL	-		500 µL		100 µL	
Sample 1 etc.	23-24	200 µL	500 µL	-		500 µL		100 µL	

EXAMPLE OF A GLUCAGON STANDARD CURVE



**TYPICAL DATA FOR GLUCAGON STANDARD CURVE AT
ACTIVITY REFERENCE DATE**

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

Control parameters

$\frac{B_0}{TOT} \times 100$: 48.0 %

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

ED 80 : 14.5 pmol/L




ED 50 : 39.8 pmol/L

ED 20 : 100 pmol/L

REFERENCES / RÉFÉRENCES / REFERENCIAS / LITERATUR / BIBLIOGRAFIA / REFERENSER

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

SYMBOLS USED ON LABELS / SYMBOLES UTILISÉS SUR LES ÉTIQUETTES / SIMBOLOS UTILIZADOS EN LAS ETIQUETAS / ERLÄUTERUNG DER SYMBOLE / SIMBOLI USATI SULLE ETICHETTE / SYMBOLER PÅ ETIKETTERNA

	Batch code. Numéro de lot. Número de lote. Chargen-Nummer. Numero di lotto. Satsnummer.
	Catalogue number. Référence catalogue. Número de catálogo. Katalog-Nummer. Numero di catalogo. Katalognummer.
	Use-by date. Date de péremption. Fecha de caducidad. Verfallsdatum. Usare entro. Använd före.
	Temperature limit. Seuils de températures. Rango de temperature. Temperaturbereich. Limitazioni di temperatura. Förvaringstemperatur.
	Date of manufacture. Date de fabrication. Fecha de fabricacion. Datum der Herstellung. Data di produzione. Tillverkningsdatum.
	Contains radioactive substances. Contient des substances radioactives. Contiene sustancias radiactivas. Enthält radioaktive Stoffe. Contiene sostanze radioattive. Innehåller radioaktiva ämnen.
	Biological risk. Risque biologique. Riesgo biológico. Biologische Gefährdung. Rishio biologico. Biologisk risk.
	Consult instructions for use. Lire le mode d'emploi. Consulte las instrucciones de uso. Gebrauchsanweisung beachten. Leggere le istruzioni per l'uso. Läs instruktionsmanualen.
	In vitro diagnostic medical device. Dispositif médical de diagnostic in vitro. Producto sanitario para diagnóstico in vitro. In-vitro-Diagnostikum. Dispositivo medico-diagnostico in vitro. In vitro diagnostik medicinsk utrustning.
	Manufacturer. Fabricant. Fabricante. Hersteller. Produttore. Tillverkare.
	Contains sufficient for 100 tests. Contenu suffisant pour 100 tests. Contenido suficiente para 100 pruebas. Inhalt ausreichend für 100 Tests. Contenuto sufficiente per 100 test. Innehåller tillräckligt för 100 test.
	Conformity to 98/79/EC on In Vitro Diagnostic Medical Device Directive. Conformément à la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro. La conformidad con la Directiva 98/79/CE sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro. Konform mit Richtlinie 98/79/EG zu In-vitro-Diagnostika. Conformità alla direttiva 98/79/CE relativa ai dispositivi medico-diagnostici in vitro. Överensstämmer med direktiv 98/79/EG för medicintekniska produkter

REAG	A	Ab		Anti-Glucagon. Anti-Glucagon. Anti-glucagón. Anti Glukagon. Anti Glucagone. Anti-Glucagon.
REAG	B	Ag	¹²⁵I	¹²⁵ I-Glucagon. ¹²⁵ I-Glucagon. Glucagón I- ¹²⁵ . ¹²⁵ I-Glucagon. Glucagone ¹²⁵ I. ¹²⁵ I-Glucagon
REAG	C	DASP		Double antibody solid phase. Phase solide à double anticorps.. Fase sólida de doble anticuerpo. Doppel-Antikörper-Festphase. Secondo anticorpo-fase solida. Dubbel antikropp fast fas
REAG	D	DIL	AS	Assay diluent. Diluant d'immunodosage. Diluyente. Assaypuffer. Diluyente.Spädningsbuffert
REAG	E	CAL	300	Glucagon standard 300 pmol/L. Standard de glucagon 300 pmol/L. Estándar de Glucagón 300 pmol/L. Glucagon standard 300 pmol/L. Standard di Glucagone 300 pmol/L. Glucagonstandard 300 pmol/L
REAG	F	CONTROL		Control, level 1 (low). Témoin, niveau 1 (bas). Control, nivel 1 (bajo). Kontrolle, Level 1 (niedrig). Controlli, Livello 1 (basso) Kontroll, nivå 1 (låg)
REAG	G	CONTROL		Control, level 2 (high). Témoin, niveau 2 (élevé). Control, nivel 2 (alto). Kontrolle, Level 2 (hoch). Controlli, Livello 2 (elevato) Kontroll, nivå 2 (hög)

EURIA-Glucagon

Dosage radio-immunologique du glucagon
À usage professionnel uniquement

INTRODUCTION

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

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

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

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

CONSIDÉRATIONS CLINIQUES

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

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

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

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

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

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

PRINCIPE DE LA MÉTHODE

Ces réactifs sont indiqués pour le dosage du glucagon dans le plasma humain. Le glucagon plasmatique est analysé par un dosage radio-immunologique compétitif intégrant un antisérum de lapin dirigé contre un conjugué de glucagon-albumine. Le glucagon des standards et des échantillons entre en concurrence avec le glucagon marqué ^{125}I pour se lier aux anticorps dans une incubation à deux étapes.

Le glucagon marqué ^{125}I se lie en proportion inverse à la concentration de glucagon des standards et des échantillons. Le glucagon ^{125}I lié à l'anticorps est séparé de la fraction non liée par une méthode de phase solide à double anticorps. La radioactivité de la fraction liée est mesurée par compteur de rayons gamma.

L'antisérum utilisé dans ce dosage indique une réaction croisée avec les GLI intestinales inférieure à 0,1% (14).

À usage professionnel en laboratoire.

PRÉCAUTIONS D'EMPLOI

À usage exclusif en diagnostic in vitro.

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

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

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

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

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

- Les déversements de matière radioactive devront être immédiatement essuyés et tous les matériels contaminés éliminés comme étant des déchets radioactifs. Les surfaces contaminées seront nettoyées à l'aide d'un détergent.

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

COMPOSITION DU KIT DE RÉACTIF

Les réactifs fournis dans chaque kit correspondent à des quantités suffisantes pour 100 tubes.

1. Anti-glucagon (Réactif A)

Antisérum de lapin dirigé contre du glucagon porcin, conjugué à de l'albumine sérique humaine. Lyophilisé dans un tampon de glycine 2 M de 5 ml (pH 8,8), 2,5% albumine sérique humaine, 0,5% d'azoture de sodium et du l'aprotinine (Trasylol® ou équivalent). Reconstitution dans 52 ml d'eau distillée. Le réactif reconstitué contient du l'aprotinine (Trasylol® ou équivalent) dosé à 500 KIU/ml. Couleur : Jaune.

2. Glucagon^{125I} (Réactif B)

Radioactivité totale : 0.75 μ Ci ou 28 kBq à la date de référence. Produite par l'iodation du glucagon synthétique humain. Purifié par HPLC, mono-iodé. Activité spécifique : 1700-2100 μ Ci/nmol (62-77 MBq/nmol). Lyophilisé dans un tampon de glycine 2 M de 5 ml (pH 8,8), 2,5% albumine sérique humaine, 0,5% d'azoture de sodium et du l'aprotinine (Trasylol® ou équivalent). Reconstitution dans 52 ml d'eau distillée. Le réactif reconstitué contient du l'aprotinine (Trasylol® ou équivalent) dosé à 500 KIU/ml. Couleur : Bleu.

3. Phase solide à double anticorps (Réactif C)

Anti-Ig de lapin couplée à des particules de cellulose avec 0,01 M tampon phosphate pH 6,8 avec 0,25% d'albumine sérique humaine, 0,045% de NaCl, 0,05% de NaN₃, 0,185% d'EDTA et 0,05% de Tween 80. Volume: Suspension de 11 ml.

4. Diluant d'immunodosage (Réactif D)

50 ml d'un tampon de glycine de 0,2 M (pH 8,8) contenant 0,25% d'albumine sérique humaine, 0,05% d'azoture de sodium et l'aprotinine (Trasylol® ou équivalent) dosé à 500 KIU/ml.

À utiliser dans la préparation des standards de travail de glucagon et en substitution à l'antisérum dans des tubes de témoin à liaison non-spécifique.

5. Standard de glucagon (Réactif E)

Standard de 5,00 ml. Concentration: 300 pmol/l (1044 pg/ml) de glucagon synthétique humain. Lyophilisé dans un tampon de glycine de 0,2 M (pH 8,8), contenant 0,25% d'albumine sérique humaine, 0,05% d'azoture de sodium et du l'aprotinine (Trasylol® ou équivalent) dosé à 500 KIU/ml. Reconstitution dans 5,00 ml d'eau distillée.

6. Témoins (Réactif F-G)

Témoins lyophilisés. 2,00 ml de chaque témoin après reconstitution. Les concentrations des témoins en glucagon sont indiqués sur les étiquettes des flacons. Contient 0,05% d'azoture de sodium.

RÉACTIFS ET MATÉRIELS NÉCESSAIRES ET NON FOURNIS

Eau distillée

Tubes à essai jetables en polystyrène : 11-13x55 mm

Pipettes à embouts jetables : 200 et 500 µl

Pipettes en verre de 1,00 ml et 5,00 ml (pour la préparation du standard)

Agitateur vortex

Centrifugeuse réfrigérée débit minimum 1700 x g.

Compteur de rayons gamma

PRÉPARATION ET ENTREPOSAGE DES RÉACTIFS

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

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

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

Réactif A: Anti-glucagon

Reconstituer dans 52 ml d'eau distillée.

Entreposer entre 2 et 8° C.

Réactif B: Glucagon^{125I}

Reconstituer dans 52 ml d'eau distillée.

Entreposer à -18° C ou à une température inférieure en cas de réutilisation.

Réactif C: Phase solide à double anticorps

Prêt à l'emploi. Agiter continuellement pendant le pipetage de ce réactif.

Entreposer entre 2 et 8° C.

Réactif D: Diluant d'immunodosage

Prêt à l'emploi. Entreposer entre 2 et 8° C.

Réactif E: Standard de glucagon

Reconstituer avec 5,00 ml d'eau distillée.

Entreposer à -18° C ou à une température inférieure en cas de réutilisation.

Réactif F-G: Témoins

Reconstituer avec 2,00 ml d'eau distillée. Entreposer à -18° C ou à une température inférieure en cas de réutilisation.

COLLECTE DE SPECIMENS

Le sang des veines est recueilli dans des tubes contenant de l'EDTA et du l'aprotinine (Trasylol® ou équivalent) (l'aprotinine dosé à 5000 KIU dans un Vacutainer de 10 ml). L'échantillon est immédiatement refroidi dans un bain de glace. Le plasma est séparé par centrifugation (de préférence par centrifugeuse réfrigérée). Le plasma doit être gelé dans les 2 heures qui suivent et entreposé à -18° C ou une température inférieure jusqu'au dosage. Éviter de congeler et décongeler à répétition.

PROCÉDURE DE DOSAGE

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

Voir la page 24 pour un aperçu de la procédure de dosage.

Un dosage complet comprend :

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

Témoins (C-tubes) : Deux témoins différents avec des concentrations de glucagon connues pour le contrôle qualité.

Échantillons (S-tubes)

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

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

1. Reconstituer les réactifs conformément aux instructions.
2. Préparer les standards de travail de glucagon en diluant le standard de 300 pmol/l (Réactif E) avec le diluant d'immunodosage (Réactif D) conformément aux indications suivantes :
 - a/ 1,00 ml de standard de 300 pmol/l + 1,00 ml de diluant d'immunodosage = 150 pmol/l
 - b/ 1,00 ml de standard de 150 pmol/l + 1,00 ml de diluant d'immunodosage = 75 pmol/l
 - c/ 1,00 ml de standard de 75 pmol/l + 1,00 ml de diluant d'immunodosage = 37,5 pmol/l
 - d/ 1,00 ml de standard de 37,5 pmol/l + 1,00 ml de diluant d'immunodosage = 18,8pmol/l
 - e/ 1,00 ml de standard de 18,8 pmol/l + 1,00 ml de diluant d'immunodosage = 9,4 pmol/l
 - f/ 1,00 ml de standard de 9,4 pmol/l + 1,00 ml de diluant d'immunodosage = 4,7 pmol/l
 - g/ Diluant d'immunodosage = 0 pmol/l

Entreposer les solutions de standard a-g et le réactif E à -18° C ou à des températures inférieures en cas de réutilisation.
3. Pipeter 200 µl des standards a-g, échantillons et témoins dans leur tubes respectifs (duplicates).

4. Pipeter 200 µl du diluant d'immunodosage dans les tubes NSB (liaison non-spécifique) pour le standard.
5. Pipeter 500 µl d'anti-glucagon (réactif A) dans tous les tubes à l'exception des tubes NSB et TOT-tubes
6. Pipeter 500 µl de diluant d'immunodosage (réactif D) dans les tubes NSB.
7. Vortexer et incubé pendant 20-24 heures à 2-8° C.
8. Pipeter 500 µl I de glucagon ¹²⁵I (réactif B) dans tous les tubes. Les TOT-tubes sont hermétiquement fermés et mis de côté.
9. Vortexer et incubé pendant 20-24 heures à 2-8° C.
10. Ajouter 100 µl I de phase solide à double anticorps (réactif C) à tous les tubes à l'exception des TOT-tubes. Agiter continuellement pendant le pipetage de ce réactif.
11. Vortexer et incubé pendant 30-60 minutes à 2-8° C.
12. Centrifuger les tubes pendant 15 minutes à +4° C (1700 x g).
Remarque : Il est nécessaire d'utiliser une force de centrifugation correcte pour obtenir des résultats exacts.
13. Décanter le liquide immédiatement après la centrifugation.
Remarque : Il est indispensable de faire preuve de précision et de cohérence dans la manipulation des surnageants afin de garantir l'exactitude du dosage.
14. Compter la radioactivité des granules avec un compteur de rayons gamma. Le temps de comptage doit être d'au moins 2 min.

CALCUL DES RÉSULTATS

1. Soustraire le taux de comptage moyen (CPM) des tubes de liaison non-spécifique pour le standard du taux de comptage (CPM) des réplicats des tubes de standard, des tubes d'échantillon et des tubes de témoin.
2. Une courbe standard est produite en reportant le tracé du CPM lié (en coups par minute ou % B/TOT) par rapport à la concentration des standards de glucagon.
3. Interpoler les concentrations de glucagon dans les échantillons et témoins à partir de la courbe standard produite.
4. La courbe standard et le calcul des concentrations des échantillons peuvent être effectués par un programme informatique approprié. Un algorithme de spline cubique peut être utilisé.
5. Une courbe standard typique figure en page 25.
Une série typique figure en page 26.

CONTRÔLE QUALITÉ

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

1. Les concentrations trouvées dans les témoins

Les concentrations trouvées dans les témoins (réactif F et G) devront se situer dans les limites figurant sur les étiquettes des flacons.

2. Coups totaux

Les coups obtenus doivent correspondre environ au CPM prévu une fois ajusté relativement à l'efficacité du compteur et à la décroissance radioactive. Le contenu de glucagon¹²⁵I de ce kit produira 10 500 CPM (-5, +30%) à la date de référence (efficacité de comptage : 80%).

3. Liaison maximale (Bo/TOT)

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

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

4. Liaison non-spécifique (NSB/TOT)

Calculer pour chaque dosage le % de liaison non-spécifique : $\frac{NSB}{TOT} \times 100$

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

5. Pente de la courbe standard

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

CARACTÉRISTIQUES DU DOSAGE

Sensibilité

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

Précision

Variation inter-dosages :

<u>Niveau</u>	<u>Coefficient de variation (%CV)</u>	<u>N</u>
16.4 pmol/l	8.1	30
60.1 pmol/l	4.5	30

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

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

Exactitude

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

On a trouvé les réactions croisées suivantes :

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

Correlation

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

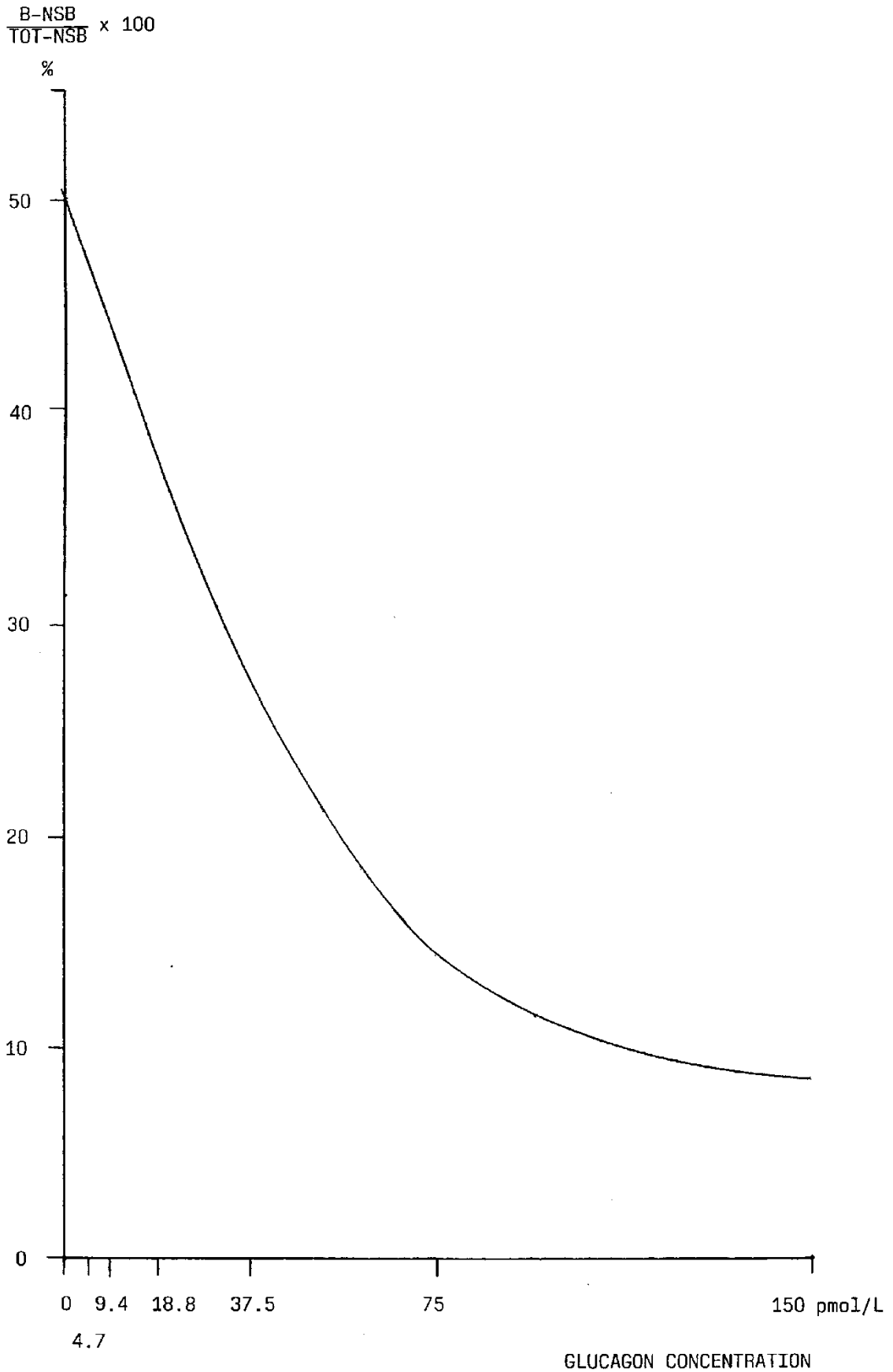
Interférence

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

CADRE DE LA PROCÉDURE RIA

Type de tubes	Tube (n°)	Standard échantillon ou témoin	Anti-glucagon (A)	Diluant d'immunos dosage (D)		Glucagon ^{125}I (B)		Phase solide à double anticorps (C)	
TOT	1-2	-	-	-	Vortexer	500 μl	Vortexer	-	Vortexer et
NSB _{st}	3-4	200 μl	-	500	et	500 μl	et	100 μl	incuber
Stand 0	5-6	200 μl	500 μl	-	incuber	500 μl	incuber	100 μl	pendant
Stand 4,7	7-8	200 μl	500 μl	-	pendant	500 μl	pendant	100 μl	30-60
Stand 9,4	9-10	200 μl	500 μl	-	20-24	500 μl	20-24	100 μl	mn. à
Stand 18,8	11-12	200 μl	500 μl	-	heures à	500 μl	heures à	100 μl	2-8° C.
Stand 37,5	13-14	200 μl	500 μl	-	2-8° C.	500 μl	2-8° C.	100 μl	Centrifuger
Stand 75	15-16	200 μl	500 μl	-		500 μl		100 μl	15 mn. à
Stand 150	17-18	200 μl	500 μl	-		500 μl		100 μl	1700 x g à
Témoin (F)	19-20	200 μl	500 μl	-		500 μl		100 μl	+4° C.
Témoin (G)	21-22	200 μl	500 μl	-		500 μl		100 μl	Décarter et
Échantillon 1	23-24	200 μl	500 μl	-		500 μl		100 μl	compter la
etc.		200 μl	500 μl	-		500 μl		100 μl	radioactivi- té des précipités.

EXAMPLE OF A GLUCAGON STANDARD CURVE



DONNÉES TYPIQUES DE LA COURBE STANDARD DU GLUCAGON À LA DATE DE RÉFÉRENCE DE L'ACTIVITÉ

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

Paramètres de contrôle

$\frac{B_0}{TOT} \times 100 : 48.0 \%$

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

S 80 : 14,5 pmol/l




S 50 : 39,8 pmol/l

S 20 : 100 pmol/l

REFERENCES / RÉFÉRENCES / REFERENCIAS / LITERATUR / BIBLIOGRAFIA / REFERENSER

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

SYMBOLS USED ON LABELS / SYMBOLES UTILISÉS SUR LES ÉTIQUETTES / SIMBOLOS UTILIZADOS EN LAS ETIQUETAS / ERLÄUTERUNG DER SYMBOLE / SIMBOLI USATI SULLE ETICHETTE / SYMBOLER PÅ ETIKETTERNA

	Batch code. Numéro de lot. Número de lote. Chargen-Nummer. Numero di lotto. Satsnummer.
	Catalogue number. Référence catalogue. Número de catálogo. Katalog-Nummer. Numero di catalogo. Katalognummer.
	Use-by date. Date de péremption. Fecha de caducidad. Verfallsdatum. Usare entro. Använd före.
	Temperature limit. Seuils de températures. Rango de temperature. Temperaturbereich. Limitazioni di temperatura. Förvaringstemperatur.
	Date of manufacture. Date de fabrication. Fecha de fabricacion. Datum der Herstellung. Data di produzione. Tillverkningsdatum.
	Contains radioactive substances. Contient des substances radioactives. Contiene sustancias radiactivas. Enthält radioaktive Stoffe. Contiene sostanze radioattive. Innehåller radioaktiva ämnen.
	Biological risk. Risque biologique. Riesgo biológico. Biologische Gefährdung. Rishio biologico. Biologisk risk.
	Consult instructions for use. Lire le mode d'emploi. Consulte las instrucciones de uso. Gebrauchsanweisung beachten. Leggere le istruzioni per l'uso. Läs instruktionsmanualen.
	In vitro diagnostic medical device. Dispositif médical de diagnostic in vitro. Producto sanitario para diagnóstico in vitro. In-vitro-Diagnostikum. Dispositivo medico-diagnostico in vitro. In vitro diagnostik medicinsk utrustning.
	Manufacturer. Fabricant. Fabricante. Hersteller. Produttore. Tillverkare.
	Contains sufficient for 100 tests. Contenu suffisant pour 100 tests. Contenido suficiente para 100 pruebas. Inhalt ausreichend für 100 Tests. Contenuto sufficiente per 100 test. Innehåller tillräckligt för 100 test.
	Conformity to 98/79/EC on In Vitro Diagnostic Medical Device Directive. Conformément à la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro. La conformidad con la Directiva 98/79/CE sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro. Konform mit Richtlinie 98/79/EG zu In-vitro-Diagnostika. Conformità alla direttiva 98/79/CE relativa ai dispositivi medico-diagnostici in vitro. Överensstämmer med direktiv 98/79/EG för medicintekniska produkter

REAG	A	Ab		Anti-Glucagon. Anti-Glucagon. Anti-glucagón. Anti Glukagon. Anti Glucagone. Anti-Glucagon.
REAG	B	Ag	¹²⁵I	¹²⁵ I-Glucagon. ¹²⁵ I-Glucagon. Glucagón I- ¹²⁵ . ¹²⁵ I-Glukagon. Glucagone ¹²⁵ I. ¹²⁵ I-Glucagon
REAG	C	DASP		Double antibody solid phase. Phase solide à double anticorps.. Fase sólida de doble anticuerpo. Doppel-Antikörper-Festphase. Secondo anticorpo-fase solida. Dubbel antikropp fast fas
REAG	D	DIL	AS	Assay diluent. Diluant d'immunodosage. Diluyente. Assaypuffer. Diluente.Spädningsbuffert
REAG	E	CAL	300	Glucagon standard 300 pmol/L. Standard de glucagon 300 pmol/L. Estándar de Glucagón 300 pmol/L. Glucagon standard 300 pmol/L. Standard di Glucagone 300 pmol/L. Glucagonstandard 300 pmol/L
REAG	F	CONTROL		Control, level 1 (low). Témoin, niveau 1 (bas). Control, nivel 1 (bajo). Kontrolle, Level 1 (niedrig). Controlli, Livello 1 (basso) Kontroll, nivå 1 (låg)
REAG	G	CONTROL		Control, level 2 (high). Témoin, niveau 2 (élevé). Control, nivel 2 (alto). Kontrolle, Level 2 (hoch). Controlli, Livello 2 (elevato) Kontroll, nivå 2 (hög)

EURIA-Glucagon

Radioinmunoensayo de glucagón
Sólo para uso profesional

INTRODUCCIÓN

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

El glucagón está implicado en el metabolismo de los hidratos de carbono, las grasas y las proteínas. Los niveles basales de glucagón son fundamentales para el mantenimiento de la normoglucemia, y una de las funciones fisiológicas del glucagón es la prevención de la hipoglucemia. El incremento del nivel de glucagón en plasma repercute sobre la producción de glucosa, primero estimulando la fase transitoria de glucogenolisis y después un período prolongado de gluconeogénesis (4,5).

Un incremento mantenido del nivel de glucagón permite modular la producción de glucosa hepática (6).

El glucagón también desempeña un papel en el metabolismo de los aminoácidos. El incremento del nivel de glucagón en plasma disminuye los aminoácidos, mientras que la deficiencia de glucagón incrementa los aminoácidos (7,8,9). La secuencia de aminoácidos del glucagón pancreático humano es: His-Ser-Gln-Gli-Tre-Fen-Tre-Ser-Asp-Tir-Ser-Lis-Tir-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Fen-Val-Gln-Tre-Leu-Met-Asn-Tre.

CONSIDERACIONES CLÍNICAS

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

La pancreatomía no provoca una deficiencia total de glucagón. De todos modos, en los pacientes a quienes se les ha practicado una pancreatomía, las concentraciones en plasma de glucagón son significativamente más bajas de lo normal (7, 10).

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

Nivel normal de glucagón en plasma después de 12 horas de ayuno: <60 pmol/l (obtenido con este método).

Se recomienda que los usuarios establezcan rangos de referencia para las poblaciones a las que atienden en sus propios laboratorios.

No se debe utilizar la prueba como única base para la toma de decisiones en el tratamiento clínico, sino que debe utilizarse en combinación con los síntomas clínicos y los resultados de otras pruebas disponibles.

PRINCIPIO DEL MÉTODO

La aplicación de estos reactivos es la determinación del nivel de glucagón en plasma humano. El glucagón en plasma se mide mediante un radioinmunoensayo competitivo en el que se utiliza antisuero de conejo que se enfrenta a un glucagón conjugado con albúmina. El glucagón de los estándares y muestras compite con el glucagón marcado con I^{125} en la fijación a los anticuerpos en una incubación en dos pasos.

El glucagón I^{125} se fija en proporción inversa a la concentración de glucagón de los estándares y muestras. El glucagón I^{125} fijado a los anticuerpos se separa de la fracción no fijada utilizando una fase sólida de doble anticuerpo. La radiactividad de la fracción fijada se mide con un contador gamma.

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

Sólo para uso profesional en el laboratorio

PRECAUCIONES

Sólo para uso en diagnóstico in vitro.

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

Este kit contiene componentes de origen humano. Todos ellos han sido analizados mediante inmunoensayos para el antígeno de superficie de la hepatitis B, los anticuerpos del HCV y los anticuerpos del HIV-1 y HIV-2, dando todos ellos negativo. De todos modos, se deben observar todas las precauciones recomendadas para manipular cualquier derivado de la sangre.

Este kit contiene I^{125} (vida media: 60 días) emisor de rayos X (28 keV) y de rayos γ (35.5 keV) ionizantes. Se deben seguir los pasos necesarios para garantizar la correcta manipulación del material radiactivo de acuerdo con la normativa local y/o nacional vigente. Sólo debería tener acceso a los reactivos el personal autorizado.

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

- El material radiactivo debe almacenarse en áreas especialmente diseñadas a tal efecto, normalmente no accesibles para el personal no autorizado.
- La manipulación del material radiactivo debe realizarse solamente en áreas autorizadas.
- Debe tenerse mucho cuidado a fin de evitar la ingesta del material y el contacto del material con la piel y la ropa. No pipetear soluciones radiactivas con la boca.
- En los lugares donde se está utilizando material radiactivo, debe estar prohibido beber, comer o fumar.
- Las manos se deben proteger con guantes y deben lavarse después de utilizar materiales radiactivos.
- El trabajo se debe realizar sobre una superficie cubierta de un material absorbente desechable.

- En caso de derrame, el material radiactivo debe recogerse inmediatamente y todos los materiales contaminados deben ser eliminados como residuos radiactivos. Las superficies contaminadas deben limpiarse con detergente.

Los reactivos en este kit contienen azida sódica. La azida sódica puede reaccionar con el plomo y el cobre de las tuberías formando azidas metálicas altamente explosivas. Al eliminar los reactivos en el sistema de cañerías, verter siempre abundante agua a chorro para evitar la formación de azidas metálicas. Las tuberías que se sospeche que se han contaminado con estos depósitos explosivos deberían limpiarse a fondo con una solución del 10% de hidróxido de sodio.

COMPOSICIÓN DEL KIT

Los reactivos que contiene cada kit son suficientes para 100 tubos.

1. Anti-glucagón (Reactivo A)

Antisuero de conejo enfrentado a glucagón porcino conjugado con albúmina de suero humano. Liofilizado en 5 ml de tampón glicina 2 M y pH de 8,8, 2,5% de albúmina de suero humano, 0,5% de azida sódica y aprotinina (Trasylol® o equivalente). Reconstitución en 52 ml de agua destilada. El reactivo reconstituido contiene 500 KIU de aprotinina (Trasylol® o equivalente)/ml. Color: Amarillo

2. Glucagón I¹²⁵ (Reactivo B)

Radiactividad total: 0,75 µCi o 28 KBq en la fecha de referencia. Producido mediante iodación de glucagón humano sintético. Purificado mediante HPLC y monoiodinado. Actividad específica: 1700-2100 µCi/nmol (62-77 MBq/nmol). Liofilizado en 5 ml de tampón glicina 2 M y pH de 8,8, 2,5% de albúmina de suero humano, 0,5% de azida sódica y aprotinina (Trasylol® o equivalente). Reconstituir en 52 ml de agua destilada. El reactivo reconstituido contiene 500 KIU de aprotinina (Trasylol® o equivalente) /ml. Color: Azul

3. Fase sólida de doble anticuerpo (Reactivo C)

Anti Ig de conejo unido a partículas de celulosa con 0,01 M tampón fosfato pH 6,8 con 0,25% de albúmina de suero humano, 0,045% de NaCl, 0,05% de NaN₃, 0,185% de EDTA y 0,05% de Tween 80.

Volumen: suspensión de 11 ml.

4. Diluyente del ensayo (Reactivo D)

50 ml de tampón glicina de 0,2 M y pH de 8,8, que contiene 0,25% de albúmina de suero humano, 0,05% de azida sódica y 500 KIU de aprotinina (Trasylol® o equivalente) /ml. Se utiliza para preparar los estándares de trabajo del glucagón y en lugar del antisuero, en los tubos de control de fijación no específica (NSB).

5. Estándar de glucagón (Reactivo E)

5 ml de estándar. Concentración: 300 pmol/l (1044 pg/ml) de glucagón humano sintético. Liofilizado en tampón glicina de 0,2 M y pH de 8,8, que contiene 0,25% de albúmina de suero humano, 0,05% de azida sódica y 500 KIU de aprotinina (Trasylol® o equivalente) /ml. Reconstituir en 5 ml de agua destilada.

6. Controles (Reactivos F-G)

Controles liofilizados. 2 ml de cada control después de la reconstitución. Las concentraciones de glucagón de los controles figuran en las etiquetas de los viales. Contiene 0,05% de azida sódica.

REACTIVOS Y EQUIPO REQUERIDO PERO NO SUMINISTRADO

Agua destilada

Tubos de ensayo de poliestireno desechables de 11-13 x 55 mm.

Pipetas con puntas desechables: 200 y 500 μ L

Pipetas de vidrio de 1 ml y 5 ml (para preparación de los estándares)

Agitador

Centrífuga refrigerada, con un mínimo de 1700 x g.

Contador de gamma

PREPARACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE LOS REACTIVOS

Conservar todos los reactivos a 2-8° C antes de la reconstitución y el uso.

El agua utilizada en la reconstitución de los reactivos liofilizados debe destilarse dentro de un aparato que sea enteramente de vidrio o bien ser de la pureza correspondiente. Disolver el contenido de los frascos invirtiéndolos con suavidad y evitando que se forme espuma.

La estabilidad de cada reactivo viene representada en la etiqueta del vial. En lo que se refiere a los reactivos liofilizados, la fecha de caducidad es válida para los reactivos no reconstituidos. Una vez reconstituidos, los reactivos son estables durante 10 semanas o hasta la fecha de caducidad que figura en el vial si se conservan tal y como se describe a continuación.

Reactivo A: Anti-Glucagón

Reconstituir con 52 ml de agua destilada.

Conservar a 2-8° C.

Reactivo B: Glucagón I¹²⁵

Reconstituir con 52 ml de agua destilada.

Conservar a -18° C o a temperatura inferior en caso de reutilización.

Reactivo C: Fase sólida de doble anticuerpo

Listo para el uso. Agitar continuamente el reactivo mientras se pipetea.

Conservar a 2-8° C.

Reactivo D: Diluyente del ensayo

Listo para el uso. Conservar a 2-8° C.

Reactivo E: Estándar de Glucagón

Reconstituir con 5 ml de agua destilada.

Conservar a -18° C o a temperatura inferior en caso de reutilización.

Reactivos F-G: Controles

Reconstituir con 2 ml de agua destilada. Conservar a -18° C o a temperatura inferior en caso de reutilización.

RECOGIDA DE LA MUESTRA

La sangre venosa se recoge en tubos que contienen EDTA y aprotinina (Trasylo[®] o equivalente) (5000 KIU aprotinina (Trasylo[®] o equivalente) en un vacutainer de 10 ml). La muestra se enfría inmediatamente en un baño de hielo. El plasma se separa por centrifugación (se recomienda centrifugación refrigerada). El plasma debería congelarse en un plazo máximo de 2 horas y conservarse a -18° C o a temperatura inferior hasta que sea analizado. Se debe evitar la congelación y descongelación repetida de las muestras.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

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

Para una perspectiva del procedimiento del ensayo ver la página 38.

Un ensayo completo incluye:

Estándar (Tubos St): 7 concentraciones: 0, 4.7, 9.4, 18.8, 37.5, 75, 150 pmol/l (= 0, 16.3, 32.6, 65.3, 131, 261, 522 pg/ml).

Controles (tubos C): Dos controles diferentes con concentraciones conocidas de glucagón para el control de calidad.

Muestras (Tubos S)

Tubos para la determinación de la **fijación no específica (tubos NSB)**

Tubos para la determinación de la **radiactividad total** añadida (**tubos TOT**).

1. Reconstituir los reactivos siguiendo las instrucciones siguientes.
2. Preparar los estándares de trabajo de glucagón diluyendo el estándar de 300 pmol/l (Reactivo E) con el diluyente (Reactivo D) de acuerdo con las siguientes indicaciones:
 - a/ 1 ml de estándar de 300 pmol/l + 1 ml de diluyente = 150 pmol/l
 - b/ 1 ml de estándar de 150 pmol/l + 1 ml de diluyente = 75 pmol/l
 - c/ 1 ml de estándar de 75 pmol/l + 1 ml de diluyente = 37,5 pmol/l
 - d/ 1 ml de estándar de 37,5 pmol/l + 1 ml de diluyente = 18,8 pmol/l
 - e/ 1 ml de estándar de 18,8 pmol/l + 1 ml de diluyente = 9,4 pmol/l
 - f/ 1 ml de estándar de 9,4 pmol/l + 1 ml de diluyente = 4,7 pmol/l
 - g/ Diluyente = 0 pmol/l

Conservar las soluciones estándar a-g y el Reactivo E a -18° C o a temperatura inferior en caso de reutilización.
3. Pipetear 200 µL de los estándares a-g, muestras y controles en sus respectivos tubos (duplicados).
4. Pipetear 200 µL del diluyente en tubos NSB de los estándares.
5. Pipetear 500 µL de anti-glucagón (Reactivo A) en todos los tubos exceptuando los tubos NSB y TOT.
6. Pipetear 500 µL de diluyente (Reactivo D) en los tubos NSB.
7. Agitar e incubar durante 20-24 horas a 2-8° C.

8. Pipetear 500 μL de glucagón I^{125} (Reactivo B) en todos los tubos. Tapar y guardar aparte los tubos TOT.
9. Agitar e incubar durante 20-24 horas a 2-8° C.
10. Añadir 100 μL de fase sólida de doble anticuerpo (Reactivo C) en todos los tubos excepto los tubos TOT. Agitar continuamente el reactivo mientras se pipetea.
11. Agitar e incubar durante 30-60 minutos a 2-8° C.
12. Centrifugar los tubos durante 15 minutos a +4° C (a 1700 xg)
Nota: La fuerza de centrifugación correcta es importante para un rendimiento exacto.
13. Decantar el líquido inmediatamente después de la centrifugación.
Nota: La exactitud y la coherencia en la manipulación de los sobrenadantes son cruciales para la precisión del ensayo.
14. Contar la radiactividad de los precipitados utilizando un contador gamma. El tiempo de conteo debería ser por lo menos de 2 minutos.

CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

1. Restar la media de las CPM de los tubos de fijación no específica (NSB) de la media de las CPM de los duplicados de los tubos estándar, de los tubos de las muestras y de los controles.
2. Se puede obtener una curva estándar representando gráficamente la CPM fijada (en CPM o % B/TOT) en función de la concentración de los estándares de glucagón.
3. Interpolar las concentraciones de glucagón de las muestras y controles a partir de la curva estándar obtenida.
4. La curva estándar y el cálculo de las concentraciones de las muestras también se puede realizar utilizando procedimientos informáticos. También puede utilizarse un algoritmo spline.
5. En la página 39 se muestra una curva estándar típica.
Un ensayo típico se muestra en la página 40.

CONTROL DE CALIDAD

Para que el laboratorio pueda monitorizar completamente el rendimiento consistente del radioinmunoensayo, hay algunos factores importantes que se deben comprobar.

1. Las concentraciones detectadas en los controles

Las concentraciones detectadas en los controles (Reactivos F y G) deben estar dentro de los límites que figuran en las etiquetas de los viales.

2. Cuentas totales

Las cuentas totales obtenidas deberían aproximarse a las CPM esperadas teniendo en cuenta la eficiencia de conteo y el deterioro radiactivo. El contenido de Glucagón I-¹²⁵ de este kit dará unas cuentas totales de 12.900 CPM (-5, +10%) en la fecha de fabricación (eficacia de conteo: 80%).

3. Máxima fijación (Bo/TOT)

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

$$\frac{B_0}{TOT} \times 100 \%$$

4. Fijación no específica (NSB/TOT)

Calcular para cada ensayo la fijación no específica $\frac{NSB}{TOT} \times 100$

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

5. Pendiente de la curva estándar

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

CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

Sensibilidad

La concentración mínima detectable es de 3 pmol/l.

Esta cifra corresponde a una reducción de la fijación de 2 x SD de la radiactividad fijada correspondiente al estándar de concentración cero.

Precisión

Variación intra-ensayo

<u>Nivel</u>	<u>Coefficiente de Variación (%CV)</u>	<u>N</u>
16.4 pmol/l	8.1	30
60.1 pmol/l	4.5	30

Variación total (sumándolas variaciones intra e inter-ensayos):

<u>Nivel</u>	<u>Coefficiente de Variación (%CV)</u>	<u>N</u>
25.4 pmol/l	6.8	6
22.0 pmol/l	7.4	6
23.0 pmol/l	8.3	5
73.9 pmol/l	3.9	6
97.9 pmol/l	5.6	6

Recuperación

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

Especificidad

Se han detectado las siguientes reacciones cruzadas:

<u>Péptido</u>	<u>Reacción cruzada</u>
Glucagón, pancreático, human	100%
GLI intestinal	<0,1%
Secretina	<0,02%
Colecistoquinina -39	<0,02%
Péptido intestinal vasoactivo	<0,02%
Péptido inhibidor gástrico	<0,02%
GLP 1	<0,1%
Oxintomodulina	<0,1%

Correlación

EURIA –El ensayo Glucagón se correlaciona con la OMS 69/194 estándar.

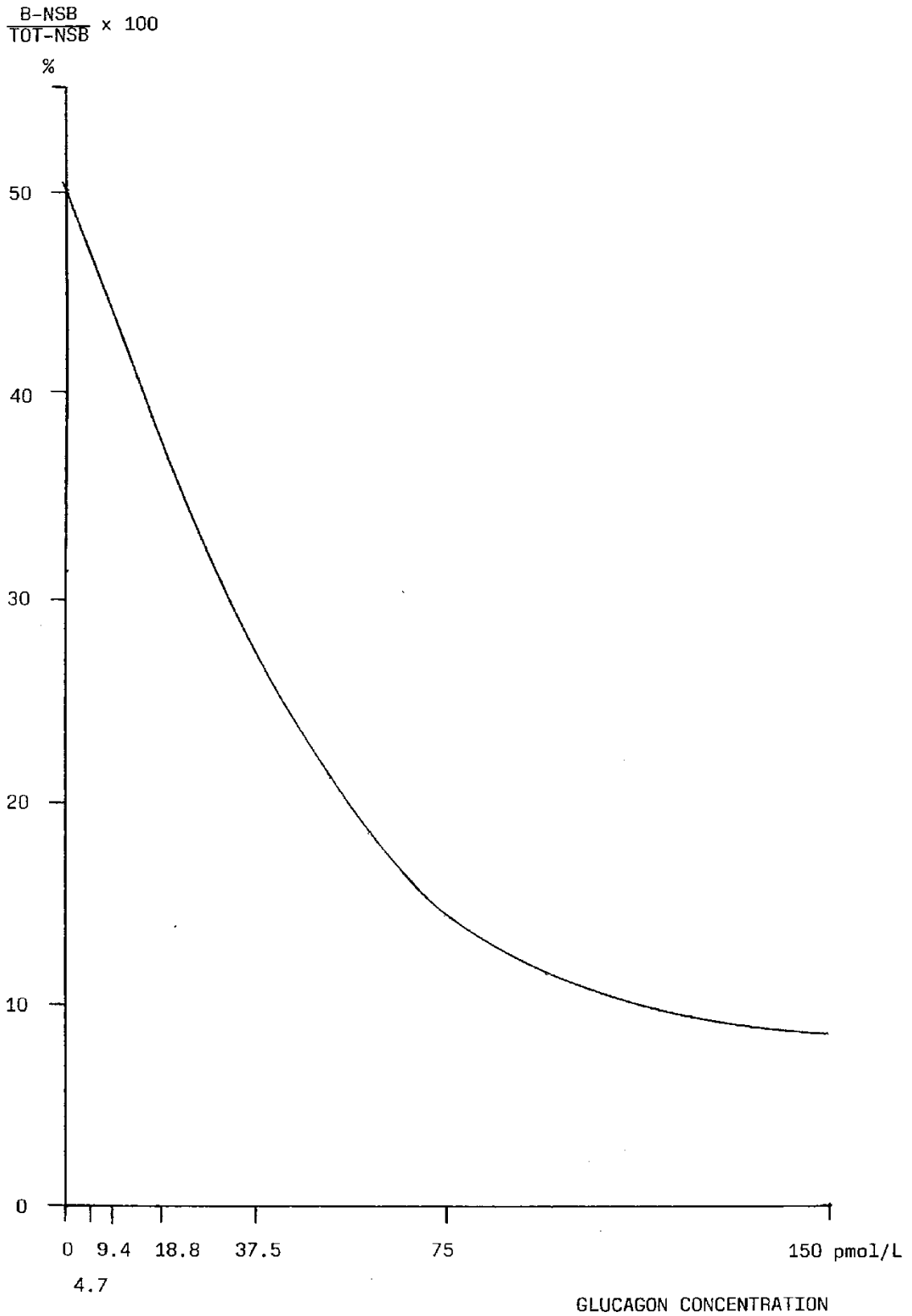
Interferencia

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

TABLA RESUMEN DEL PROCEDIMIENTO RIA

Tipo de tubos	Tubo no	Muestra Estándar o control	Anti-glucagón (A)	Diluyente (D)		Glucagón I- ¹²⁵ (B)		Fase sólida de doble anticuerpo (C)	
TOT	1-2	-	-	-	Mezclar con el agitador e incubar durante 20-24 horas a 2-8° C.	500 µL	Mezclar con el agitador e incubar durante 20-24 horas a 2-8° C.	-	Mezclar con el agitador e incubar durante 30-60 minutos a 2-8° C. Centrifugar durante 15 minutos a 1700 xg a +4° C. Decantar y contar la radiactividad de los precipitados.
NSB _{st}	3-4	200 µL	-	500		500 µL		100µL	
Estánd 0	5-6	200 µL	500 µL	-		500 µL		100µL	
Estánd 4,7	7-8	200 µL	500 µL	-		500 µL		100µL	
Estánd 9,4	9-10	200 µL	500 µL	-		500 µL		100µL	
Estánd 18,8	11-12	200 µL	500 µL	-		500 µL		100µL	
Estánd 37,5	13-14	200 µL	500 µL	-		500 µL		100µL	
Estánd 75	15-16	200 µL	500 µL	-		500 µL		100µL	
Estánd 150	17-18	200 µL	500 µL	-		500 µL		100µL	
Control (F)	19-20	200 µL	500 µL	-		500 µL		100µL	
Control (G)	21-22	200 µL	500 µL	-		500 µL		100µL	
Muestra 1 etc.	23-24	200 µL	500 µL	-		500 µL		100µL	

EXAMPLE OF A GLUCAGON STANDARD CURVE



DATOS TÍPICOS DE UNA CURVA ESTÁNDAR PARA EL GLUCAGÓN EN LA LA FECHA DE REFERENCIA DE LA RADIOACTIVIDAD

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

Parámetros de Control

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

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

ED 80 : 14,5 pmol/l

ED 50 : 39,8 pmol/l

ED 20 : 100 pmol/l

REFERENCES / RÉFÉRENCES / REFERENCIAS / LITERATUR / BIBLIOGRAFIA / REFERENSER

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

SYMBOLS USED ON LABELS / SYMBOLES UTILISÉS SUR LES ÉTIQUETTES / SIMBOLOS UTILIZADOS EN LAS ETIQUETAS / ERLÄUTERUNG DER SYMBOLE / SIMBOLI USATI SULLE ETICHETTE / SYMBOLER PÅ ETIKETTERNA

	Batch code. Numéro de lot. Número de lote. Chargen-Nummer. Numero di lotto. Satsnummer.
	Catalogue number. Référence catalogue. Número de catálogo. Katalog-Nummer. Numero di catalogo. Katalognummer.
	Use-by date. Date de péremption. Fecha de caducidad. Verfallsdatum. Usare entro. Använd före.
	Temperature limit. Seuils de températures. Rango de temperature. Temperaturbereich. Limitazioni di temperatura. Förvaringstemperatur.
	Date of manufacture. Date de fabrication. Fecha de fabricacion. Datum der Herstellung. Data di produzione. Tillverkningsdatum.
	Contains radioactive substances. Contient des substances radioactives. Contiene sustancias radiactivas. Enthält radioaktive Stoffe. Contiene sostanze radioattive. Innehåller radioaktiva ämnen.
	Biological risk. Risque biologique. Riesgo biológico. Biologische Gefährdung. Rishio biologico. Biologisk risk.
	Consult instructions for use. Lire le mode d'emploi. Consulte las instrucciones de uso. Gebrauchsanweisung beachten. Leggere le istruzioni per l'uso. Läs instruktionsmanualen.
	In vitro diagnostic medical device. Dispositif médical de diagnostic in vitro. Producto sanitario para diagnóstico in vitro. In-vitro-Diagnostikum. Dispositivo medico-diagnostico in vitro. In vitro diagnostik medicinsk utrustning.
	Manufacturer. Fabricant. Fabricante. Hersteller. Produttore. Tillverkare.
	Contains sufficient for 100 tests. Contenu suffisant pour 100 tests. Contenido suficiente para 100 pruebas. Inhalt ausreichend für 100 Tests. Contenuto sufficiente per 100 test. Innehåller tillräckligt för 100 test.
	Conformity to 98/79/EC on In Vitro Diagnostic Medical Device Directive. Conformément à la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro. La conformidad con la Directiva 98/79/CE sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro. Konform mit Richtlinie 98/79/EG zu In-vitro-Diagnostika. Conformità alla direttiva 98/79/CE relativa ai dispositivi medico-diagnostici in vitro. Överensstämmer med direktiv 98/79/EG för medicintekniska produkter

REAG	A	Ab		Anti-Glucagon. Anti-Glucagon. Anti-glucagón. Anti Glukagon. Anti Glucagone. Anti-Glucagon.
REAG	B	Ag	¹²⁵I	¹²⁵ I-Glucagon. ¹²⁵ I-Glucagon. Glucagón I- ¹²⁵ . ¹²⁵ I-Glukagon. Glucagone ¹²⁵ I. ¹²⁵ I-Glucagon
REAG	C	DASP		Double antibody solid phase. Phase solide à double anticorps.. Fase sólida de doble anticuerpo. Doppel-Antikörper-Festphase. Secondo anticorpo-fase solida. Dubbel antikropp fast fas
REAG	D	DIL	AS	Assay diluent. Diluant d'immunodosage. Diluyente. Assaypuffer. Diluente.Spädningsbuffert
REAG	E	CAL	300	Glucagon standard 300 pmol/L. Standard de glucagon 300 pmol/L. Estándar de Glucagón 300 pmol/L. Glucagon standard 300 pmol/L. Standard di Glucagone 300 pmol/L. Glucagonstandard 300 pmol/L
REAG	F	CONTROL		Control, level 1 (low). Témoin, niveau 1 (bas). Control, nivel 1 (bajo). Kontrolle, Level 1 (niedrig). Controlli, Livello 1 (basso) Kontroll, nivå 1 (låg)
REAG	G	CONTROL		Control, level 2 (high). Témoin, niveau 2 (élevé). Control, nivel 2 (alto). Kontrolle, Level 2 (hoch). Controlli, Livello 2 (elevato) Kontroll, nivå 2 (hög)

EURIA-Glucagon

Glukagon Radioimmunoassay
Nur in vitro Diagnostik

EINLEITUNG

Glukagon ist ein geradkettiges Peptid, das aus 29 Aminosäuren besteht und in den Pankreas- α -Zellen produziert wird (1,2). Glukagon wird von einem Prä-Pro-Glukagon mit 159 Aminosäuren abgespalten. Die Aminosäuresequenz von Glukagon wird in Glizentin, einem 69 Aminosäuren-Peptid, gefunden (3). Glizentin wird als biosynthetische Zwischenstufe von Pankreas- und Darm-Glukagon angesehen.

Glukagon ist am Kohlenhydrat-, Fett- und Eiweißstoffwechsel beteiligt. Basale Anteile von Glukagon sind für die Aufrechterhaltung der Normoglykämie unentbehrlich, eine physiologische Rolle von Glukagon ist zudem die Vermeidung der Hypoglykämie. Eine Erhöhung des Plasma-Glukagon-Spiegels beeinflusst primär die Glukoseproduktion über eine Stimulation der Glykogenolyse, gefolgt von einer länger andauernden Phase der Glykoneogenese (4,5).

Ein anhaltend erhöhter Glukagonspiegel verändert nach und nach die Leber-Glukoseproduktion (6).

Zudem spielt Glukose im Aminosäurestoffwechsel eine wichtige Rolle. Erhöhtes Plasmaglukagon führt zur Verringerung von Aminosäuren, während ein Glukagonmangel den Aminosäuregehalt erhöht (7,8,9).

Die Aminosäuresequenz von menschlichem Pankreas-Glukagon sieht wie folgt aus: His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr.

KLINISCHE BEDEUTUNG

Glukagon ist am Kohlenhydrat-, Fett- und Eiweißstoffwechsel beteiligt. Basale Anteile von Glukagon sind für die Aufrechterhaltung der Normoglykämie unentbehrlich; desweiteren ist Glukagon physiologisch für die Vermeidung von Hypoglykämiezuständen verantwortlich.

Eine Pankreatektomie führt nicht zu einem absoluten Glukagonmangel; allerdings sind die Plasmakonzentrationen deutlich niedriger als bei normalen Testpersonen (7,10).

Da bei Diabetikern ein absolut oder relativ erhöhter Glukagonspiegel im Vergleich zum Insulinspiegel festgestellt wurde, nimmt man an, daß Glukagon wesentlich zur Entstehung der Hyperglykämie und Keto-Azidose bei Diabetes mellitus beiträgt (11,12,13). Erhöhte Glukagon-Plasmaspiegel werden auch bei Patienten mit A-Zellen-Tumoren festgestellt (8).

Normalwert von Glukagon in Plasma, nüchtern seit 12 Stunden:

<60 pmol/l (bestimmt mit dieser Testmethode).

Anwendern wird empfohlen, selbst Referenzbereiche für das eigene Labor zu bestimmen.

Dieser Test alleine sollte für eine klinische Therapie keine Entscheidungsgrundlage sein, sondern immer zusammen mit klinischen Symptomen und Ergebnissen anderer verfügbarer Tests gesehen werden.

TESTPRINZIP

Mit diesem Assay wird Glukagon in menschlichem Plasma bestimmt. Die Bestimmung von Glukagon erfolgt durch einen kompetitiven Radioimmunoassay unter Verwendung eines Kaninchen-Antiserums gegen ein Glukagon-Albumin-Konjugat.

Das in Standards und Proben enthaltene Glukagon konkurriert in zwei Inkubationsschritten mit ^{125}I -markiertem Glukagon um eine begrenzte Anzahl von Bindungsstellen am Antikörper. ^{125}I -Glukagon bindet sich im umgekehrten Verhältnis zur Konzentration von Glukagon der Standards und Proben an den Antikörper.

Das antikörpergebundene ^{125}I -Glukagon wird von freiem Glukagon durch Anwendung der Doppel-Antikörper-Festen Phase getrennt. Die Radioaktivität der gebundene Fraktion wird mit einem Gamma-Counter gemessen.

Das verwendete Antiserum zeigt eine Kreuzreaktivität von weniger als 0,1 % gegenüber Darm-GLI (14).

Für den professionellen Gebrauch im Labor.

VORSICHTSMASSNAHMEN

Nur zum in-vitro-Gebrauch.

Da die Regularien von einem Land zum anderen variieren können, ist es notwendig, dass die für das Labor verantwortliche Person mit den im jeweiligen Land gültigen gesetzlichen Bestimmungen vertraut ist; das betrifft alle Aspekte hinsichtlich Typ und Menge an radioaktivem Material, das in diesem Test verwendet wird.

Dieser Test enthält Komponenten humanen Ursprungs. Diese wurden mittels Immunoassay hinsichtlich Hepatitis B Oberflächenantigen, Antikörper gegen HCV sowie gegen HIV-1 und HIV-2 getestet und ergaben ein negatives Ergebnis. Trotzdem sollten alle empfohlenen Vorsichtsmaßnahmen für den Umgang mit Blutderivaten beachtet werden.

Dieser Kit enthält ^{125}I (Halbwertszeit: 60 Tage), das ionisierende X (28 keV) und γ (35,5 keV) Strahlungen emittiert. Es sollten geeignete Maßnahmen zum sicheren Umgang mit dem radioaktiven Material gemäß lokalen und/oder nationalen Vorschriften ergriffen werden. Nur autorisierte Personen sollten Zugang zu den Reagenzien haben.

Die folgenden Vorsichtsmaßnahmen sollten beim Umgang mit radioaktivem Material beachtet werden:

- Radioaktives Material muss in speziell ausgewiesenen Räumen gelagert werden, die für nicht autorisiertes Personal nicht zugänglich sind.
- Der Umgang mit radioaktivem Material darf nur in speziell gekennzeichneten Räumen erfolgen.
- Vorsicht ist geboten, damit ein Verschlucken sowie Haut- und Kleiderkontakt vermieden werden. Radioaktive Lösungen nicht mit dem Mund pipettieren.
- Dort, wo radioaktives Material verwendet wird, darf weder gegessen, getrunken noch geraucht werden.
- Es wird empfohlen Einmalhandschuhe zu tragen. Nach Gebrauch radioaktiven Materials Hände waschen.

-
- Beim Umgang mit radioaktivem Material sollten die Labortische mit absorbierendem, wegwerfbarem Material abgedeckt sein.
- Verschüttetes radioaktives Material sollte sofort entfernt und sämtliches kontaminiertes Material als radioaktiver Abfall entsorgt werden. Kontaminierte Tischoberflächen sollten mit einem Detergenz gesäubert werden.

Kitkomponenten enthalten Natriumazid. Kontakt mit Kupfer- oder Bleirohren kann zur Bildung von hochexplosiven Ablagerungen führen. Daher beim Entsorgen in Abflüssen mit reichlich Wasser nachspülen, was die Bildung von Metallaziden verhindert. Rohre, die wahrscheinlich diese explosiven Ablagerungen enthalten, gründlich mit 10%iger Natronlauge spülen.

KOMPONENTEN DES KITS

Die Reagenzien dieses Testkits sind ausreichend für 100 Bestimmungen.

1. Anti-Glukagon (Reagenz A)

Kaninchen-Antiserum gegen Schweine-Glukagon, konjugiert an humanes Serumalbumin. Lyophilisiert in 5,0 ml 2,0 M Glyzinpuffer, pH 8,8, 2,5 % humanes Serumalbumin, 0,5 % Natriumazid und Aprotinin (z.B. Trasylol®) In 52 ml dest. Wasser rekonstituieren. Das rekonstituierte Reagenz enthält 500 Aprotinin (z.B. Trasylol®)/ml. Farbe: Gelb.

2. ¹²⁵I-Glukagon (Reagenz B)

Gesamtradioaktivität: 0,75 µCi oder 28 KBq am Referenzdatum. Produziert durch Iodierung von synthetischem menschlichem Glukagon. HPLC-gereinigt, monoiodiert.

Spezifische Aktivität: 1.700-2.100 µCi/nmol (62-77 MBq/nmol). Lyophilisiert in 5,0 ml 2,0 M Glyzinpuffer, pH 8,8, 2,5 % humanes Serumalbumin, 0,5 % Natriumazid und Aprotinin (z.B. Trasylol®) In 52 ml dest. Wasser rekonstituieren. Das rekonstituierte Reagenz enthält 500 KIU aprotinin (& reg; oder ähnliches)/ml. Farbe: Blau

3. Doppel-Antikörper Festphase (Reagenz C)

Anti-Kaninchen-Ig an Zellulosepartikeln gebunden in 0,01 M Phosphatpuffer pH 6,8 mit 0,25% humanem Serumalbumin, 0,045% NaCl, 0,05% NaN₃, 0,185% EDTA und 0,05% Tween 80. Volumen: 11 ml Suspension.

4. Assay Verdünnungslösung (Reagenz D)

50 ml 0,2 M Glyzinpuffer, pH 8,8, mit 0,25 % humanem Serumalbumin, 0,05 % Natriumazid und 500 KIU Aprotinin (z.B. Trasylol®)/ml.

Wird für die Herstellung der Glukagon-Arbeitsstandards und anstelle von Antiserum in den unspezifischen Bindungs-Kontrollröhrchen benötigt.

5. Glukagon Standard (Reagenz E)

5,00 ml Standard. Konzentration: 300 pmol/l (1044 pg/ml) synthetisches, menschliches Glukagon. Lyophilisiert in 0,2 M Glyzinpuffer, pH 8,8, mit 0,25 % humanem Serumalbumin, 0,05 % Natriumazid und 500 KIU Aprotinin (z.B. Trasylol®) /ml. Rekonstitution in 5,00 ml dest. Wasser.

6. Kontrollen (Reagenz F-G)

Lyophilisierte Kontrollen. 2 Fläschchen á 2.00 ml nach Auflösen. Die Glukagonkonzentrationen sind den Etiketten auf den Fläschchen zu entnehmen. Enthält 0.05% Natriumazid.

ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL (nicht im Kit enthalten)

Destilliertes Wasser
Einmal-Teströhrchen aus Polystyrol: 11-13 x 55 mm
Pipetten mit Einmalspitzen: 200 und 500 µl.
Glas-Pipetten, 1,00 und 5,00 ml (für Standard-Vorbereitung)
Vortexmixer
Kühl-Zentrifuge, Minimum von 1.700 x g
Gamma-Counter

VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

Die Reagenzien sollten vor Gebrauch bei 2 – 8 °C gelagert werden.
Das für die Rekonstitution der lyophilisierten Reagenzien verwendete Wasser sollte mit einer Glasapparatur gewonnen werden oder von entsprechender Reinheit sein. Den Inhalt der Fläschchen vorsichtig unter Vermeidung von Schaumbildung lösen.
Das Verfallsdatum ist auf jedem Fläschchen angegeben. Bei lyophilisierten Reagenzien gilt das Verfallsdatum für die ungeöffnete Flasche. Nach Rekonstitution haben die Reagenzien bei ordnungsgemäßer Lagerung eine Haltbarkeit von 10 Wochen (bzw. bis zum Verfallsdatum für das markierte Glukagon).

Reagenz A: Anti-Glukagon

Mit 52 ml destilliertem Wasser auflösen.
Lagerung bei 2 – 8 °C

Reagenz B: ¹²⁵I-Glukagon

Mit 52 ml dest. Wasser rekonstituieren.
Lagerung bei -18 °C oder tiefer bei Wiederverwendung.

Reagenz C: Doppel-Antikörper-Festphase

Gebrauchsfertig. Während des Pipettierens ständig mischen.
Lagerung bei 2-8 °C.

Reagenz D: Assay-Verdünnungspuffer

Gebrauchsfertig. Lagerung bei 2 – 8 °C.

Reagenz E: Glukagon-Standard

Mit 5,00 ml dest. Wasser rekonstituieren. Lagerung bei -18 °C oder tiefer bei Wiederverwendung.

Reagenz F-G: Kontrollen

Mit 2,00 ml dest. Wasser rekonstituieren. Lagerung bei -18 °C oder tiefer bei Wiederverwendung.

PROBENGEWINNUNG

Venenblut wird in Röhrchen unter Zusatz von EDTA und Aprotinin (z.B. Trasylo[®]) (5000 KIU Aprotinin (z.B. Trasylo[®]) in einem 10 ml Vakutainer) gewonnen. Die Proben werden sofort in einem Eisbad gekühlt. Das Plasma wird durch Zentrifugation gewonnen (eine Kühlzentrifuge wird bevorzugt). Das Plasma sollte innerhalb von 2 Stunden tiefgefroren und bis zur Assaydurchführung bei mindestens -18 °C oder niedriger gelagert werden. Wiederholtes Auftauen und Einfrieren vermeiden.

TESTDURCHFÜHRUNG

Die Reagenzien wie beschrieben rekonstituieren.
Genauigkeit bei allen Pipettierschritten ist wichtig. Alle Tests (Standards, Proben und Kontrollen) sollten in Doppelbestimmungen durchgeführt werden.
Zur Übersicht der Testdurchführung siehe Seite 52.

Ein kompletter Testansatz beinhaltet:

Standards (St-Röhrchen)	7 Konzentrationen (0; 4,7; 9,4; 18,8; 37,5; 75; 150 pmol/l (= 0; 16,3; 32,6; 65,3; 131; 261; 522 pg/ml).
Kontrollen (C-Röhrchen)	2 verschiedene Kontrollen mit bekannten Glukagon-Konzentrationen zur Qualitätskontrolle

Proben (S-Röhrchen)

Röhrchen für die Bestimmung der **nicht spezifischen Bindung (NSB-Röhrchen)**

Röhrchen für die Bestimmung der **Gesamtradioaktivität (TOT-Röhrchen)**

- Die Reagenzien entsprechend der Anweisung rekonstituieren.
- Herstellung der Glukagon-Arbeitsstandards durch Verdünnung des 300 pmol/l Standards (Reagenz E) mit dem Assay-Verdünnungslösung (Reagenz D) wie folgt:
 - 1,00 ml Standard 300 pmol/l + 1,00 ml Assay-Verdünnungslösung = 150 pmol/l
 - 1,00 ml Standard 150 pmol/l + 1,00 ml Assay-Verdünnungslösung = 75 pmol/l
 - 1,00 ml Standard 75 pmol/l + 1,00 ml Assay-Verdünnungslösung = 37,5 pmol/l
 - 1,00 ml Standard 37,5 pmol/l + 1,00 ml Assay-Verdünnungslösung = 18,8 pmol/l
 - 1,00 ml Standard 18,8 pmol/l + 1,00 ml Assay-Verdünnungslösung = 9,4 pmol/l
 - 1,00 ml Standard 9,4 pmol/l + 1,00 ml Assay-Verdünnungslösung = 4,7 pmol/l
 - Assay-Verdünnungslösung = 0 pmol/l

Die Standardlösungen a-g und Reagenz E bei -18 °C oder tiefer lagern, wenn sie wiederverwendet werden sollen.

- 200 μ l der Standards a-g, Proben und Kontrollen in die betreffenden Röhrchen pipettieren (Duplikate).
- 200 μ l Assay-Verdünnungslösung als Standard in die NSB- Röhrchen pipettieren.

5. 500 µl Anti-Glukagon (Reagenz A) in alle Röhrrchen (Ausnahme: NSB- und TOT-Röhrrchen) pipettieren.
6. 500 µl Assay-Verdünnungslösung (Reagenz D) in die NSB-Röhrrchen pipettieren.
7. Vortexen und 20-24 Stunden bei 2-8 °C inkubieren.
8. 500 µl ¹²⁵I-Glukagon (Reagenz B) in alle Röhrrchen pipettieren; die TOT-Röhrrchen verschließen und zur Seite stellen.
9. Vortexen und 20-24 Stunden bei 2-8 °C inkubieren.-
10. 100 µl Doppel-Antikörper Feste-Phase (Reagenz C) in alle Röhrrchen (außer TOT) pipettieren. Während des Pipettiervorganges permanent umrühren.
11. Vortexen, und 30-60 Minuten bei 2-8 °C inkubieren.
12. Alle Röhrrchen 15 Minuten bei +4 °C (1.700 x g) zentrifugieren.
Hinweis: Für eine korrekte Testleistung ist die richtige Zentrifugalkraft entscheidend.
13. Die Flüssigkeit sofort nach dem Zentrifugieren dekantieren.
Hinweis: Für die Präzision des Assays sind Genauigkeit und Kohärenz beim Umgang mit den Überständen äußerst wichtig.
14. Messung der Radioaktivität des Niederschlags im Gamma-Counter. Die Messzeit sollte mindestens 2 Minuten betragen.

BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

1. Den Mittelwert der Zählrate (CPM) der unspezifischen Bindungsröhrrchen für Standards von der Zählrate (CPM) der Replikate der Standardröhrrchen, der Proben- und Kontrollröhrrchen abziehen.
2. Erstellen einer Standardkurve durch Auftragen der gebundenen CPM (in CPM oder % B/TOT) gegen die Konzentration der Glukagon-Standards.
3. Ablesen der Glukagon-Konzentrationen der Proben und der Kontrollen von der erstellten Standardkurve.
4. Steht ein entsprechendes Computerprogramm zur Verfügung, so können die Standardkurve und die Berechnung der Konzentrationen damit durchgeführt werden, z.B. unter Anwendung eines Spline Algorithmus.
5. Typische Standardkurve siehe Seite 53.
Ergebnisbeispiel siehe Seite 54.

QUALITÄTSKONTROLLE

Um eine gleichbleibende Testqualität sicherzustellen, sollte jedes Labor die folgenden Punkte beachten:

- 1. Die gefundenen Konzentrationen der Kontrollen**
Die ermittelten Konzentrationen der Kontrollen (Reagenz F und G) sollten innerhalb der auf den Etiketten angegebenen Werte liegen.
- 2. Total Counts**
Die gefundenen Counts sollten dem erwarteten CPM hinsichtlich des Wirkungsgrads des Counters und des radioaktiven Zerfalls nahekommen. Der Gehalt an ¹²⁵I-Glukagon dieses Kits beträgt ca. 10.500 CPM (-5 %, +30 %) am Tag der Markierung (Wirkungsgrad des Counters = 80 %).
- 3. Maximale Bindung (Bo/TOT)**
Für jeden Assay die %-gebundene Radioaktivität des Nullstandards berechnen:
 $Bo/TOT \times 100 \%$
- 4. Unspezifische Bindung (NSB/TOT)**
Für jeden Assay die unspezifische Bindung in Prozent berechnen:
 $NSB/TOT \times 100$
Die unspezifische Bindung sollte unter 6 % liegen.
- 5. Verlauf der Standardkurve**
Als Marker für die Reproduzierbarkeit von Testlauf zu Testlauf können z.B. die Punkte bei 80, 50 und 20 % der Standardkurve verwendet werden.

TESTCHARAKTERISTIKA**Sensitivität**

Die untere Nachweisgrenze des Tests liegt bei 3 pmol/l.

Dieser Wert entspricht einer Abnahme der Bindung von 2xSD der gebundenen Radioaktivität im Nullstandard.

Präzision

Intra-Assay-Varianz

<u>Konzentration</u>	<u>Variationskoeffizient (VK %)</u>	<u>N</u>
16,4 pmol/l	8,1	30
60,1 pmol/l	4,5	30

Gesamt-Varianz (Summe von Intra- und Inter-Assay-Varianz)

<u>Konzentration</u>	<u>Variationskoeffizient (VK %)</u>	<u>N</u>
25,4 pmol/l	6,8	6
22,0 pmol/l	7,4	6
23,0 pmol/l	8,3	5
73,9 pmol/l	3,9	6
97,9 pmol/l	5,6	6

Genauigkeit

Eine Wiederfindung von 97,6 % wurde erreicht, wenn bekannte Mengen an Glukagon zu Plasmaproben hinzugefügt wurden.

Spezifität

Folgende Kreuzreaktionen wurden gefunden:

Peptid	Kreuzreaktivität (%)
Pankreas-Glukagon, Mensch	100,0
Darm-GLI	< 0,1
Sekretin	< 0,02
Cholecystokin-39	< 0,02
Vasoaktives intestinales Peptid	< 0,02
Gastrisches inhibitorisches Peptid	< 0,02
GLP 1	< 0,1
Oxyntomodulin	< 0,1

Korrelation

Der EURIA–Glukagon-Test korreliert mit dem WHO-Standard 69/194.

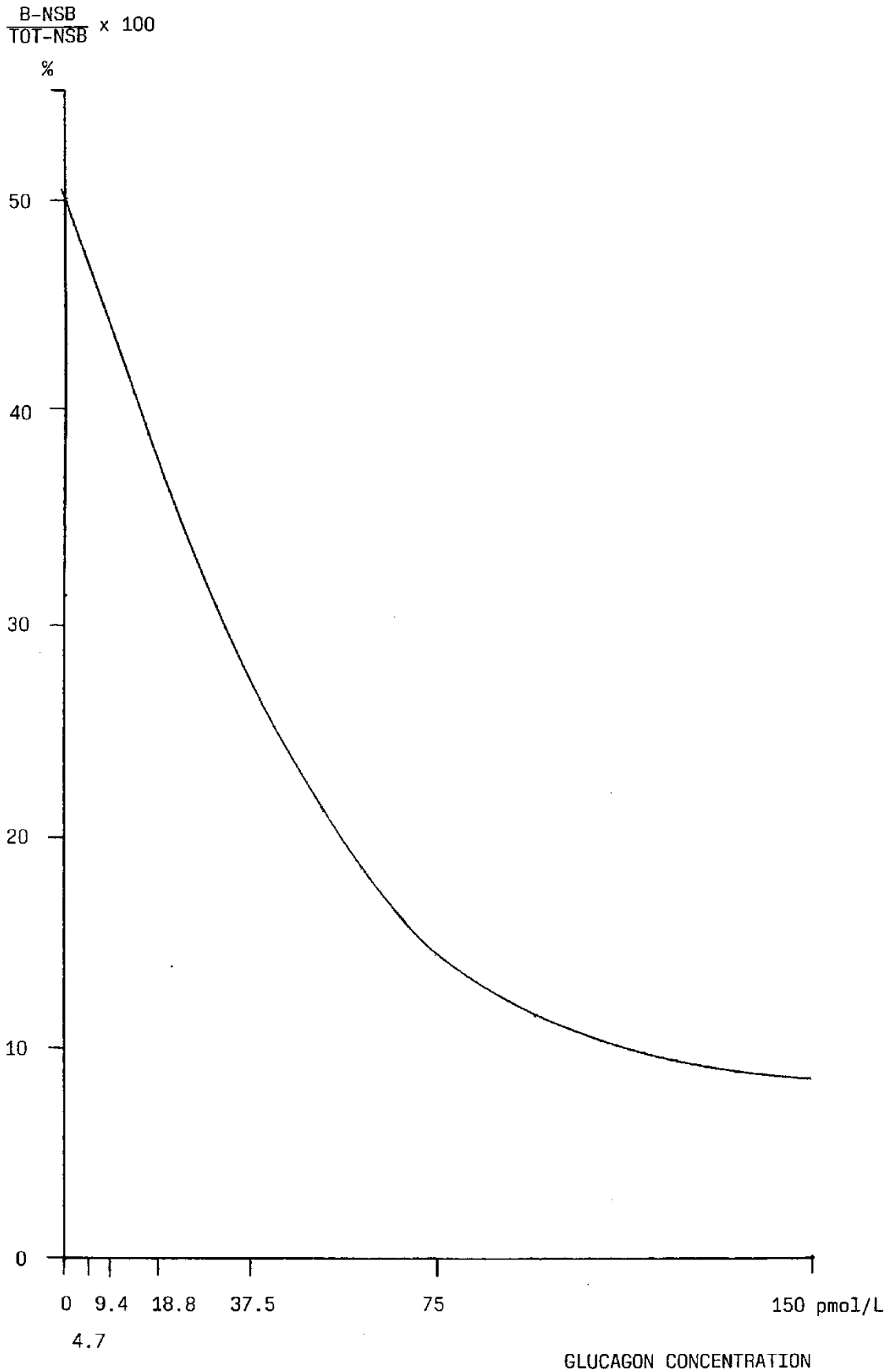
Interferenz

Untersuchungsproben, die getrübt, hämolytisch oder lipämisch sind oder Fibrin enthalten, können zu ungenauen Ergebnissen führen.

ÜBERBLICK DER RIA-TESTDURCHFÜHRUNG

Röhrchen - Typ	Röhr- chen Nr.	Standard Probe oder Kontrolle	Anti- Gluka- gon (A)	Assay- Verdün- nungs- lösung (D)		125I- Gluka- gon (B)		Doppel- Anti- körper Fest- phase (C)	
TOT	1-2	-	-	-	Vortexe	500 µl	Vortexe	-	Vortexen
NSB _{st}	3-4	200 µl	-	500	n und	500 µl	n und	100 µl	und
Stand 0	5-6	200 µl	500 µl	-	20-24 h	500 µl	20-24 h	100 µl	30-60 min
Stand 4.7	7-8	200 µl	500 µl	-	bei	500 µl	bei	100 µl	bei 2-8° C
Stand 9.4	9-10	200 µl	500 µl	-	2-8° C	500 µl	2-8° C	100 µl	inkubieren.
Stand 18.8	11-12	200 µl	500 µl	-	inku- bieren.	500 µl	inku- bieren.	100 µl	15 Min. bei
Stand 37.5	13-14	200 µl	500 µl	-		500 µl		100 µl	1700 x g
Stand 75	15-16	200 µl	500 µl	-		500 µl		100 µl	und +4° C
Stand 150	17-18	200 µl	500 µl	-		500 µl		100 µl	zentrifu- gieren.
Control (F)	19-20	200 µl	500 µl	-		500 µl		100 µl	Dekantieren
Control (G)	21-22	200 µl	500 µl	-		500 µl		100 µl	und Radio- aktivität
Probe 1 etc.	23-24	200 µl	500 µl	-		500 µ		100 µl	des Präzipitats messen.

EXAMPLE OF A GLUCAGON STANDARD CURVE



**BEISPIEL EINER TYPISCHEN GLUKAGON STANDARDKURVE
ZUM MARKIERUNGSZEITPUNKT**

Röhrchen Nr.	Röhrchen- Typ	Konzentration pmol/l	CPM (roh)	$\frac{B}{TOT} \times 100$
1	NSB _{st}	-	684	5,5%
2	"	-	653	5,3%
3	TOT	-	12301	$\frac{B-NSB}{TOT-NSB} \times 100$
4	"	-	12347	
5	St	0,0	6253	50,7%
6	"	"	6203	50,3%
7	St	4,7	5827	47,3%
8	"	"	5775	46,9%
9	St	9,4	5267	42,7%
10	"	"	5384	43,7%
11	St	18,8	4661	37,8%
12	"	"	4729	38,4%
13	St	37,5	3379	27,4%
14	"	"	3310	26,9%
15	St	75	1777	14,4%
16	"	"	1760	14,3%
17	St	150	1050	8,5%
18	"	"	1081	8,8%

Kontrollparameter

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

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

ED 80 : 14,5 pmol/l





ED 50 : 39,8 pmol/l

ED 20 : 100 pmol/l

REFERENCES / RÉFÉRENCES / REFERENCIAS / LITERATUR / BIBLIOGRAFIA / REFERENSER

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

SYMBOLS USED ON LABELS / SYMBOLES UTILISÉS SUR LES ÉTIQUETTES / SIMBOLOS UTILIZADOS EN LAS ETIQUETAS / ERLÄUTERUNG DER SYMBOLE / SIMBOLI USATI SULLE ETICHETTE / SYMBOLER PÅ ETIKETTERNA

	Batch code. Numéro de lot. Número de lote. Chargen-Nummer. Numero di lotto. Satsnummer.
	Catalogue number. Référence catalogue. Número de catálogo. Katalog-Nummer. Numero di catalogo. Katalognummer.
	Use-by date. Date de péremption. Fecha de caducidad. Verfallsdatum. Usare entro. Använd före.
	Temperature limit. Seuils de températures. Rango de temperature. Temperaturbereich. Limitazioni di temperatura. Förvaringstemperatur.
	Date of manufacture. Date de fabrication. Fecha de fabricacion. Datum der Herstellung. Data di produzione. Tillverkningsdatum.
	Contains radioactive substances. Contient des substances radioactives. Contiene sustancias radiactivas. Enthält radioaktive Stoffe. Contiene sostanze radioattive. Innehåller radioaktiva ämnen.
	Biological risk. Risque biologique. Riesgo biológico. Biologische Gefährdung. Rishio biologico. Biologisk risk.
	Consult instructions for use. Lire le mode d'emploi. Consulte las instrucciones de uso. Gebrauchsanweisung beachten. Leggere le istruzioni per l'uso. Läs instruktionsmanualen.
	In vitro diagnostic medical device. Dispositif médical de diagnostic in vitro. Producto sanitario para diagnóstico in vitro. In-vitro-Diagnostikum. Dispositivo medico-diagnostico in vitro. In vitro diagnostik medicinsk utrustning.
	Manufacturer. Fabricant. Fabricante. Hersteller. Produttore. Tillverkare.
	Contains sufficient for 100 tests. Contenu suffisant pour 100 tests. Contenido suficiente para 100 pruebas. Inhalt ausreichend für 100 Tests. Contenuto sufficiente per 100 test. Innehåller tillräckligt för 100 test.
	Conformity to 98/79/EC on In Vitro Diagnostic Medical Device Directive. Conformément à la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro. La conformidad con la Directiva 98/79/CE sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro. Konform mit Richtlinie 98/79/EG zur In-vitro-Diagnostika. Conformità alla direttiva 98/79/CE relativa ai dispositivi medico-diagnostici in vitro. Överensstämmer med direktiv 98/79/EG för medicintekniska produkter

REAG	A	Ab		Anti-Glucagon. Anti-Glucagon. Anti-glucagón. Anti-Glukagon. Anti Glucagone. Anti-Glucagon.
REAG	B	Ag	¹²⁵I	¹²⁵ I-Glucagon. ¹²⁵ I-Glucagon. Glucagón I- ¹²⁵ . ¹²⁵ I-Glukagon. Glucagone ¹²⁵ I. ¹²⁵ I-Glucagon
REAG	C	DASP		Double antibody solid phase. Phase solide à double anticorps.. Fase sólida de doble anticuerpo. Doppel-Antikörper-Festphase. Secondo anticorpo-fase solida. Dubbel antikropp fast fas
REAG	D	DIL	AS	Assay diluent. Diluant d'immunodosage. Diluyente. Assay- Verdünnungspuffer. Diluente.Spädningsbuffert
REAG	E	CAL	300	Glucagon standard 300 pmol/L. Standard de glucagon 300 pmol/L. Estándar de Glucagón 300 pmol/L. Glukagon-Standard 300 pmol/L. Standard di Glucagone 300 pmol/L. Glucagonstandard 300 pmol/L
REAG	F	CONTROL		Control, level 1 (low). Témoin, niveau 1 (bas). Control, nivel 1 (bajo). Kontrolle, Level 1 (niedrig). Controlli, Livello 1 (basso) Kontroll, nivå 1 (låg)
REAG	G	CONTROL		Control, level 2 (high). Témoin, niveau 2 (élevé). Control, nivel 2 (alto). Kontrolle, Level 2 (hoch). Controlli, Livello 2 (elevato) Kontroll, nivå 2 (hög)

EURIA-Glucagon

Glucagon radioimmunoassay
Per uso professionale

INTRODUZIONE

Il glucagone è un polipeptide lineare di 29 aminoacidi prodotto dalle cellule α delle isole pancreatiche (1,2); viene sintetizzato a partire dal preproglucagone che è costituito da 159 residui aminoacidici. La sequenza aminoacidica del glucagone è contenuta nella glicentina, un peptide di 69 aminoacidi(3). La glicentina è stata descritta come molecola intermedia nella sintesi del glucagone pancreatico e dell'entero glucagone.

Il glucagone partecipa al metabolismo dei carboidrati, dei lipidi e delle proteine; livelli basali di glucagone sono essenziali per l'omeostasi del glucosio e per prevenire l'ipoglicemia. Livelli plasmatici aumentati di questo ormone influenzano la produzione di glucosio dapprima stimolando una transitoria glicogenolisi e poi un periodo prolungato di glicogenogenesi(4,5). Un'aumento per un lungo periodo dei livelli di glucagone stimola la produzione epatica di glucosio (6). Il glucagone è anche importante nel metabolismo degli aminoacidi. Valori plasmatici aumentati diminuiscono la concentrazione plasmatica degli aminoacidi, mentre la diminuzione l'aumenta (7,8,9).

La sequenza aminoacidica del Glucagone pancreatico umano è la seguente: His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr.

CONSIDERAZIONI CLINICHE

Il Glucagone partecipa al metabolismo dei carboidrati, dei lipidi e delle proteine; livelli basali di Glucagone sono essenziali per l'omeostasi del glucosio e per prevenire l'ipoglicemia.

La pancreasectomia non causa deficit totale di Glucagone, ma diminuisce in modo significativo la sua concentrazione plasmatica rispetto ai soggetti normali (7, 10).

Poichè il glucagone nei soggetti diabetici è elevato sia in termini assoluti che rispetto ai livelli di insulina, è stato ipotizzato che il glucagone contribuisca in modo essenziale allo sviluppo dell'iperglicemia e della chetoacidosi nel diabete (11, 12,13); livelli elevati di glucagone sono presenti in pazienti con tumori delle cellule α del pancreas (8).

Livelli normali di Glucagone ottenuti con questo metodo in soggetti a digiuno da 12 ore: <60 pmol/L

Si raccomanda agli utenti di fissare dei range di riferimento per le popolazioni servite dai loro laboratori.

Il test non deve essere considerato l'unico fondamento per prendere decisioni sulla terapia clinica, ma deve essere usato in combinazione con sintomi clinici e i risultati di altri test disponibili.

PRINCIPIO DEL METODO

I reattivi contenuti nel kit permettono la determinazione quantitativa del Glucagone nel plasma umano e in estratti di tessuti.

Il dosaggio del glucagone è un metodo radioimmunologico competitivo che utilizza un anticorpo di coniglio diretto contro il coniugato glucagone-albumina. Una quantità definita di glucagone marcato con ^{125}I compete con il glucagone presente in standard e campioni per un numero definito di siti di un anticorpo specifico con un'incubazione sequenziale; il marcato viene legato in modo inversamente proporzionale alla concentrazione di glucagone in campioni e standard. Dopo la seconda incubazione, il marcato legato all'anticorpo viene precipitato con l'aggiunta di un secondo anticorpo legato a cellulosa. Le provette vengono quindi centrifugate, decantate e contate con un contatore gamma; la concentrazione di glucagone nei campioni viene calcolata per interpolazione sulla curva standard.

L'anticorpo usato nel dosaggio ha una cross-reazione $< 0,1\%$ con l'entero glicentina (14). Per uso professionale in laboratorio.

PRECAUZIONI

Solo per uso diagnostico in vitro

1. Alcuni reattivi presenti nel kit sono di origine umana e si sono rivelati negativi per HIV1 e HIV2, HBV e HCV. Questi reattivi devono essere manipolati come in grado di trasmettere malattie infettive. Non sono disponibili metodi in grado di offrire la certezza assoluta che questi o altri agenti infettivi siano assenti. Manipolare questi reattivi come potenziali fonti di infezioni. Manipolare tutti i campioni di sangue come potenziali fonti di infezioni.
2. Alcuni reattivi contengono sodio azide come conservante, che può reagire con piombo, rame o ottone presenti nelle tubature di scarico per formare metallo-azidi esplosive. Smaltire questi reattivi facendo scorrere abbondante acqua negli scarichi. Le tubature eventualmente interessate da questi depositi esplosivi devono essere lavate con una soluzione di idrossido di sodio 10 %.
3. Il kit contiene ^{125}I (emivita: 60 giorni) emettente raggi X (28 keV) e γ (35.5 keV) ionizzanti. L'acquisto, la detenzione, l'utilizzo e il trasporto di materiale radioattivo sono soggetti a regolamentazione locale. Le sostanze radioattive devono essere conservate in propri contenitori in appositi locali che devono essere interdetti alle persone non autorizzate. Deve essere tenuto un registro di carico e scarico del materiale radioattivo. I rifiuti radioattivi devono essere smaltiti secondo le norme locali di radioprotezione.

Lo scrupoloso rispetto delle norme per l'uso di sostanze radioattive fornisce una protezione adeguata agli utilizzatori.

- Nei luoghi dove si usano sostanze radioattive non è consentito consumare cibi o bevande, fumare o usare cosmetici.
- Non pipettare materiale radioattivo con pipette a bocca.
- Usare sempre guanti e camici da laboratorio quando si manipola materiale radioattivo.
- I banchi da lavoro devono essere sempre coperti con carta assorbente monouso.
- Il materiale di laboratorio e la strumentazione soggetta ad una possibile contaminazione devono essere dedicati all'uso di un singolo isotopo per evitare cross-contaminazioni con isotopi differenti.

- Il materiale radioattivo eventualmente disperso nell'ambiente di lavoro deve essere immediatamente asportato con carta assorbente che deve poi essere eliminata nei contenitori per rifiuti radioattivi solidi. Le superfici interessate devono essere lavate con un liquido decontaminante adeguato.

Alcuni reattivi presenti nel kit contengono sodio azide (0,05 %), che può reagire con piombo, rame o ottone presenti nelle tubature di scarico per formare metallo-azidi esplosive. Smaltire questi reattivi facendo scorrere abbondante acqua negli scarichi. Le tubature che dovessero dimostrarsi contaminate con depositi potenzialmente esplosivi devono essere lavate facendo scorrere abbondantemente una soluzione al 10% di NaOH.

CONTENUTO DEL KIT

Il kit contiene reattivi sufficienti per eseguire 100 determinazioni di glucagone.

1. Anti glucagone (Reattivo A)

Anticorpo anti Glucagone da coniglio preparato usando come immunogeno glucagone porcino altamente purificato legato ad albumina umana. L'anticorpo è liofilizzato in 5 mL di tampone glicina 2 M, pH 8.8, albumina umana 2.5%, Mertiolo® 0.2% e aprotinina (Trasylo® o equivalente). Ricostituire con 52 mL di acqua distillata. Il reattivo ricostituito contiene 500 KIU/mL di aprotinina (Trasylo® o equivalente). Colore: giallo.

2. Glucagone ¹²⁵I – (Reattivo B)

Il flacone contiene glucagone marcato con ¹²⁵I, con attività totale di 28 kBq alla data riportata sul flacone, prodotto per iodinazione di glucagone umano sintetico, purificato con HPLC, monoiodinato. Attività specifica 62-77 Mbq/nmol. Il marcato è liofilizzato in 5 mL di tampone glicina 2 M, pH 8.8, albumina umana 2.5%, Mertiolo® 0.2% e aprotinina (Trasylo® o equivalente). Ricostituire con 52 mL di acqua distillata. Il reattivo ricostituito contiene 500 KIU/mL di aprotinina (Trasylo® o equivalente). Colore: blu.

3. Secondo anticorpo-fase solida (Reattivo C)

Anticorpo anti IgG di coniglio, legato a particelle di cellulosa in 0,01 M tampone fosfato, pH 6,8 con albumina di siero umana 0,25%, NaCl 0,045%, NaN₃ 0,05%, EDTA 0,185% e Tween 80 0,05%.

Volume: 11 mL di sospensione.

4. Diluente (Reattivo D)

Il flacone contiene 50 mL di tampone glicina 0.2 M, pH 8.8, albumina umana 0.25%, Mertiolo® 0.02% e 500 KIU/mL di aprotinina (Trasylo® o equivalente). Il diluente va utilizzato per la preparazione delle soluzioni di lavoro degli standard e, al posto dell'anticorpo, per la determinazione del legame non specifico.

5. Standard di Glucagone (Reattivo E)

Glucagone umano sintetico, 300 pmol/L (1044 pg/mL), liofilizzato in 5 mL di tampone glicina 0.2 M, pH 8.8, albumina umana 0.25%, Mertiolo® 0.02% e 500 KIU/mL di aprotinina (Trasylo® o equivalente). Ricostituire con 5.0 mL di acqua distillata.

6. Controlli (Reattivi F-G)

I controlli, liofilizzati, vanno ricostituiti con 2.0 mL di acqua distillata. Le concentrazioni di Glucagone sono riportate sulle etichette dei rispettivi flaconi. Contengono sodio azide 0.05%.

MATERIALE RICHIESTO, MA NON FORNITO

Oltre alla normale attrezzatura di laboratorio, è richiesto il materiale seguente:

Acqua distillata.

Provette in polistirene o polipropilene 11-13 x 55 mm

Micropipette di precisione con puntali monouso (200 e 500 µL)

Pipette da 1 e 5 mL per la preparazione delle soluzioni di lavoro degli standard

Agitatore tipo Vortex

Centrifuga refrigerata (min. 1700 x g)

Sistema di aspirazione o decantazione

Contatore gamma programmato per leggere ¹²⁵I.

PREPARAZIONE E CONSERVAZIONE DEI REATTIVI

Conservare i reattivi prima della ricostituzione a 2-8°C. Ricostituire i reattivi con acqua bidistillata. Risospendere i reattivi ricostituiti per inversione evitando la formazione di schiuma. La stabilità dei reattivi è riportata sull'etichetta di ciascun flacone; per i reattivi liofilizzati la data riportata si riferisce alla scadenza prima della ricostituzione. I reattivi ricostituiti sono stabili se conservati come prescritto, per almeno 10 settimane, ma non oltre la data riportata sull'etichetta di ciascun flacone.

Reattivo A: Anti Glucagone

Ricostituire con 52 mL di acqua bidistillata. Conservare a 2-8°C.

Reattivo B: Glucagone ¹²⁵I

Ricostituire con 52 mL di acqua bidistillata subito prima dell'uso. Conservare il reattivo avanzato a -18°C o a temperature inferiori.

Reattivo C: Secondo anticorpo – Fase solida.

Pronto per l'uso. Mantenere in continua agitazione durante la dispensazione. Conservare a 2-8°C.

Reattivo D: Diluente

Pronto per l'uso. Conservare a 2-8°C.

Reattivo E: Standard glucagone 120 pmol/L

Ricostituire con 5 mL di acqua bidistillata. Conservare il reattivo avanzato a -18°C o a temperature inferiori.

Reattivi F-G: Controlli

Ricostituire con 2 mL di acqua distillata. Conservare i controlli avanzati a -18°C o a temperature inferiori.

RACCOLTA E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

Raccogliere i campioni in provette con EDTA e aprotinina (Trasylo® o equivalente) (5000 KIU di aprotinina (Trasylo® o equivalente) per una provetta da 10 mL). Porre immediatamente il campione in bagno di acqua e ghiaccio. Separare il plasma per centrifugazione a 4°C. Portare immediatamente il plasma a -18°C o a temperature inferiori fino al momento del dosaggio. Evitare ripetuti cicli di congelamento – scongelamento dei campioni.

METODO DEL DOSAGGIO

Per ottenere risultati ottimali è indispensabile una buona riproducibilità del sistema di pipettamento. Portare i reattivi a temperatura ambiente prima dell'uso. Eseguire il dosaggio in duplicato (Standard, controlli, campioni, NSB e attività totale). Il metodo è riportato in dettaglio alla pagina 66.

Un dosaggio completo comprende:

Standard (provette St): a sette livelli: 0, 4.7, 9.4, 18.8, 37.5, 75 e 150 pmol/L.
(= 0, 16.3, 32.6, 65.3, 131, 261, 522 pg/mL).

Controlli (provette C): due controlli con concentrazioni note di glucagone. Si usano per il controllo di qualità del dosaggio.

Campioni (provette S)

Provette per la determinazione del **legame non specifico (provette NSB)**.

Provette per la determinazione dell'**attività totale (provette Tot)**.

1. Ricostituire i reattivi secondo le istruzioni.
2. Preparare le soluzioni di lavoro degli standard a partire dallo standard 300 pmol/L (reattivo E) con il diluente degli standard (reattivo D), secondo il seguente schema:
 - a. 1.00 mL standard 300 pmol/L + 1.00 mL di diluente = 150 pmol/L
 - b. 1.00 mL standard 150 pmol/L + 1.00 mL di diluente = 75 pmol/L
 - c. 1.00 mL standard 75 pmol/L + 1.00 mL di diluente = 37.5 pmol/L
 - d. 1.00 mL standard 37.5 pmol/L + 1.00 mL di diluente = 18.8 pmol/L
 - e. 1.00 mL standard 18.8 pmol/L + 1.00 mL di diluente = 9.4 pmol/L
 - f. 1.00 mL standard 9.4 pmol/L + 1.00 mL di diluente = 4.7 pmol/L
 - g. Diluente degli standard = 0 pmol/L

Conservare le soluzioni avanzate a -18°C o a temperature inferiori.

3. Pipettare 200 µL di standard (0-150 pmol/L), campioni e controlli nelle rispettive provette.
4. Pipettare 200 µL di diluente nelle provette degli NSB per gli standard.
5. Aggiungere 500 µL di anticorpo anti Glucagone (reattivo A) in tutte le provette, eccetto quelle per l'attività totale e per gli NSB.
6. Aggiungere 500 µL di diluente (reattivo D) nelle provette per gli NSB.
7. Agitare su vortex e incubare 20 - 24 ore a 2-8°C.

8. Aggiungere 500 µL di Glucagone ¹²⁵I (reattivo B) in tutte le provette. Mettere da parte le provette per l'attività totale e tapparle.
9. Agitare su vortex e incubare 20 - 24 ore a 2-8°C.
10. Aggiungere 100 µL di secondo anticorpo – cellulosa (reattivo C) a tutte le provette tranne quelle per l'attività totale. Mantenere in continua agitazione durante la dispensazione.
11. Agitare su vortex e incubare 30-60 min. a 2-8°C.
12. Centrifugare le provette 15 min. a 4°C (1700 x g).
Nota: La forza centrifuga corretta è importante per l'accuratezza del metodo.
13. Eliminare immediatamente il surnatante per decantazione.
Nota: l'accuratezza e la coerenza nella manipolazione dei supernatanti sono fondamentali per la precisione del dosaggio.
14. Misurare la radioattività del precipitato, frazione legata, di tutte le provette per almeno due minuti in un contatore gamma..

CALCOLO DEI RISULTATI

1. Sottrarre la media delle cpm degli NSB degli standard dalle cpm dei replicati degli standard, dei controlli e dei campioni.
2. Generare la curva standard riportando in ordinata le cpm della frazione legata B o il rapporto di competizione B/T% e in ascissa le concentrazioni degli standard.
3. Le concentrazioni di glucagone in campioni e controlli vengono calcolate per interpolazione delle rispettive cpm della frazione legata B o del rapporto di competizione B/T% sulla curva standard.
4. Se si usa un sistema di elaborazione computerizzato, usare il metodo di interpolazione Spline.
5. Una curva standard tipica è riportata a pag 67.
Un dosaggio tipico è riportato a pag 68.

CONTROLLO DI QUALITA'

Ogni laboratorio deve controllare la qualità dei risultati ottenuti con questo metodo radioimmunologico considerando i seguenti parametri

1. Concentrazione trovata dei controlli

I controlli (Reattivi F - G) devono essere nei limiti riportati sulle etichette dei flaconi.

2. Attività totale

Le cpm ottenute devono essere approssimativamente quelle attese dopo correzione per l'efficienza del contatore e per il decadimento del radioattivo. La radioattività misurata per 500 μ L di Glucagone ¹²⁵I deve essere 10500 cpm (-5, +30%) alla data riportata come riferimento (efficienza del contatore 80%).

3. Capacità legante (Bo/TOT)

Per ogni dosaggio calcolare la % di radioattività legata nello standard zero: $\frac{Bo}{TOT} \times 100\%$.

4. Legame non specifico (NSB/TOT)

Il legame non specifico, rapporto tra le cpm degli NSB e le cpm dell'attività totale

$\frac{NSB}{TOT} \times 100$ deve essere inferiore al 6%.

5. Pendenza della curva

Calcolare ogni volta le intercette ai rapporti di competizione (B/ Bo) 80, 50, 20% e valutare le caratteristiche della curva.

CARATTERISTICHE DEL DOSAGGIO

Sensibilità

La sensibilità, calcolata come dose calcolata dalla curva standard della media – 2 DS delle cpm dello standard zero è risultata essere 3 pmol/L.

Precisione

Variazione intra saggio

<u>Livello</u>	<u>Coefficiente di variazione</u>	<u>N</u>
16.4 pmol/L	8.1	30
60.1 pmol/L	4.5	30

Variazione inter saggio (variazione totale)

<u>Livello</u>	<u>Coefficiente di variazione</u>	<u>N</u>
25.4 pmol/L	6.8	6
22.0 pmol/L	7.4	6
23.0 pmol/L	8.3	5
73.9 pmol/L	3.9	6
97.9 pmol/L	5.6	6

Accuratezza

L'aggiunta di quantità note di Glucagone a campioni ha permesso un recupero medio del 97.6%.

Specificità

Sono state trovate le seguenti cross reazioni:

<u>Polipeptide</u>	<u>Cross reazione</u>
Glucagone pancreatico umano	100%
Entero Glicentina	< 0.1%
Secretina	< 0.02%
Colecistochinina -39	<0.02%
VIP	< 0.02%
Gastric inhibitory peptide	< 0.02%
GLP- 1	< 0.1%
Oxyntomodulin	< 0.1%

Correlazione

EURIA –il dosaggio di glucagone si correla a WHO 69/194 standard.

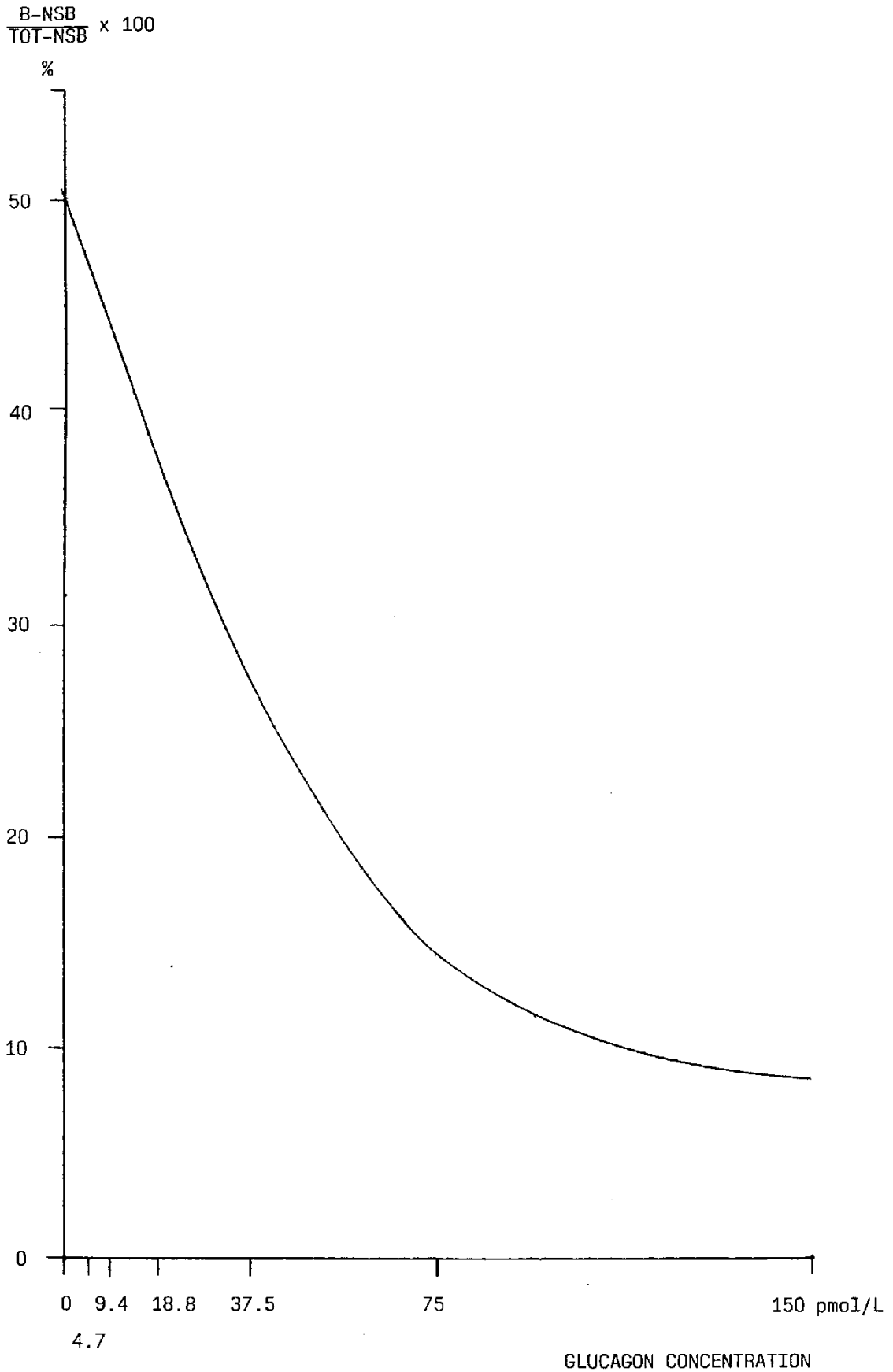
Interferenza

I campioni che presentano un disturbo, un'emolisi, un'iperlipemia o che contengono fibrina possono fornire risultati inesatti.

SCHEMA DEL DOSAGGIO RIA

Provetta	Numer o	Standard, campioni o controlli	Anticorpo anti glucagone (Reattivo A)	Diluente		Marcato glucagone ¹²⁵ I		Secondo anticorpo - fase solida	
T	1-2	-	-	-	Agitare su vortex e incubare 20-24 ore a 2-8° C.	500 µL	Agitare su vortex e incubare 20-24 ore a 2-8° C.	-	Agitare su vortex e incubare 30-60 min a 2-8° C. Centrifugar e 15 min a 1700 xg a 4° C. Decantare o aspirare il surnatante e contare la radioattività del precipitato
NSB _{st}	3-4	200 µL	-	500 µL		500 µL		100 µL	
St. zero	5-6	200 µL	500 µL	-		500 µL		100 µL	
St. 4.7	7-8	200 µL	500 µL	-		500 µL		100 µL	
St. 9.4	9-10	200 µL	500 µL	-		500 µL		100 µL	
St. 18.8	11-12	200 µL	500 µL	-		500 µL		100 µL	
St. 37.5	13-14	200 µL	500 µL	-		500 µL		100 µL	
St. 75	15-16	200 µL	500 µL	-		500 µL		100 µL	
St. 150	17-18	200 µL	500 µL	-		500 µL		100 µL	
Contr. (F)	19-20	200 µL	500 µL	-		500 µL		100 µL	
Contr. (G)	21-22	200 µL	500 µL	-		500 µL		100 µL	
Campione 1	23-24	200 µL	500 µL	-		500 µL		100 µL	
Ecc.									

EXAMPLE OF A GLUCAGON STANDARD CURVE



DATI TIPICI PER LA CURVA STANDARD DI GLUCAGONE ALLA DATA DI RIFERIMENTO

Provetta n°	Tipo di provetta	Concentrazione (pmol/L)	cpm	$\frac{B}{TOT} \times 100$
1	NSB _{st}	-	684	5.5%
2	"	-	653	5.3%
3	TOT	-	12301	$\frac{B-NSB}{TOT-NSB} \times 100$
4	"	-	12347	
5	St	0.0	6253	50.7%
6	"	"	6203	50.3%
7	St	4.7	5827	47.3%
8	"	"	5775	46.9%
9	St	9.4	5267	42.7%
10	"	"	5384	43.7%
11	St	18.8	4661	37.8%
12	"	"	4729	38.4%
13	St	37.5	3379	27.4%
14	"	"	3310	26.9%
15	St	75	1777	14.4%
16	"	"	1760	14.3%
17	St	150	1050	8.5%
18	"	"	1081	8.8%

Parametri di controllo

$\frac{B_0}{TOT} \times 100 : 48.0 \%$

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

ED 80 : 14.5 pmol/L




ED 50 : 39.8 pmol/L

ED 20 : 100 pmol/L

REFERENCES / RÉFÉRENCES / REFERENCIAS / LITERATUR / BIBLIOGRAFIA / REFERENSER

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

SYMBOLS USED ON LABELS / SYMBOLES UTILISÉS SUR LES ÉTIQUETTES / SIMBOLOS UTILIZADOS EN LAS ETIQUETAS / ERLÄUTERUNG DER SYMBOLE / SIMBOLI USATI SULLE ETICHETTE / SYMBOLER PÅ ETIKETTERNA

	Batch code. Numéro de lot. Número de lote. Chargen-Nummer. Numero di lotto. Satsnummer.
	Catalogue number. Référence catalogue. Número de catálogo. Katalog-Nummer. Numero di catalogo. Katalognummer.
	Use-by date. Date de péremption. Fecha de caducidad. Verfallsdatum. Usare entro. Använd före.
	Temperature limit. Seuils de températures. Rango de temperature. Temperaturbereich. Limitazioni di temperatura. Förvaringstemperatur.
	Date of manufacture. Date de fabrication. Fecha de fabricacion. Datum der Herstellung. Data di produzione. Tillverkningsdatum.
	Contains radioactive substances. Contient des substances radioactives. Contiene sustancias radiactivas. Enthält radioaktive Stoffe. Contiene sostanze radioattive. Innehåller radioaktiva ämnen.
	Biological risk. Risque biologique. Riesgo biológico. Biologische Gefährdung. Rishio biologico. Biologisk risk.
	Consult instructions for use. Lire le mode d'emploi. Consulte las instrucciones de uso. Gebrauchsanweisung beachten. Leggere le istruzioni per l'uso. Läs instruktionsmanualen.
	In vitro diagnostic medical device. Dispositif médical de diagnostic in vitro. Producto sanitario para diagnóstico in vitro. In-vitro-Diagnostikum. Dispositivo medico-diagnostico in vitro. In vitro diagnostik medicinsk utrustning.
	Manufacturer. Fabricant. Fabricante. Hersteller. Produttore. Tillverkare.
	Contains sufficient for 100 tests. Contenu suffisant pour 100 tests. Contenido suficiente para 100 pruebas. Inhalt ausreichend für 100 Tests. Contenuto sufficiente per 100 test. Innehåller tillräckligt för 100 test.
	Conformity to 98/79/EC on In Vitro Diagnostic Medical Device Directive. Conformément à la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro. La conformidad con la Directiva 98/79/CE sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro. Konform mit Richtlinie 98/79/EG zu In-vitro-Diagnostika. Conformità alla direttiva 98/79/CE relativa ai dispositivi medico-diagnostici in vitro. Överensstämmer med direktiv 98/79/EG för medicintekniska produkter

REAG	A	Ab		Anti-Glucagon. Anti-Glucagon. Anti-glucagón. Anti Glukagon. Anti Glucagone. Anti-Glucagon.
REAG	B	Ag	¹²⁵I	¹²⁵ I-Glucagon. ¹²⁵ I-Glucagon. Glucagón I- ¹²⁵ . ¹²⁵ I-Glukagon. Glucagone ¹²⁵ I. ¹²⁵ I-Glucagon
REAG	C	DASP		Double antibody solid phase. Phase solide à double anticorps.. Fase sólida de doble anticuerpo. Doppel-Antikörper-Festphase. Secondo anticorpo-fase solida. Dubbel antikropp fast fas
REAG	D	DIL	AS	Assay diluent. Diluant d'immunodosage. Diluyente. Assaypuffer. Diluente. Spädningsbuffert
REAG	E	CAL	300	Glucagon standard 300 pmol/L. Standard de glucagon 300 pmol/L. Estándar de Glucagón 300 pmol/L. Glucagon standard 300 pmol/L. Standard di Glucagone 300 pmol/L. Glucagonstandard 300 pmol/L
REAG	F	CONTROL		Control, level 1 (low). Témoin, niveau 1 (bas). Control, nivel 1 (bajo). Kontrolle, Level 1 (niedrig). Controlli, Livello 1 (basso) Kontroll, nivå 1 (låg)
REAG	G	CONTROL		Control, level 2 (high). Témoin, niveau 2 (élevé). Control, nivel 2 (alto). Kontrolle, Level 2 (hoch). Controlli, Livello 2 (elevato) Kontroll, nivå 2 (hög)

EURIA-Glucagon

Glucagon radioimmunoassay
Endast för professionell användning

INTRODUKTION

Glucagon är en 29 aminosyrorers peptid med en rak kedja och produceras av α -cellerna i pankreas (1, 2). Glucagon klyvs ut från preproglucagon med 159 aminosyror. Aminasyrasekvensen för glucagon finns i glicentin, en 69 aminosyrorerspeptid (3). Glicentin har antagits vara en biosyntetisk intermediär för pankreas- och tarmglucagon.

Glucagon är involverat i kolhydrat-, fett- och proteinmetabolismen. Basala koncentrationer av glucagon är essentiella för att upprätthålla normoglykemi och en fysiologisk roll för glucagon är att förebygga hypoglykemi. Ökning i plasmaglucagonnivån påverkar glykosproduktionen först genom stimulering av en övergående fas av glykogenolys och sedan genom en förlängd period av glykoneogenesis (4, 5). En ihållande ökning av glucagonnivån fortsätter att anpassa hepatisk glykosproduktion.

Glucagon spelar också en roll i aminosyrametabolismen. Förhöjning av glucagonnivån i plasma sänker aminosyrakoncentrationen emedan frånvaron av glucagon i plasma ökar aminosyrakoncentrationen (7, 8, 9). Aminasyresekvensen för humant pankreas glucagon: His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr.

KLINISKA ÖVERVÄGANDEN

Glucagon är involverat i kolhydrat-, fett- och proteinmetabolismen. Basala koncentrationer av glucagon är essentiella för att upprätthålla normoglykemi, och en fysiologisk roll för glucagon är att förebygga hypoglykemi.

Pankreas-ektomi förorsakar ej total frånvaro av glucagon. Emellertid är plasmakoncentrationen signifikant lägre än för normala (7, 10).

Eftersom glucagon vid diabetes har befunnits förhöjt absolut eller relativt till insulin, har det antagits att glucagon väsentligen bidrar till utvecklingen av hyperglykemi och keto-acidosis vid diabetes (11, 12, 13). Förhöjda nivåer av glucagon i plasma har observerats för patienter med A-cellstumörer (8).

Normal nivå av glucagon i plasma efter 12 timmars fasta: <60 pmol/L (erhållet med denna metod).

Varje laboratorium rekommenderas att etablera ett eget referensområde utifrån sin egen populations analysresultat.

Analysen ska inte ensam utgöra bedömningsgrund för beslut om klinisk terapi, utan ska användas tillsammans med kliniska symptom och resultat av andra tillgängliga tester.

PRINCIP

Dessa reagens är avsedda för bestämning av glukagon i plasma hos människa. Glukagon i plasma bestäms genom kompetitiv radioimmunoanalys med ett antiserum från kanin som framtagits mot ett glukagon albuminkonjugat. Glukagon i standarder och analysprov konkurrerar med ^{125}I -märkt glukagon om bindning till antikropparna under en tvåstegsinkubation.

^{125}I -glukagon binder till antikropparna i omvänd proportion till mängden glukagon i standarder och analysprov. Antikroppsbundet ^{125}I -glukagon separeras från obundet glukagon med hjälp av dubbel antikropp på fast fas. Radioaktiviteten i den bundna fraktionen mäts i en gammareäknare.

Det antiserum som används vid denna analys har en korsreaktivitet med tarm-GLI (14) på under 0.1%.

Reagenssatsen är avsedd för yrkesmässigt bruk vid ett analyslaboratorium.

VARNING

Endast för in vitro diagnostik

Eftersom föreskrifter varierar från land till land, är det av vikt att den person som är ansvarig för laboratoriet känner till gällande föreskrifter avseende radioaktivt material av den typ och mängd som används i denna analys.

Kitet innehåller komponenter med humant ursprung. Dessa har testats för hepatit B antigen samt antikroppar mot HCV, HIV-1 och HIV-2 och befunnits negativa. Komponenterna ska trots detta hanteras som möjlig smittrisk.

Detta kit innehåller ^{125}I (halveringstid: 60 dagar), avger röntgen (X: 28 keV) och gamma (γ : 35.5 keV) strålar. Vidta åtgärder enligt lokala och/eller landets föreskrifter avseende handhavande av radioaktivt material. Endast bemyndigad personal ska ha tillgång till reagenserna.

Följande säkerhetsåtgärder ska iakttas vid handhavande av radioaktivt material:

- Radioaktivt material ska förvaras i härför avsedda utrymmen, normalt ej tillgängliga för ej bemyndigad personal.
- Hantering av radioaktivt material ska ske i för ändamålet avsedda utrymmen.
- Försiktighet ska iakttas för att förhindra intag och kontakt med huden och kläderna. Pipettera inte radioaktivt material med munnen.
- Att äta, dricka eller röka ska vara förbjudet i utrymmen där radioaktivt material hanteras.
- Handskar ska användas och händerna ska tvättas efter hantering av radioaktivt material.
- Hantering ska ske på yta täckt med absorberande material.
- Utspillt radioaktivt material ska torkas upp omedelbart och allt kontaminerat material ska kasseras som radioaktivt avfall. Kontaminerade ytor ska torkas av med rengöringsmedel.

Reagensen i kitet innehåller natriumazid. Kontakt med avloppsrör av koppar eller bly kan resultera i ackumulerad bildning av mycket explosiva azidavlagringar. Vid utspolning av reagens i avloppet ska rikliga mängder vatten spolas med för att undvika uppkomst av metallisk azid. Rör som misstänks vara kontaminerade av explosiva avlagringar ska spolas/sköljas noggrant med 10% natriumhydroxidlösning.

REAGENSATSSENS INNEHÅLL

De reagens som medföljer varje sats räcker till 100 rör.

1. Anti-glukagon (reagens A)

Antiserum från kanin framtaget mot porcint glukagon, konjugerat med humant serumalbumin. Frystorkat i 5.0 mL 2.0 M glycinbuffert, pH 8.8, med 2.5% humant serumalbumin, 0.5% natriumazid och aprotinin (Trasylo[®] eller motsvarande). Rekonstitueras med 52 mL destillerat vatten. Det rekonstituerade reagenset innehåller 500 KIU aprotinin (Trasylo[®] eller motsvarande)/mL. Färg: Gult.

2. ¹²⁵I-glukagon (reagens B)

Total radioaktivitet: 0.75 μ Ci eller 28 KBq vid referensdatum. Producerat genom jodering av syntetiskt humant glukagon. Renat på HPLC, monojoderat.

Specifik aktivitet: 1700-2100 μ Ci/nmol (62-77 MBq/nmol). Frystorkat i 5.0 mL 2.0 M glycinbuffert, pH 8.8, med 2.5% humant serumalbumin, 0.5% natriumazid och aprotinin (Trasylo[®] eller motsvarande). Rekonstitueras med 52 mL destillerat vatten. Det rekonstituerade reagenset innehåller 500 KIU aprotinin (Trasylo[®] eller motsvarande) /mL. Färg: Blått.

3. Dubbel antikropp fast fas (reagens C)

Antikanin-Ig kopplat till cellulosapartiklar i 0,01 M fosfatbuffert, pH 6,8 med 0,25% humant serumalbumin, 0,045% NaCl, 0,05% NaN₃, 0,185% EDTA och 0,05% Tween 80. Volym: 11 mL suspension.

4. Spädningsbuffert (reagens D)

50 mL 0.2 M glycinbuffert, pH 8.8, med 0.25% humant serumalbumin, 0.05% natriumazid och 500 KIU aprotinin (Trasylo[®] eller motsvarande) /mL. Avsett för framställning av glukagonstandarder och istället för antiserum i kontrollrör för ospecifik bindning.

5. Glukagonstandard (reagens E)

5.00 mL standard. Koncentration: 300 pmol/L (1044 pg/mL) av syntetiskt humant glukagon. Frystorkat i 0.2 M glycinbuffert, pH 8.8, med 0.25% humant serumalbumin, 0.05% natriumazid och 500 KIU aprotinin (Trasylo[®] eller motsvarande) /mL. Rekonstitueras med 5.00 mL destillerat vatten.

6. Kontroller (reagens F-G)

Frystorkade kontroller. 2.00 mL av respektive kontroller efter rekonstituering. Glukagonkoncentrationen i kontrollerna indikeras på ampullernas etiketter. Innehåller 0.05% natriumazid.

REAGENS OCH UTRUSTNING SOM BEHÖVS MEN INTE MEDFÖLJER

Destillerat vatten
Engångsprovror av polystyren: 11-13x55 mm
Pipetter med engångsspetsar: 200 och 500 μ L
Glaspipetter 1.00 mL och 5.00 mL (för beredning av standardprov)
Vortexblandare
Centrifug, kyld, för minst 1700 x g
Gammaräknare

BEREDNING OCH FÖRVARING AV REAGENS

Alla reagens ska förvaras vid 2-8° C fram till rekonstituering och användning. Det vatten som används för rekonstituering av frystorkade reagens ska vara destillerat i en glasapparat eller ha motsvarande renhet. Lös innehållet i ampullen genom att försiktigt vända på ampullen. Undvik skumbildning. Reagensens stabilitet indikeras på ampullernas etiketter. För frystorkade reagens gäller utgångsdatum fram till rekonstituering. De rekonstituerade reagensen är stabila i 10 veckor (eller fram till utgångsdatum för märkt glukagon) vid förvaring enligt anvisningarna nedan.

Reagens A: Anti-glukagon

Rekonstitueras med 52 mL destillerat vatten.
Förvaras vid 2-8° C.

Reagens B: ¹²⁵I-glukagon

Rekonstitueras med 52 mL destillerat vatten.
Förvaras vid -18° C eller lägre om innehållet ska användas flera gånger.

Reagens C: Dubbel antikropp fast fas

Bruksfärdig. Rör om hela tiden när detta reagens pipetteras.
Förvaras vid 2-8° C.

Reagens D: Analysbuffert

Bruksfärdig. Förvaras vid 2-8° C.

Reagens E: Glukagonstandard

Rekonstitueras med 5.00 mL destillerat vatten.
Förvaras vid -18° C eller lägre om innehållet ska användas flera gånger.

reagens F-G: Kontroller

Rekonstitueras med 2.00 mL destillerat vatten. Förvaras vid -18° C eller lägre om innehållet ska användas flera gånger.

PROVTAGNING

Venöst blod uppsamlas i rör som innehåller EDTA och Trasolyl® (5000 KIU Trasolyl i en 10 mL Vacutainer). Provet kyls omedelbart i isbad. Plasma avskiljs genom centrifugering (helst i kyld centrifug). Plasma bör frysas inom 2 timmar och förvaras vid -18° C eller lägre fram till analystillfället. Upprepad frysning-upptining bör undvikas.

ANALYSPROCEDUR

Rekonstituera reagensen enligt anvisningarna. Noggrannhet vid all pipettering har avgörande betydelse. Alla analyser (standarder, kontroller, analysprov) ska dubbleras. På sidan 80 återfinns en översikt över analysproceduren.

En fullständig analys omfattar:

Standarder (St-rör): 7 koncentrationer: 0, 4.7, 9.4, 18.8, 37.5, 75, 150 pmol/L (= 0, 16.3, 32.6, 65.3, 131, 261, 522 pg/mL).

Kontroller (C-rör): Två olika kontroller med kända koncentrationer av glukagon för kvalitetskontroll.

Analysprov (S-rör):

Rör för bestämning av **ospecifik bindning (OSB-rör)**.

Rör för bestämning av **total tillsatt radioaktivitet (TOT-rör)**.

1. Rekonstituera reagensen enligt anvisningarna.
2. Bered arbetsstandarder av glukagon genom spädning av standarden som innehåller 300 pmol/L (reagens E) med spädningsbuffert (reagens D) enligt följande:
a/ 1.00 mL standard 300 pmol/L + 1.00 mL spädningsbuffert = 150 pmol/L
b/ 1.00 mL standard 150 pmol/L + 1.00 mL spädningsbuffert = 75 pmol/L
c/ 1.00 mL standard 75 pmol/L + 1.00 mL spädningsbuffert = 37.5 pmol/L
d/ 1.00 mL standard 37.5 pmol/L + 1.00 mL spädningsbuffert = 18.8 pmol/L
e/ 1.00 mL standard 18.8 pmol/L + 1.00 mL spädningsbuffert = 9.4 pmol/L
f/ 1.00 mL standard 9.4 pmol/L + 1.00 mL spädningsbuffert = 4.7 pmol/L
g/ spädningsbuffert = 0 pmol/L
Förvara dessa standardlösningar a - g samt reagens E vid -18°C om de ska användas flera gånger.
3. Pipettera 200 µL av standarderna a - g, kontrollerna och analysproven i respektive provrör (duplikat).
4. Pipettera 200 µL av spädningsbuffert i OSB-rören för standard.
5. Pipettera 500 µL av anti-glukagon (reagens A) i samtliga rör **utom** OSB- och TOT-rören.

6. Pipettera 500 μL spädningsbuffert (reagens D) i OSB-rören.
7. Vortexblanda och inkubera i 20-24 timmar vid 2-8° C.
8. Pipettera 500 μL ^{125}I -glukagon (reagens B) i samtliga rör. Sätt lock på TOT-rören och ta undan dem.
9. Vortexblanda samtliga rör noggrant och inkubera i 20-24 timmar vid 2-8° C.
10. Tillsätt 100 μL dubbel antikropp på fast fas (reagens C) till alla rör utom TOT-rören. Rör om hela tiden när detta reagens pipetteras.
11. Vortexblanda samtliga rör noggrant och inkubera i 30-60 minuter vid 2-8° C.
12. Centrifugera rören i 15 minuter vid + 4° C (1700 x g). **Notera:** Tillräckligt hög centrifugeringskraft är avgörande för analysens noggrannhet.
13. Dekanterera supernatanten omedelbart efter centrifugeringen.
Notera: Noggrann och konsekvent hantering av supernatanterna är avgörande för analysens precision.
14. Mät radioaktiviteten i pelleten i gammareäknare. Räknetiden bör vara minst 2 minuter.

BERÄKNING AV RESULTATEN

1. Subtrahera medelvärdet av CPM-värdena på OSB-rören för standard från CPM-värdena för replikaten av standardrören, analysproven och kontrollrören.
2. Skapa en standardkurva genom att avsätta fraktionen bunden aktivitet (CPM eller % B/TOT) mot koncentrationen i glukagonstandarden.
3. Interpolera fram glukagonkoncentrationerna i kontrollerna och analysproven utgående från standardkurvan.
4. Bildandet av standardkurvan och beräkningen av koncentrationer i analysproven kan göras med datorstöd. En spline-anpassning kan användas.
5. På sidan 81 visas en typisk standardkurva.
På sidan 82 visas en typisk analysomgång.

KVALITETSKONTROLL

För att säkerställa kvaliteten på utförd analys, ska följande punkter kontrolleras.

1. Uppmätt koncentration i kontrollproven

De uppmätta koncentrationerna i kontrollproven (reagensen F och G) ska ligga inom de gränser som anges på ampullerna.

2. Total counts

De erhållna värdena bör ligga nära förväntade CPM efter korrigering för räknarens verkningsgrad och isotopens sönderfall. Innehållet av ¹²⁵I-glukagon i analysatsen ger 10500 CPM (-5%, +30%) vid referensdatum (räknarens verkningsgrad = 80%).

3. Maximal bindning (B_0/TOT)

Beräkna för varje analys andelen (i %) av bunden radioaktivitet i nollstandard:
 $(B_0/TOT) \times 100 \%$

4. Ospecifik bindning (OSB/TOT)

Beräkna för varje analys andelen (i %) av ospecifik bindning:
 $(OSB/TOT) \times 100$.

Den ospecifika bindningen bör vara under 6%.

5. Lutningen på standardkurvan

Beräkna exempelvis 80, 50 och 20%-punkterna på standardkurvan för kontroll av reproducerbarhet från analystillfälle till analystillfälle.

PRESTANDA**Känslighet**

Den lägsta mätbara koncentrationen är 3 pmol/L.

Denna siffra motsvarar en minskning i bindningen med dubbla standardavvikelsen (2xSD) av radioaktiviteten i standarden med koncentrationen noll.

Precision

Variationer inom analyser:

<u>Nivå</u>	<u>Variationskoefficient (%VK)</u>	<u>N</u>
16.4 pmol/L	8.1	30
60.1 pmol/L	4.5	30

Total variation (summan av variation inom analys och mellan analys)

<u>Nivå</u>	<u>Variationskoefficient (%VK)</u>	<u>N</u>
25.4 pmol/L	6.8	6
22.0 pmol/L	7.4	6
23.0 pmol/L	8.3	5
73.9 pmol/L	3.9	6
97.9 pmol/L	5.6	6

Noggrannhet

Utbytet var 97.6% vid tillsats av kända mängder glukagon till plasmavprov.

Specificitet

Följande korsreaktioner har uppmätts:

<u>Peptid</u>	<u>Korsreaktion</u>
Glukagon från pankreas, humant	100.0%
Tarm-GLI	<0.1%
Sekretin	<0.02%
Cholecystokinin-39	<0.02%
Vasoaktiv intestinal peptid	<0.02%
Gastric inhibitory peptide	<0.02%
GLP- 1	< 0.1%
Oxyntomodulin	< 0.1%

Korrelation

Euria-Glucagon analysen korrelerar med WHO 69/194 standarden.

Interferens

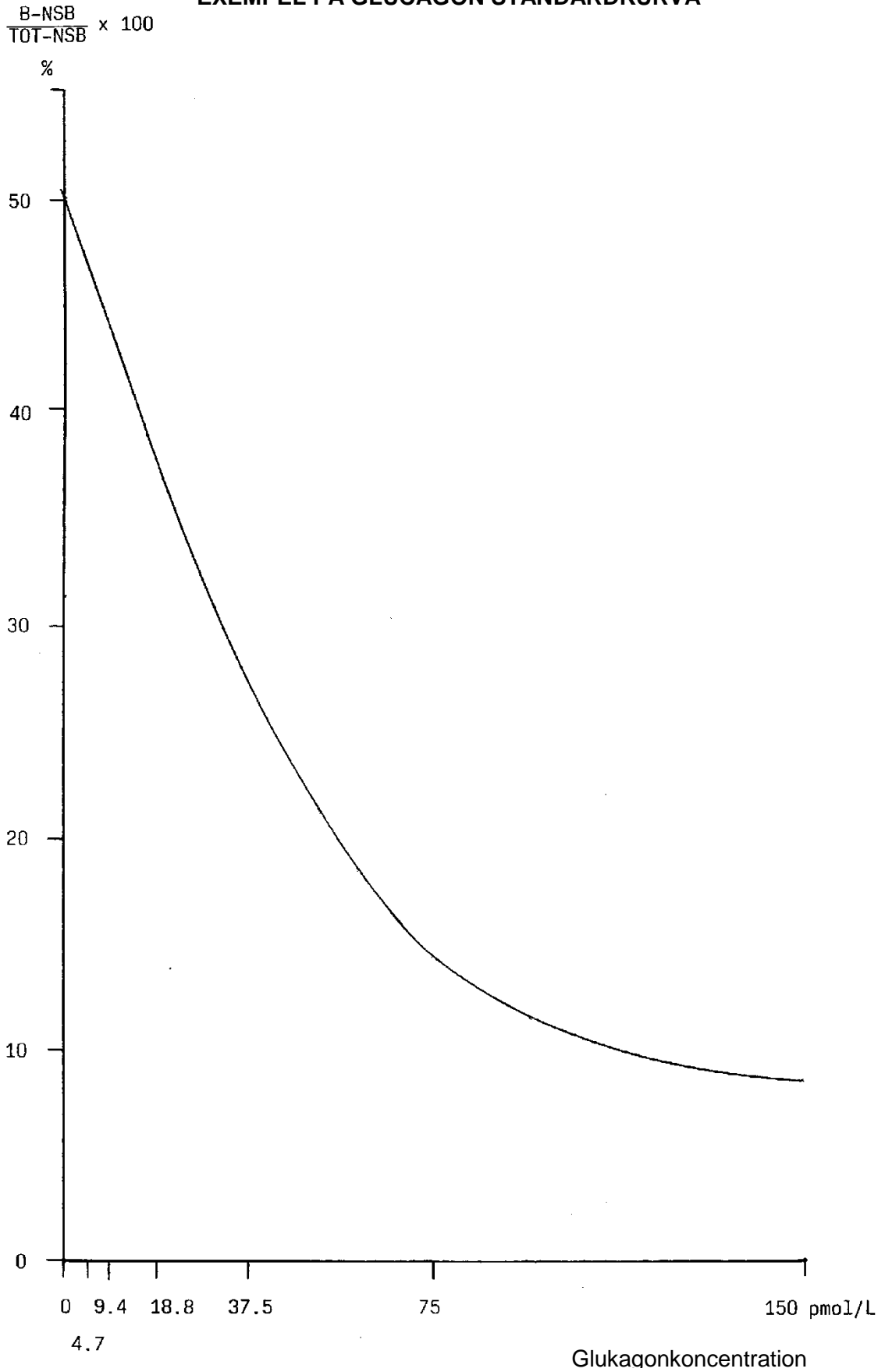
Prov som uppvisar grumlighet, hemolys, hyperlipemi eller som innehåller fibrin kan ge felaktiga resultat.

SCHEMA ÖVER UTFÖRANDET

Typ av rör	Rör nr	Standard, kontroll eller prov	Anti-glucagon (A)	Spädningsbuffert (D)		¹²⁵ I-glucagon (B)		Dubbel antikropp fast fas (C)	
TOT	1-2	-	-	-	Vortexa	500 µL	Vortexa	-	Vortexa och
OSB _{st}	3-4	200 µL	-	500	och	500 µL	och	100 µL	inkubera
Stand 0	5-6	200 µL	500 µL	-	inkubera	500 µL	inkubera	100 µL	30-60 min. vid
Stand 4.7	7-8	200 µL	500 µL	-	20-24	500 µL	20-24	100 µL	2-8° C.
Stand 9.4	9-10	200 µL	500 µL	-	timmar	500 µL	timmar	100 µL	Centrifugera
Stand 18.8	11-12	200 µL	500 µL	-	vid	500 µL	vid	100 µL	15 min.
Stand 37.5	13-14	200 µL	500 µL	-	2-8° C.	500 µL	2-8° C.	100 µL	1700 x g
Stand 75	15-16	200 µL	500 µL	-		500 µL		100 µL	vid +4° C.
Stand 150	17-18	200 µL	500 µL	-		500 µL		100 µL	Dekantera och
Kontroll (F)	19-20	200 µL	500 µL	-		500 µL		100 µL	mät
Kontroll (G)	21-22	200 µL	500 µL	-		500 µL		100 µL	precipitatens
Prov 1	23-24	200 µL	500 µL	-		500 µL		100 µL	radioaktivitet.
etc.									

EXAMPLE OF A GLUCAGON STANDARD CURVE

EXEMPEL PÅ GLUCAGON STANDARDKURVA



TYPISKA DATA FÖR GLUCAGON STANDARDKURVA VID REFERENS DATUM

Rör nr	Typ av rör	Koncentration pmol/L	CPM (rå)	$\frac{B}{TOT} \times 100$
1	OSB _{st}	-	684	5.5%
2	"	-	653	5.3%
3	TOT	-	12301	$\frac{B-OSB}{TOT-OSB} \times$
4	"	-	12347	100
5	St	0.0	6253	
6	"	"	6203	50.7%
7	St	4.7	5827	50.3%
8	"	"	5775	47.3%
9	St	9.4	5267	46.9%
10	"	"	5384	42.7%
11	St	18.8	4661	43.7%
12	"	"	4729	37.8%
13	St	37.5	3379	38.4%
14	"	"	3310	27.4%
15	St	75	1777	26.9%
16	"	"	1760	14.4%
17	St	150	1050	14.3%
18	"	"	1081	8.5%
				8.8%

Kontrollparametrar

$\frac{B_0}{TOT} \times 100 : 48.0 \%$

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

ED 80 : 14.5 pmol/L




ED 50 : 39.8 pmol/L

ED 20 : 100 pmol/L

REFERENCES / RÉFÉRENCES / REFERENCIAS / LITERATUR / BIBLIOGRAFIA / REFERENSER

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

SYMBOLS USED ON LABELS / SYMBOLES UTILISÉS SUR LES ÉTIQUETTES / SIMBOLOS UTILIZADOS EN LAS ETIQUETAS / ERLÄUTERUNG DER SYMBOLE / SIMBOLI USATI SULLE ETICHETTE / SYMBOLER PÅ ETIKETTERNA

	Batch code. Numéro de lot. Número de lote. Chargen-Nummer. Numero di lotto. Satsnummer.
	Catalogue number. Référence catalogue. Número de catálogo. Katalog-Nummer. Numero di catalogo. Katalognummer.
	Use-by date. Date de péremption. Fecha de caducidad. Verfallsdatum. Usare entro. Använd före.
	Temperature limit. Seuils de températures. Rango de temperature. Temperaturbereich. Limitazioni di temperatura. Förvaringstemperatur.
	Date of manufacture. Date de fabrication. Fecha de fabricacion. Datum der Herstellung. Data di produzione. Tillverkningsdatum.
	Contains radioactive substances. Contient des substances radioactives. Contiene sustancias radiactivas. Enthält radioaktive Stoffe. Contiene sostanze radioattive. Innehåller radioaktiva ämnen.
	Biological risk. Risque biologique. Riesgo biológico. Biologische Gefährdung. Rishio biologico. Biologisk risk.
	Consult instructions for use. Lire le mode d'emploi. Consulte las instrucciones de uso. Gebrauchsanweisung beachten. Leggere le istruzioni per l'uso. Läs instruktionsmanualen.
	In vitro diagnostic medical device. Dispositif médical de diagnostic in vitro. Producto sanitario para diagnóstico in vitro. In-vitro-Diagnostikum. Dispositivo medico-diagnostico in vitro. In vitro diagnostik medicinsk utrustning.
	Manufacturer. Fabricant. Fabricante. Hersteller. Produttore. Tillverkare.
	Contains sufficient for 100 tests. Contenu suffisant pour 100 tests. Contenido suficiente para 100 pruebas. Inhalt ausreichend für 100 Tests. Contenuto sufficiente per 100 test. Innehåller tillräckligt för 100 test.
	Conformity to 98/79/EC on In Vitro Diagnostic Medical Device Directive. Conformément à la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro. La conformidad con la Directiva 98/79/CE sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro. Konform mit Richtlinie 98/79/EG zu In-vitro-Diagnostika. Conformità alla direttiva 98/79/CE relativa ai dispositivi medico-diagnostici in vitro. Överensstämmer med direktiv 98/79/EG för medicintekniska produkter

REAG	A	Ab		Anti-Glucagon. Anti-Glucagon. Anti-glucagón. Anti Glukagon. Anti Glucagone. Anti-Glucagon.
REAG	B	Ag	¹²⁵I	¹²⁵ I-Glucagon. ¹²⁵ I-Glucagon. Glucagón I- ¹²⁵ . ¹²⁵ I-Glukagon. Glucagone ¹²⁵ I. ¹²⁵ I-Glucagon
REAG	C	DASP		Double antibody solid phase. Phase solide à double anticorps.. Fase sólida de doble anticuerpo. Doppel-Antikörper-Festphase. Secondo anticorpo-fase solida. Dubbel antikropp fast fas
REAG	D	DIL	AS	Assay diluent. Diluant d'immunodosage. Diluyente. Assaypuffer. Diluente. Spädningsbuffert
REAG	E	CAL	300	Glucagon standard 300 pmol/L. Standard de glucagon 300 pmol/L. Estándar de Glucagón 300 pmol/L. Glucagon standard 300 pmol/L. Standard di Glucagone 300 pmol/L. Glucagonstandard 300 pmol/L
REAG	F	CONTROL		Control, level 1 (low). Témoin, niveau 1 (bas). Control, nivel 1 (bajo). Kontrolle, Level 1 (niedrig). Controlli, Livello 1 (basso) Kontroll, nivå 1 (låg)
REAG	G	CONTROL		Control, level 2 (high). Témoin, niveau 2 (élevé). Control, nivel 2 (alto). Kontrolle, Level 2 (hoch). Controlli, Livello 2 (elevato) Kontroll, nivå 2 (hög)

EURO DIAGNOSTICA AB

Lundavägen 151, SE-212 24 Malmö, Sweden
 Telephone: +46 40 53 76 00, Fax: +46 40 43 22 88
 E-mail: info@eurodiagnostica.com
 www.eurodiagnostica.com