

Glucagon

DOUBLE ANTIBODY

DPC[®]

Double Antibody Glucagon

English

Intended Use: Double Antibody Glucagon is an ^{125}I radioimmunoassay designed for the quantitative measurement of glucagon in EDTA plasma. It is intended for *in vitro* diagnostic use to aid in the diagnosis and treatment of patients with disorders of carbohydrate metabolism, including diabetes mellitus, hypoglycemia and hyperglycemia.

Catalog number: **KGND1** (100 tubes)

CDC Analyte Identifier Code: **2206**

CDC Test System Identifier Code: **13031**

CLIA Complexity Category: **High**



The 100-tube kit contains less than 2 microcuries (74 kilobecquerels) of radioactive ^{125}I glucagon.

Summary and Explanation

Glucagon is a single-chain polypeptide, 29 amino acids in length, produced in the pancreatic alpha cells. In its action, it is generally antagonistic to insulin, which is secreted by the pancreatic beta cells. Like insulin, glucagon is involved in the regulation of circulating glucose levels; but whereas insulin typically acts to oppose hyperglycemia, glucagon is part of a counterregulatory system – which includes epinephrine and several other factors, usually of lesser significance – designed to defend against hypoglycemia.^{6,25,26} In response to increased glucose utilization (as during periods of exercise) or depletion induced by insulin, glucagon helps to restore circulating levels by stimulating glucose production in the liver.⁶

Glucagon determinations may thus be of relevance to patients with insulin-dependent diabetes who are undergoing, or are being considered for, intensive insulin therapy. In such a context, defective counterregulation – characterized by a *combined* deficiency in both glucagon and epinephrine responses to decrements in circulating glucose – would entail increased risk for severe, insulin-induced hypoglycemic episodes.^{1,4,5,6,24}

Glucagon is structurally related to other neurohormonal peptides, including secretin, vasoactive intestinal polypeptide (VIP) and gastric inhibitory peptide (GIP).²² The hormone shows considerable species-to-species similarity, especially among Old World mammals.^{7,22} The amino acid sequence of human glucagon is identical to that of the glucagon found in cows, pigs, rabbits, rats and hamsters; guinea pig glucagon, on the other hand, differs at five positions. Turkey and chicken glucagons differ from human glucagon at just one position; duck and alligator glucagons at two.

Glucagon derives from preproglucagon, which is present in the alpha cells of the pancreas and also in the gut. This precursor includes an N-terminal signal peptide (residues –24 to –1), followed by glicentin (residues 1 to 69) and what has been called the major proglucagon fragment (residues 72 to 160). The latter includes two glucagon-like peptides, designated GLP-1 and GLP-2. Glicentin, which is also known as gut glucagon and glucagon-like immunoreactivity 1 (GLI-1), includes glicentin-related pancreatic peptide (GRPP, glicentin-1) followed by glucagon itself (residues 33 to 61) and a hexapeptide. The C-terminal fragment of glicentin, which contains glucagon and the hexapeptide, has been variously referred to as oxyntomodulin, enteroglucagon, GLI-2 and glucagon-37.²²

Whereas the gut secretes mainly the intact N-terminal half of preproglucagon (i.e., glicentin) along with oxyntomodulin and the C-terminal fragments GLP-1 and GLP-2, the pancreas secretes mainly the intact C-terminal half (i.e., the so-called major proglucagon fragment) along with the N-terminal fragments GRPP, glucagon and oxyntomodulin.^{2,22} Since glicentin, which has sometimes been called proglucagon, is not a typical secretory product of the pancreas, it may not be a normal intermediary in the biosynthesis of glucagon.² Even so, the fact that circulating glucagon levels tend to remain normal in human subjects after total pancreatectomy hints at the existence of some mechanism for transforming intestinal products to glucagon.^{2,26}

Principle of the Procedure

DPC's Double Antibody Glucagon procedure is a sequential radioimmunoassay. After preincubation of the patient sample with anti-glucagon antibody, ¹²⁵I-labeled glucagon competes with glucagon in the sample for antibody sites. After incubation for a fixed time, separation of bound from free is achieved by the PEG-accelerated double-antibody method, followed by centrifugation. The precipitate containing the antibody-bound fraction is then counted, and patient concentrations are read from a calibration curve.

Reagents to Pipet: 3

Total Incubation Time: Two 24-hour incubations.

Total Counts at Iodination: approximately 25,000 cpm.

Separation: The ready-to-use Precipitating Solution combines second antibody and dilute PEG.

Warnings and Precautions

For *in vitro* diagnostic use.

Reagents: Store at 2–8°C in a refrigerator designated for incoming radioactive materials. Dispose of in accordance with applicable laws.

Do not use reagents beyond their expiration dates.

Some components supplied in this kit may contain human source material and/or other potentially hazardous ingredients which necessitate certain precautions.

Follow universal precautions, and handle all components as if capable of transmitting infectious agents. Source materials derived from human blood were tested and found nonreactive for syphilis; for antibodies to HIV 1 and 2; for hepatitis B surface antigen; and for antibodies to hepatitis C.

Sodium azide, at concentrations less than 0.1 g/dL, has been added as a preservative. On disposal, flush with large volumes of water to prevent the buildup of potentially explosive metal azides in lead and copper plumbing.

Water: Use distilled or deionized water.

Radioactivity: A copy of any radioisotope license certificate (Specific or General) issued to a US customer must be on file with Diagnostic Products Corporation before kits or components containing radioactive material can be shipped. These radioactive materials may be acquired by any customer with the appropriate Specific license. Under a General license these radioactive materials may be acquired only by physicians, veterinarians in the practice of veterinary medicine, clinical laboratories and hospitals — and strictly for *in vitro* clinical or laboratory tests not involving external or internal administration of the radioactive material or its radiation to human beings or other animals. Its acquisition, receipt, storage, use, transfer and disposal are all subject to the regulations and a (General or Specific) license of the U.S. Nuclear Regulatory Commission or a State with which the NRC has entered into an agreement for the exercise of regulatory control.

Handle radioactive materials according to the requirements of your General or Specific license. To minimize exposure to radiation, the user should adhere to guidelines set forth in the National Bureau of Standards publication on the *Safe Handling of Radioactive Materials* (Handbook No. 92, issued March 9, 1964) and in subsequent publications issued by State and Federal authorities.

Wipe up spills promptly and decontaminate affected surfaces. Avoid generation of aerosols. Dispose of solid radioactive waste according to license requirements. General licensees (holders of NRC Form 483) may dispose of solid radioactive waste as nonradioactive waste, after removing labeling. Specific licensees (NRC Form 313) should refer to Title 10, Code of Federal Regulations, Part 20. Licensees in Agreement States should refer to the appropriate regulations of their own state. General licensees may dispose of liquid radioactive waste of the type contained in this product through a laboratory sink drain. Licensees must remove or deface labels from empty containers of radioactive materials before disposal of solid waste. Specific licensees may dispose of small quantities of liquid radioactive waste of the type used in this product through a laboratory sink drain.

Refer to the appropriate regulations applicable to your laboratory.

Materials Supplied

Glucagon Antiserum (GND1)

Lyophilized glucagon antiserum, raised in rabbits, with preservative. Reconstitute by adding **10 mL** distilled water. Mix by *gentle* inversion. Stable at 2–8°C for 30 days after reconstitution. Color: blue.

KGND1: 1 vial

¹²⁵I Glucagon (GND2)

Lyophilized, iodinated synthetic human glucagon, with preservative. Just before assay, reconstitute by adding **10 mL** distilled water. Mix by *gentle* inversion. Stable at 2–8°C for 30 days after reconstitution.

KGND1: 1 vial

Glucagon Zero Calibrator (GND3)

Lyophilized zero calibrator in a protein-based matrix, with preservative. *At least 30 minutes before use*, reconstitute each vial with **10 mL** distilled water. Mix by *gentle* inversion. Stable at 2–8°C for 30 days after reconstitution, or for 2 months (aliquotted) at –20°C.

KGND1: 2 vials

Glucagon Calibrator F (GND8)

Lyophilized calibrator containing synthetic human glucagon in a protein-based matrix, with preservative. *At least 30 minutes before use*, reconstitute each vial with **2.0 mL** distilled or deionized water. Use a volumetric pipet and mix by *gentle* inversion. *Discard after use*.

KGND1: 3 vials

The calibrator F has a *lot-specific* value of approximately 500 picograms of synthetic human glucagon per milliliter (pg/mL); equivalently 144 picomoles per liter (pmol/L). Refer to the vial labels for exact values in pg/mL. The assay is standardized in terms of the World Health Organization's International Standard for Glucagon, number 69/194.

Precipitating Solution (GNRG)

110 mL of Precipitating Solution consisting of goat anti-rabbit gamma globulin (GARGG) and dilute polyethylene glycol (PEG) in saline, with gentamicin as a preservative. The Precipitating Solution is

supplied in liquid form, ready to use. Remove the aluminum foil seal completely and store refrigerated: stable at 2–8°C for 30 days after opening. Since a fine (but visible) precipitate may form after refrigeration, the Precipitating Solution should be thoroughly mixed before use, without foaming. Color: red.

KGND1: 1 vial

Glucagon Controls (GNCO1, GNCO2)

Two vials, labeled Glucagon Control 1 and 2, containing synthetic human glucagon in a protein-based matrix, with preservative. The controls are supplied lyophilized. *At least 30 minutes before use*, reconstitute each vial with **1.0 mL** distilled water. Use a volumetric pipet and mix by *gentle* inversion. *Discard after use*. Refer to the control insert for glucagon values in pg/mL.

KGND1: 3 sets.

Required But Not Provided

Gamma counter

Centrifuge – refrigerated and capable of at least 1500xg

Vortex mixer

Reagent Preparation

Distilled or deionized water

Pipets for measuring 5.0 mL and 10 mL

Volumetric pipet: 1.0 mL

Radioimmunoassay

Plain 12x75 mm *glass* tubes – available from DPC. Tubes should be made of high-quality borosilicate glass. Because of glucagon's tendency to adsorb to plastic surfaces, glass tubes (rather than plastic) should be employed for the assay.

Micropipets – 50 μ L, 100 μ L, 200 μ L, 500 μ L, and 1.0 mL. For the 100 μ L additions, a reliable repeating dispenser is recommended. A syringe-style dispenser accurate to within ± 0.05 mL is recommended for the 1.0 mL addition of Precipitating Solution.

Parafilm

Foam decanting rack – available from DPC

Logit-log graph paper – available from DPC (catalog number: ZP797)

Specimen Collection

The patient need not be fasting, and no special preparations are necessary. Collect blood by venipuncture²⁷ into *iced* EDTA tubes, noting the time of collection. The tubes should be immersed in an ice bath at 2–8°C throughout the entire collection and handling process.

Immediately following collection, add 5,000 Kallikrein Inactivating Units (KIU) per 10 mL of whole blood, in the form of Trasylol (500 µL) or Aprotinin (1 mg). Mix thoroughly and keep chilled until separation.

Separate the plasma from the cells by centrifugation in a *refrigerated* centrifuge. Aspirate the plasma with a glass Pasteur pipet, then transfer it into a *glass* tube and freeze immediately. Aliquot, if necessary.

Lipemia may interfere with the assay. The use of an ultracentrifuge is recommended to clear lipemic samples.

Hemolyzed samples may indicate mistreatment of a specimen before receipt by the laboratory; hence the results should be interpreted with caution.

Blood collection tubes from different manufacturers may yield differing values, depending on materials and additives, including gel or physical barriers, clot activators and/or anticoagulants. Double Antibody Glucagon has not been tested with all possible variations of tube types.

Volume Required: 200 µL of EDTA plasma per tube.

Storage: *Caution:* Do not use plastic tubes or pipets in any part of the preparation. Keep samples chilled at all times and away from direct light. Thawing and refreezing, or prolonged exposure to room temperature (15–28°C), may result in significantly lower glucagon values.

Radioimmunoassay Procedure

All components except the Precipitating Solution must be at room temperature (15–28°C) before use.

Caution: Because of the tendency of glucagon to adsorb to plastic surfaces, *glass* tubes rather than plastic should be employed for the assay. (The use of plastic tubes could result in the loss of all detectable glucagon.)

- 1 Just before assay, dilute the 500 pg/mL Glucagon Calibrator F in the Glucagon Zero Calibrator, using *glass* tubes or *glass* vials, as described in the table below. Vortex each dilution thoroughly.

Add this...		To this...		Yielding this Calibrator		
µL	Calib.	µL	Calib.	pg/mL	pmol/L	
50	Calib. F	950	Zero	B	25	7
100	Calib. F	900	Zero	C	50	14
200	Calib. F	800	Zero	D	100	29
500	Calib. F	500	Zero	E	250	72

- 2 Label sixteen glass tubes in duplicate: T (total counts), NSB (nonspecific binding), A (maximum binding) and B through F. Label additional tubes, also in duplicate, for plasma samples and controls.

Calibrator	Approximate pg/mL	Approximate pmol/L
A (MB)	0	0
B	25	7
C	50	14
D	100	29
E	250	72
F	500	144

Note: The value of the calibrators are *lot-specific*. Refer to the vial labels for exact values in pg/mL.

- 3 Pipet **200 µL** of the zero calibrator A into the NSB and A tubes, and **200 µL** of each of the remaining calibrators B through F into correspondingly labeled tubes. Pipet **200 µL** of each patient plasma sample and each control into the tubes prepared.

It is good practice to use a *disposable-tip* micropipet, changing the tip between samples, in order to avoid carryover contamination.

Samples expected to contain glucagon concentrations greater than the highest calibrator (calibrator F, 500 pg/mL) should be diluted in the zero calibrator before assay.

- 4 Add **100 µL** of Glucagon Antiserum (BLUE) to all tubes except the NSB and T tubes. Vortex.

A repeating dispenser is recommended for this step and for the addition of tracer at step 6.

5 Cover the rack and incubate for 24 hours at 2–8°C.

Cover the entire rack with Parafilm or place the racks in plastic bags to avoid evaporation.

6 Add 100 µL of ¹²⁵I Glucagon (CLEAR) to all tubes. Vortex.

Remove the T tubes for counting at step 11; they require no further processing.

7 Cover the rack and incubate for 24 hours at 2–8°C.

Cover the entire rack with Parafilm or place the racks in plastic bags to avoid evaporation.

8 Add 1.0 mL of cold Precipitating Solution (RED) to all tubes. Vortex.

For the 1.0 mL reagent addition, a repeating dispenser may be employed.

9 Centrifuge for 15 minutes at 1500xg.

10 Using a foam decanting rack, decant (or aspirate) the supernatant, retaining the precipitate for counting.

Let the tubes stand inverted on absorbant paper for 10 minutes. Then tap the tubes gently and blot the rims, to remove residual droplets.

11 Count each tube for 1 minute.

Calculation of Results

To obtain results in terms of concentration from a logit-log representation of the calibration curve, first calculate for each pair of tubes the average NSB-corrected counts per minute:

Net Counts = (Average CPM) minus (Average NSB CPM)

Then determine the binding of each pair of tubes as a percent of maximum binding (MB), with the NSB-corrected counts of the A tubes taken as 100%:

Percent Bound = (Net Counts / Net MB Counts) × 100

(The calculation can be simplified by omitting the correction for nonspecific binding; samples within range of the calibrators yield virtually the same results

when Percent Bound is calculated directly from Average CPM.)

Using logit-log graph paper, plot Percent Bound on the vertical (probability) axis against Concentration on the horizontal (logarithmic) axis for each of the nonzero calibrators, and draw a straight line approximating the path of these points. Results for the unknowns may then be read from the line by interpolation.

It is good practice to inspect results for agreement within replicates, and to construct a graph of the calibration curve (even if the calculations are handled by computer) as a visual check on the appropriateness of the transformation used and as a way to detect deviant calibration points. We also recommend keeping track of these data reduction parameters:

T = Total Counts (as counts per minute)

%NSB = 100 × (Average NSB Counts / Total Counts)

%MB = 100 × (Net Counts / Total Counts)

And the 20, 50 and 80 percent "intercepts," where

20% = Concentration at 20 Percent Bound, etc.

Note that other approaches, e.g. a sound implementation of the 4-parameter logistic, are also acceptable. See Dudley RA, et al. Guidelines for immunoassay data reduction. Clin Chem 1985;31:1264-71.

Example Run: For illustration only, not for calculating results from another run. Because the calibrator values are *lot-specific*, concentrations listed in the right-most column may not match the values of the calibrators supplied in your shipment. (See "Example Run" table.)

Quality Control

The Glucagon control(s) supplied with the kit should be used as quality control material to monitor the performance of the assay.

Report patient results only if the control results for that assay meet your laboratory's established criteria for acceptability.

It is good laboratory practice to record for each assay the lot numbers of the components used, as well as the dates when they were first reconstituted or

opened. We also recommend charting control results from day to day — as described, for example, in Westgard JO, et al. A multi-rule chart for quality control. Clin Chem 1981;27:493-501. Note that repeat samples can serve as a valuable additional tool for monitoring interassay precision, and that pairs of control tubes can be spaced throughout the assay to help verify the absence of significant drift.

Centrifugation: The procedure calls for centrifuging at 1500xg for 15 minutes. A high-speed, refrigerated centrifuge is desirable but not essential. Use the formulas below to calculate the acceleration of your centrifuge at a given speed, or the speed (in revolutions per minute) required to achieve a desired g force.

$$g \text{ force} = 28.38 \times (\text{rpm} / 1,000)^2 \times \text{radius [inches]}$$

$$\text{rpm} = 187.7 \times \sqrt{(g \text{ force} / \text{radius [inches]})}$$

or

$$g \text{ force} = 11.18 \times (\text{rpm} / 1,000)^2 \times \text{radius [cm]}$$

$$\text{rpm} = 299.1 \times \sqrt{(g \text{ force} / \text{radius [cm]})}$$

Expected Values

A reference range study was performed in which plasma samples from 51 laboratory volunteers were assayed by the Double Antibody Glucagon procedure. This study yielded a median of 112 pg/mL (32 pmol/L) and a range — corresponding to the central 95% of the observations — of 59 – 177 pg/mL (17 – 51 pmol/L)

Laboratories should consider these results as *guidelines only*. Each laboratory should establish its own reference ranges.

Limitations

When monitoring a patient for glucagon levels, a baseline must be established for that patient using the same assay system, as differences have been observed in glucagon values measured by different assays.

Performance Data

See Tables and Graphs for data representative of the Double Antibody Glucagon kit's performance. Results are expressed as pg/mL.

Conversion Factor:

$$\text{pg/mL} \times 0.2872 \rightarrow \text{pmol/L}$$

Calibration Range: 25 – 500 pg/mL (WHO IS 69/194)

The calibrator values are *lot-specific*.

Analytical Sensitivity: 13 pg/mL (3.7 pmol/L).

Intraassay Precision (Within-Run):

Statistics were calculated for samples from the results of 20 pairs of tubes in a single assay. (See "Intraassay Precision" table.)

Interassay Precision (Run-to-Run):

Statistics were calculated for samples from the results of pairs of tubes in 20 different assays. (See "Intraassay Precision" table.)

End-of-Run Effect: None up to approximately 180 tubes. (See "End-of-Run" Effect table.)

Specificity: Percent crossreactivity was calculated for intact glucagon, glucagon fragments, and related compounds on a weight-per-weight basis; the table shows that Double Antibody Glucagon is highly specific for glucagon. (See "Specificity" table.)

Bilirubin: Presence of bilirubin in concentrations up to 200 mg/L has no effect on results, within the precision of the assay.

Hemolysis: Presence of packed red blood cells in concentrations up to 30 $\mu\text{L/mL}$ has no effect on results, within the precision of the assay.

Linearity: Samples were assayed under various dilutions. (See "Linearity" table.)

Effect of Storage in Plastic and Glass Tubes:

To determine the effect of storing patient samples in plastic and in glass tubes, blood was collected from 10 volunteers into EDTA tubes and spiked with aprotinin to a concentration of one gram aprotinin per liter (1.0 g/L). The plasma was aliquoted into glass and plastic tubes, which were stored frozen for 5 days. All samples were then assayed by the Double Antibody Glucagon procedure, with the following results.

$$(\text{Plastic}) = 0.87 (\text{Glass}) - 6.0 \text{ pg/mL}$$

$$r = 0.98$$

Means:

57 pg/mL (Plastic)

72 pg/mL (Glass)

The values obtained for aliquots stored in plastic tubes were consistently lower than

matched values for aliquots stored in glass tubes. Based on this study, it is recommended that patient samples be stored in glass tubes.

Effect of Aprotinin: To determine the effect of aprotinin on patient sample stability, two sets of twelve EDTA plasma samples were collected from 12 volunteers. One set was spiked with aprotinin (1.0 g/L). All samples were then assayed by the Double Antibody Glucagon procedure. By linear regression:

(Without Aprotinin) =
1.07 (With Aprotinin) + 52 pg/mL
 $r = 0.77$

Means:
111 pg/mL (Without Aprotinin)
55 pg/mL (With Aprotinin)

The analysis shows that results are higher in the absence of aprotinin, presumably due to crossreacting glucagon fragments arising from proteolytic degradation. This confirms the need to stabilize samples by adding aprotinin, as indicated in the Specimen Collection section.

Method Comparison: DPC's Double Antibody Glucagon kit was compared to another commercially available glucagon assay (Kit A) on 20 samples. DPC results were generally lower than results for Kit A. By linear regression:

(DPC) = 0.015 (Kit A) + 142 pg/mL
 $r = 0.051$

Means:
145 pg/mL (DPC)
251 pg/mL (Kit A)

The two kits likewise differ in their expected values; the upper limit of the reference range for the DPC kit is 130 pg/mL, but 250 pg/mL for Kit A.

Differences in reference ranges are actually a common feature of immunoassays employing different antibodies and heterogeneous analytes. This may help to explain the lower values generated by the DPC kit; they suggest that Kit A recognizes glucagon precursors and/or fragments to a greater extent. This hypothesis is corroborated by the DPC assay's demonstrated lack of crossreactivity to preproglucagon 72–108, preproglucagon 72–107, preproglucagon 126–159, gastric inhibitory peptide, oxyntomodulin, secretin and vasoactive intestinal peptide (VIP). (See "Method Comparison" table.)

Standardization: To verify the standardization of the Double Antibody Glucagon procedure, the World Health Organization's International Standard for Glucagon, number 69/194, was diluted to concentrations corresponding to the nonzero calibrator levels. The DPC zero calibrator was used as diluent. These dilutions of the WHO preparation, along with a set of the DPC calibrators, were processed by DPC's Double Antibody Glucagon procedure.

The percent bound (%B/B₀) values displayed in the table confirm parallelism with the WHO preparation. The DPC calibrators behave like dilutions of the reference material. (See "Standardization" table.)

References

- 1) Amiel S, et al. Defective glucose counterregulation after strict glycemic control of insulin-dependent diabetes mellitus. *New Eng J Med* 1987;316:1376-83.
- 2) Bataille D, et al. Glucagon and related peptides; molecular structure and biological specificity. *Ann N Y Acad Sci* 1988;527:168-85.
- 3) Bodanszky M, Bodanszky A. Conformation of peptides of secretin-VIP-glucagon family in solution. *Peptides* 1986;7 Sup 1:43-8.
- 4) Bolli GB, et al. A reliable and reproducible test for adequate glucose counterregulation in type I diabetes mellitus. *Diabetes* 1984;33:732-7.
- 5) Cryer PE, Gerich JE. Glucose counterregulation, hypoglycemia, and intensive insulin therapy in diabetes mellitus. *New Eng J Med* 1985;313:232-41.
- 6) Cryer PE, White NH, Santiago JV. The relevance of glucose counterregulatory systems to patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Endocr Rev* 1986;7:131-9.
- 7) Epple A, Brinn JE. The Comparative Physiology of the Pancreatic Islets. Berlin: Springer-Verlag, 1987.
- 8) Gulan M, et al. Counterregulatory hormone responses preserved after long-term intravenous insulin infusion compared to continuous subcutaneous insulin infusion. *Diabetes* 1988;37:526-31.
- 9) Hagopian WA, Tager HS. Hepatic glucagon metabolism. *J Clin Invest* 1987;79:409-17.
- 10) Heller SR, Macdonald IA, Tattersall RB. Counterregulation in type II (non-insulin-dependent) diabetes mellitus; normal endocrine and glycaemic responses, up to ten years after diagnosis. *Diabetologia* 1987;30:924-9.
- 11) Hermansen K, et al. Glucagon responses to intravenous arginine and oral glucose in insulin-dependent diabetic patients during six months conventional or continuous subcutaneous insulin infusion. *Metabolism* 1988;37:640-4.
- 12) Iyengar R, Herberg JT, Rich KA. The glucagon receptor. *Pharmacol Ther* 1988;37:151-65.
- 13) Kumai M, et al. Glucagon secretion in anorexia nervosa.

Am J Clin Nutr 1984;47:239-42. 14) Lefévre PJ. Accumulated experience in the physiology of glucagon. In: Picazo J, editor. Glucagon in 1987. Lancaster: MTP Press, 1987: 3-12. 15) Matschinsky FM, Bedoya FJ. Metabolism of pancreatic islets and regulation of insulin and glucagon secretion. In: DeGroot LJ, editor. Endocrinology. Philadelphia: Saunders, 1989;2:1290-1303. 16) Nishino T, et al. Glucagon radioimmunoassay with use of antiserum to glucagon C-terminal fragment. Clin Chem 1981;27:1690-7. 17) Reaven GM, et al. Documentation of hyperglucagonemia throughout the day in nonobese and obese patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus. J Clin Endocrinol Metab 1987;64:106-10. 18) von Schenck H, Grubb AO. Interference of immunoglobulins in two glucagon radioimmunoassays. Clin Chem 1982;28:1103-7. 19) Service FJ. Hypoglycemia. In: DeGroot LJ, editor. Endocrinology. Philadelphia: Saunders, 1989;2:1524-40. 20) Shima K, et al. The normal range of the plasma immunoreactive glucagon level during a 75 g oral glucose tolerance test. Diabetes Res Clin Pract 1986;1:265-71. 21) Smith RJ. Biological actions and interactions of insulin and glucagon. In: DeGroot LJ, editor. Endocrinology. Philadelphia: Saunders, 1989;2:1333-45. 22) Steiner DF, Bell GI, Tager HS. Chemistry and biosynthesis of pancreatic protein hormones. In: DeGroot LJ, editor. Endocrinology. Philadelphia: Saunders, 1989;2:1263-89. 23) Tahara Y, et al. Discrepancy of fasting plasma glucagon levels measured by different glucagon antisera. Diabetes Res 1988;7:179-83. 24) Unger RH. Insulin-glucagon relationships in the defense against hypoglycemia. Diabetes. 1983;32:575-83. 25) Unger RH. Glucagon physiology and pathophysiology in the light of new advances. Diabetologia. 1985;28:574-8. 26) Unger RH, Orci L. Glucagon secretion and metabolism in man. In: DeGroot LJ, editor. Endocrinology. Philadelphia: Saunders, 1989;2:1318-32. 27) National Committee for Clinical Laboratory Standards. Procedures for the collection of diagnostic blood specimens by venipuncture; approved standard. 4th ed. NCCLS Document H3-A4, Wayne, PA: NCCLS, 1998.

Technical Assistance

In the United States, contact DPC's Technical Services department.
Tel: 800.372.1782, 310.645.8200
Fax: 310.645.9999. To place an order:
Tel: 800.372.1782. Fax: 800.234.4372.
Outside the United States, contact your National Distributor.

The Quality System of Diagnostic Products Corporation is registered to ISO 13485:2003.

Tables and Graphs

Example Run

Tube ¹	Duplicate CPM ²	Average CPM ³	Net CPM ⁴	% Bound ⁵	Approx. Glucagon pg/mL ⁶
T ⁷	22,823 22,235	22,529			
NSB ⁸	555 600	578	0		
A (MB) ⁹	9,245 9,367	9,306	8,729	100%	0
B	8,328 8,272	8,300	7,723	88%	25
C	7,399 7,308	7,354	6,776	78%	50
D	5,397 5,824	5,611	5,033	58%	100
E	3,358 3,384	3,371	2,794	32%	250
F	2,272 2,259	2,266	1,688	19%	500
Unknowns: ¹⁰					
X1	6,494 6,982	6,738	6,161	71%	65
X2	2,768 2,637	2,703	2,125	24%	357

Quality Control Parameters:¹¹

T⁷ = 22,529 cpm

%NSB⁸ = 2.6%

%MB⁹ = 39%

20% Intercept¹² = 442 pg/mL

50% Intercept = 136 pg/mL

80% Intercept = 42 pg/mL

Intraassay Precision (pg/mL)

	Mean ¹	SD ²	CV ³
1	52	3.4	6.5%
2	209	6.6	3.2%
3	343	16.6	4.8%

Interassay Precision (pg/mL)

	Mean ¹	SD ²	CV ³
1	59	7.0	11.9%
2	205	16.5	8.0%
3	351	21.1	6.0%

End-of-Run Effect

	Tubes 28 – 33	Tubes 89 – 94	Tubes 135 – 140	Tubes 181 – 186
1	51	52	49	48
2	222	195	208	197
3	330	344	331	359

Linearity (pg/mL)

	Dilution ¹	Observed ²	Expected ³	%O/E ⁴
1	4 in 4 ⁵	196	—	—
	2 in 4	97.3	98.0	99%
	1 in 4	49.7	49.0	101%
2	4 in 4	212	—	—
	2 in 4	108	106	102%
	1 in 4	51.5	53.0	97%
3	4 in 4	230	—	—
	2 in 4	123	115	107%
	1 in 4	59.8	57.5	104%
4	8 in 8	432	—	—
	4 in 8	239	216	111%
	2 in 8	105	108	97%
	1 in 8	50.1	54.0	93%

Standardization

Concentration pg/mL	DPC Glucagon Calibrators (%B/B ₀)	WHO Preparation in DPC Zero (%B/B ₀)
25	91%	95%
50	87%	86%
100	72%	74%
250	43%	43%
500	24%	25%

Specificity

Compound ¹	pg/mL Added ²	Apparent pg/mL ³	% Cross- reactivity ⁴
Glucagon (Human) M.W. 3,483			
	1,000	954	95%
	500	609	122%
	250	284	114%
Glucagon (22–29, Human) M.W. 1,039			
	1,000	52	5.2%
	500	41	8.2%
	250	24	9.6%
Glucagon (19–29, Human) M.W. 1,352			
	1,000	22.8	2.3%
	500	21.9	4.4%
	250	11.8	4.7%
Glucagon-like Peptide 1 (Preproglucagon 72–108) (GLP-1, Human) M.W. 4,170			
	1,000,000	ND	ND
Glucagon-like Peptide 1 (Preproglucagon 72–107 amide) (GLP-1, Human) M.W. 4,112			
	1,000,000	ND	ND
Glucagon-like Peptide 2 (Preproglucagon 126–159) (GLP-2, Human) M.W. 3,923			
	1,000,000	ND	ND
Gastric Inhibitory Peptide (GIP, Human) M.W. 4,984			
	20,000	ND	ND
Oxyntomodulin (Glucagon 37) M.W. 4,422			
	40,000	42	0.1%
Secretin (Human) M.W. 2,883			
	100,000	ND	ND
Vasoactive Intestinal Peptide (VIP; Human, Porcine, Rat) M.W. 3,326			
	100,000	ND	ND

ND: not detectable⁵

Method Comparison (pg/mL)

Sample ¹	DPC ²	Kit A ³
1	185	318
2	113	171
3	165	136
4	117	281
5	97	222
6	169	374
7	127	214
8	160	141
9	167	270
10	133	492
11	174	134
12	134	328
13	135	193
14	182	250
15	117	263
16	173	309
17	136	160
18	168	269
19	124	226
20	133	259

Deutsch. Example Run: ¹Röhrchen, ²Duplikat CPM, ³Mittelwert CPM, ⁴Netto CPM, ⁵Prozent Bindung, ⁶Ca. Glukagon, pg/mL, ⁷Total, ⁸%NSB, ⁹%MB, ¹⁰Unbekannt, ¹¹Qualitätskontrollparameter. **Intraassay Precision:** ¹Mittelwert, ²SD (Standardabweichung), ³CV (Variationskoeffizient). **Interassay Precision:** ¹Mittelwert, ²SD (Standardabweichung), ³CV (Variationskoeffizient). **Linearity:** ¹Verdünnung, ²Beobachtet (B), ³Erwartet (E), ⁴% B/E, ⁵4 in 4. **Specificity:** ¹Verbindung, ²zugesetzte Menge, ³Gemessene Konzentration, ⁴% Kreuzreaktivität, ⁵NN: Nicht nachweisbar. **End-of-Run Effect:** ¹Röhrchen. **Standardization:** ¹Konzentration pg/mL, ²DPC Glukagon Standards (%B/B₀), ³WHO Präparation in DPC Nullstandard (%B/B₀). **Method Comparison:** ¹Probe, ²DPC, ³Kit A.

Español. Example Run: ¹Tubo, ²Duplicado CPM, ³Media CPM, ⁴CPM Netas, ⁵Porcentaje de unión, ⁶Glucagon, aprox., pg/mL, ⁷Total, ⁸%NSB, ⁹%MB, ¹⁰Desconocidos, ¹¹Parámetros del control de calidad. **Intraassay Precision:** ¹Media, ²DS, ³CV. **Interassay Precision:** ¹Media, ²DS, ³CV. **Linearity:** ¹Dilución, ²Observado (O), ³Esperado (E), ⁴%O/E, ⁵4 en 4. **Specificity:** ¹Compuesto, ²Cantidad añadida, ³Concentración aparente, ⁴% Reacción cruzada, ⁵ND: no detectable. **End-of-Run Effect:** ¹Tubos.

Standardization: ¹Concentración en pg/ml, ²Calibradores para glucagon de DPC (%B/B₀), ³Preparación WHO en el calibrador cero de DPC (%B/B₀). **Method Comparison:** ¹Muestra, ²DPC, ³Kit A.

Français. Example Run: ¹Tube, ²CPM dupliqué, ³CPM moyen, CPM corrigé, ⁵Pourcentage lié, ⁶Glucagon approx., pg/ml, ⁷Total, ⁸%NSB, ⁹%MB, ¹⁰Inconnus, ¹¹Paramètres assurance qualité. **Intraassay Precision:** ¹Moyenne, ²SD, ³CV. **Interassay Precision:** ¹Moyenne, ²SD, ³CV. **Linearity:** ¹Dilution, ²Observé (O), ³Attendu (A), ⁴%O/A, ⁵4 dans 4. **Specificity:** ¹Composé, ²ajouté, ³Concentration apparente, ⁴Réaction croisée %, ⁵ND: non détectable. **End-of-Run Effect:** ¹Tubes. **Standardization:** ¹Concentration pg/ml, ²Calibreurs glucagon DPC (%B/B₀), ³Préparation OMS en DPC Zéro (%B/B₀). **Method Comparison:** ¹Échantillon, ²DPC, ³Coffret A.

Italiano. Example Run: ¹Provetta, ²CPM in duplicato, ³CPM Medio, ⁴CPM Netti, ⁵Percentuale di Legato, ⁶Appross. Glucagone, pg/mL, ⁷Totale, ⁸%NSB, ⁹%MB, ¹⁰Campioni non Noti, ¹¹Parametri per il Controllo di Qualità. **Intraassay Precision:** ¹Media, ²SD (Deviazione Standard), ³CV (Coefficiente di Variazione). **Interassay Precision:** ¹Media, ²SD (Deviazione Standard), ³CV (Coefficiente di Variazione). **Linearity:** ¹Diluizione, ²Osservato (O), ³Atteso (A), ⁴%O/A, ⁵4 in 4. **Specificity:** ¹Composto, ²quantità aggiunta, ³Concentrazione apparente, ⁴Percentuale di Crossreattività, ⁵ND: non determinabile. **End-of-Run Effect:** ¹Provette. **Standardization:** ¹Concentrazione pg/mL, ²DPC Calibratori Glucagone (%B/B₀), ³Preparazione WHO in DPC Zero (%B/B₀). **Method Comparison:** ¹Campione, ²DPC, ³Kit A.

Português. Exemplo de ciclo: ¹Tubo, ²Duplicado CPM, ³Média de CPM, ⁴Net CPM, ⁵Percentagem de Ligação, ⁶Aprox. Glucagon, pg/mL, ⁷Total, ⁸%NSB, ⁹%MB, ¹⁰Desconhecidos, ¹¹Parâmetros do controlo de qualidade. **Precisão do Intra-ensaio:** ¹Média, ²Desvio padrão, ³Coefficiente de variação. **Precisão Intra-ensaio:** ¹Média, ²Desvio padrão, ³Coefficiente de variação. **Linearidade:** ¹Diluição, ²Observado (O), ³Esperado (E), ⁴%O/E, ⁵4 em 4. **Especificidade:** ¹Composto, ²Quantidade adicionada, ³Concentração Aparente, ⁴Percentagem de reacção cruzada, ⁵ND: não detectável. **Efeito de Fim de ciclo:** ¹Tubos. **Padronização:** ¹Concentração pg/mL, ²Calibradores de Glucagon da DPC (%B/B₀), ³Preparação de WHO em Zero DPC (%B/B₀). **Comparação de Métodos:** ¹Amostra, ²DPC, ³Kit A.

Glukagon Doppelantikörper RIA

Anwendung: Radioimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Glukagon im EDTA Plasma. Der Assay ist ausschließlich in der *In-Vitro*-Diagnostik einzusetzen als Hilfsmittel bei der Diagnose und Behandlung von Patienten mit Erkrankungen des Kohlenhydratstoffwechsels einschließlich Diabetes Mellitus, Hypoglykämie und Hyperglykämie.

Artikelnummern: **KGND1** (100 Tests)



Die Packung mit 100 Röhrchen enthält weniger als 2 Microcurie (74 Kilobecquerel) an radioaktivem ¹²⁵I-Glukagon.

Klinische Relevanz

Glukagon ist ein einkettiges Polypeptid, mit 29 Aminosäuren, das in den Alpha-Zellen des Pankreas gebildet wird. Glukagon wirkt grundsätzlich antagonistisch gegenüber Insulin, das von den Beta-Zellen des Pankreas sezerniert wird. Wie Insulin ist Glukagon an der Regulation des Glukosespiegels beteiligt, aber während Insulin typischerweise der Hyperglykämie entgegenwirkt, ist Glukagon ein Bestandteil des Gegenregelungssystems, welches Epinephrin und mehrere andere Faktoren von untergeordneter Bedeutung benutzt, um der Hypoglykämie entgegenzuwirken.^{6,25,26} Als Reaktion auf gesteigerten Glukoseverbrauch (während körperlicher Belastung) oder Absenkung verursacht durch Insulin, hilft Glukagon die Glukosespiegel durch Stimulierung der Glukoseproduktion in der Leber wiederherzustellen.⁶

Glukagon-Bestimmungen können daher für Patienten mit Insulin-abhängigem Diabetes, welche sich einer intensiven Insulintherapie unterziehen oder für eine derartige Therapie vorgesehen sind, von Bedeutung sein. In diesem Zusammenhang, würde eine defektes Gegenregulierungssystem, welches durch den gemeinsamen Ausfall der Glukagon- und Epinephrin-Antwort auf ein Absinken

des Glukosespiegels charakterisiert ist, ein gesteigertes Risiko für schwere insulininduzierte hypoglykämische Episoden nach sich ziehen.^{1,4,5,6,24}

Glukagon ist strukturell verwandt mit anderen Neurohormonpeptiden, einschließlich Sekretin, vasointestinales Polypeptid (VIP) und Gastrin-inhibierendes Peptid (GIP).²² Das Hormon weist eine beachtliche Ähnlichkeit zwischen den einzelnen Spezies, insbesondere bei den Alt-Welt-Mammaliern auf.^{7,22} Die Aminosäure-Sequenz des Human-Glukagons ist mit dem Glukagon von Kühen, Schweinen, Kaninchen, Ratten u. Hamstern identisch; während Glukagon von Meerschweinchen an fünf Positionen Unterschiede aufweist. Truthahn- und Hühner- Glukagon unterscheidet sich von der Humanform in einer Position; Enten und Alligator Glukagon in zwei Positionen.

Glukagon stammt vom Prä-Glukagon, welches in den Alpha-Zellen des Pankreas und ebenfalls im Darm vorkommt. Dieser Precursor umfasst ein N-terminales Signalpeptid (Rest -24 bis -1) gefolgt von Glicentin (Reste 1 bis 69) und dem sogenannten grössten Pro-Glukagon-Fragment (Rest 72 bis 160). Das letztere umfasst zwei Glukagon-ähnliche Peptide, welche als GLP-1 und GLP-2 bezeichnet werden. Glicentin, welches auch als Darm-Glukagon und "glukagon-like reactivity" 1 (GLI-1) bekannt ist, umfasst "glicentin-related-pancreatic peptid" (GRPP, Glicentin-1) gefolgt von Glukagon selbst (Rest 33 bis 61) und einem Hexapeptid. Das C-terminale Fragment von Glicentin, welches Glukagon und das Hexapeptid umfasst, wurde verschiedentlich auch als Oxyntomodulin, Enteroglukagon, GLI-2 und Glukagon-37 bezeichnet.²²

Während der Darm überwiegend die intakte N-terminale Hälfte des Prä-Glukagons (d.h. Glicentin) gemeinsam mit Oxyntomodulin und den C-terminalen Fragmenten GLP-1 u. GLP-2 sezerniert, sezerniert der Pankreas überwiegend die intakte C-terminale Hälfte (d.h. das sog. größere Pro-Glukagon-Fragment) gemeinsam mit den N-terminalen Fragmenten GRPP, Glukagon und Oxyntomodulin.^{2, 22} Das Glicentin, welches manchmal als Proglukagon bezeichnet wurde, kein typisches Sekretionsprodukt

des Pankreas ist, ist es möglicherweise auch kein normales Zwischenprodukt bei der Synthese des Glukagons.² Die Tatsache, dass Glukagonspiegel bei Personen nach totaler Pankreasektomie zu normalen Werten tendieren, gibt Hinweise dafür, dass gewisse Mechanismen existieren, die die Transforamtion von intestinalen Produkten zu Glukagon bewerkstelligen.^{2,26}

Methodik

Der Doppellantikörper Glukagon RIA von DPC ist ein sequenzieller Radioimmunoassay. Nach der Vorinkubation der Patientenprobe mit dem Anti-Glukagon Antikörper, konkurriert das ¹²⁵I-markierte Glukagon mit dem Glukagon in der Patientenprobe um eine limitierte Zahl von Antikörperbindungsstellen. Nach einer definierten Inkubationszeit werden die gebundenen Komponenten von den freien durch die PEG-vermittelte Doppelantikörper Methode getrennt. Am Ende wird die Antikörper-gebundene Fraktion präzipitiert und gemessen. Die Konzentrationen in den Patientenproben werden an einer Standardkurve abgelesen.

Zu pipettierende Reagenzien: 3

Testdauer: Zwei 24 Stunden Inkubationen.

Totalaktivität zum Zeitpunkt der Markierung: ca. 25 000 cpm,

Trennung: Die gebrauchsfertige Präzipitationslösung enthält eine Kombination aus 2. Antikörper und PEG.

Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Zur *In-vitro*-Diagnostik.

Reagenzien: Die Packung mit den Reagenzien sollte bei 2–8°C in einem Kühlschrank gelagert werden, der für radioaktives Material ausgewiesen ist. Die Entsorgung muss nach den jeweils gültigen Gesetzen erfolgen.

Die Reagenzien dürfen nur bis zum Verfallsdatum verwendet werden.

Einige Komponenten des Kits können Material humanen Ursprungs und/oder in anderer Weise gefährliche Inhaltsstoffe enthalten, die es unbedingt notwendig

machen die folgenden Vorsichtsmaßnahmen einzuhalten.

Die generell geltenden Vorsichtsmaßnahmen sind einzuhalten und alle Komponenten als potenziell infektiös zu behandeln. Alle aus menschlichem Blut gewonnenen Materialien wurden auf Syphilis, Antikörper gegen HIV-1 und HIV-2, Hepatitis-B-Oberflächenantigen und Hepatitis-C-Antikörper untersucht und negativ befundet.

Bestimmten Komponenten wurde Natriumazid (<0,1 g/dl) hinzugefügt. Um die Bildung von explosiven Metallaziden in Blei- und Kupferrohren zu vermeiden, sollten die Reagenzien nur zusammen mit großen Wassermengen in die Kanalisation gespült werden.

Wasser: Destilliertes bzw. deionisiertes Wasser benutzen.

Radioaktivität: Der Umgang mit radioaktivem Material ist in Deutschland genehmigungspflichtig. Deshalb muss der DPC eine Kopie der aktuellen gültigen Umgangsgenehmigung des Kunden vorliegen, bevor radioaktive Reagenzien versendet werden dürfen. Die Strahlenschutzverordnung ist zu beachten.

Das radioaktive Material ist gemäß der jeweiligen Umgangsgenehmigung zu handhaben.

Die Strahlenexposition ist zu minimieren. Spritzer sind sofort aufzuwischen und die betroffene Oberfläche zu dekontaminieren. Aerosolbildung ist zu vermeiden. Flüssiger und fester radioaktiver Abfall sind unter Beachtung der gültigen Richtlinien zu entsorgen.

Im Lieferumfang enthalten

Glukagon Antiserum (GND1)

Lyophilisiertes Glukagon Antiserum, vom Kaninchen, mit Konservierungsmittel. Mit **10 ml** destilliertem Wasser auflösen.

Durch vorsichtiges Umdrehen durchmischen. Bei 2-8°C für 30 Tage nach dem Auflösen haltbar. Farbe: Blau.

KGND1: 1 Flasche

¹²⁵I Glukagon (GND2)

Lyophilisiertes, jodiertes synthetisches humanes Glukagon, mit Konservierungs-

mittel. Vor dem Testansatz, mit **10 ml** destilliertem Wasser auflösen. Durch vorsichtiges Umdrehen durchmischen. Bei 2–8°C für 30 Tage nach dem Auflösen haltbar.

KGND1: 1 Flasche

Glukagon 0-Standard (GND3)

Lyophilisierter 0-Standard in einer Matrix auf Proteinbasis, mit Konservierungsmittel. *Mindestens 30 Minuten vor Testbeginn*, mit **10 ml** destilliertem Wasser auflösen. Durch vorsichtiges Umdrehen durchmischen. Bei 2–8°C für 30 Tage nach dem Auflösen oder für 2 Monate (aliquotiert) bei –20°C haltbar.

KGND1: 2 Flaschen

Glukagon Standard F (GND8)

Lyophilisierter Standard mit synthetischen humanem Glukagon in einer Matrix auf Proteinbasis, mit Konservierungsmitteln. *Mindestens 30 Minuten vor Testbeginn*, mit **2,0 ml** destilliertem oder deionisiertem Wasser auflösen. Volumetrische Pipetten verwenden und durch vorsichtiges Umdrehen durchmischen. *Nach Gebrauch werfen.*

KGND1: 3 Flaschen

Der Standard F hat *chargen-spezifische* Werte von ca. 500 pg/ml; bzw. 144 pmol/L. Die exakten Konzentrationen entnehmen Sie bitte den Etiketten der Standardflaschen. Der Assay wurde an dem WHO Internationalen Standard für Glukagon, Nummer 69/194, standardisiert.

Präzipitierendes Reagenz (GNRG)

110 ml, enthält 2. Antikörper (Ziege-Anti-Kaninchen-IgG) (GARGG) u. verdünntes Polyethylenglykol (PEG) in Kochsalzlösung, mit Gentamicin als Konservierungsmittel. Das Präzipitierende Reagenz wird gebrauchsfertig in flüssiger Form geliefert. Der Aluminiumverschluss sollte entfernt werden und die Flasche anschließend gekühlt gelagert werden: Bei 2–8°C bis 30 Tage nach dem Öffnen haltbar. Falls nach der Lagerung im Kühlschrank feine Präzipitate auftreten, sollte das Reagenz gründlich, ohne Schaumbildung, geschüttelt werden. Farbe: rot.

KGND1: 1 Flasche

Glukagon Kontrollen (GNCO1, GNCO2)

2 Flaschen, Glukagon Kontrolle 1 und 2, mit synthetischem humanem Glukagon in einer Proteinmatrix, mit Konservierungsmittel. Die Kontrollen werden lyophilisiert geliefert. *Mindestens 30 Minuten vor Testbeginn*, jede Flasche mit **1,0 ml** destilliertem Wasser auflösen. Eine volumetrische Pipette verwenden und durch vorsichtiges Umdrehen durchmischen. Nach dem Gebrauch werfen. Die exakten Glukagonwerte entnehmen Sie bitte dem Kontrolldatenblatt.

KGND1: 3 Sets.

Erforderliche Laborgeräte und Hilfsmittel

Gamma Counter

Zentrifuge – gekühlt für 1500xg

Wirbelmischer

Reagenzienvorbereitung

Destilliertes oder deionisiertes Wasser

Pipetten: für 5,0 ml und 10 ml

Volumetrische Pipetten: 1,0 ml

Radioimmunoassay

Unbeschichtete 12x75 mm *Glas* Röhrchen – erhältlich bei DPC. Diese sollten aus qualitativ hochwertigem Boratsilikat-Glas gefertigt sein. Aufgrund der Tendenz von Glukagon an Plastikoberflächen zu binden, sollten Glasröhrchen (anstatt Plastik) verwendet werden.

Mikropipetten – 50 µl, 100 µl, 200 µl, 500 µl und 1,0 ml. Für die Zugabe von 100 µl wird ein Dispenser empfohlen. Für die Zugabe von 1,0 ml der Präzipitationslösung wird ein Spritzen-Dispenser mit einer Genauigkeit von ± 0,05 ml empfohlen.

Parafilm

Dekantierständer – erhältlich bei DPC.

Logit-Log-Papier – erhältlich bei DPC (Artikelnummer: ZP797)

Probengewinnung

Es ist keine besondere Vorbereitung der Patienten nötig. Blutentnahme durch Venenpunktion²⁷ in *gekühlte* EDTA-Röhrchen, Zeitpunkt der Blutentnahme notieren. Während der Probennahme und Probenvorbereitung sollten die Röhrchen

ständig in einem Eisbad bei 2–8°C eingetaucht werden

Sofort nach der Entnahme 5 000 Kallikrein inaktivierende Einheiten (KIU) pro 10 ml Blut, in Form von Trasylol (500 µl) oder Aprotinin (1 mg) zugeben. Gründlich mischen und bis zur Trennung gekühlt halten.

Trennung des Plasma von den Blutzellen erfolgt durch Zentrifugation in eine gekühlten Zentrifuge. Das Plasma mit einer Pasteurpipette abnehmen und in ein Glasröhrchen überführen und sofort einfrieren. Bei Bedarf portionieren.

Lipämische Proben können den Assay beeinflussen. Der Einsatz einer Ultrazentrifuge wird zur Klärung lipämischer Proben empfohlen.

Bei hämolysierten Proben besteht die Möglichkeit einer unsachgemäßen Handhabung vor Eintreffen im Labor, daher sind die Ergebnisse mit Vorsicht zu interpretieren.

Blutentnahmeröhrchen von verschiedenen Herstellern können differierende Werte verursachen. Dies hängt von den verwendeten Materialien und Additiven (Gel oder physische Trennbarrieren, Gerinnungsaktivatoren und /oder Antikoagulantien) ab. Double Antibody Glukagon sind nicht mit allen möglichen Röhrchenvariationen ausgetestet worden.

Erforderliche Menge: 200 µl EDTA Plasma pro Röhrchen.

Lagerung: *Vorsicht:* Keine Plastikröhrchen oder Pipetten während der Probengewinnung verwenden. Die Proben während der gesamten Zeit gekühlt und geschützt von direkten Licht aufbewahren. Auftauen und wieder einfrieren, oder längeres Lagern bei Raumtemperatur (15–28°C), können zu signifikant niedrigeren Glukagon- Werten führen.

Testansatz und Durchführung

Alle Testkomponenten, mit Ausnahme des Präzipitierenden Reagenz, vor Testbeginn auf Raumtemperatur (15–28°C) bringen.

Beachten: Aufgrund der Tendenz von Glukagon an Plastikoberflächen zu binden, sollten Glasröhrchen (anstatt Plastik) verwendet werden. Die Verwendung von Plastikröhrchen kann

zum Verlust des gesamten, nachweisbaren Glukagons führen.

- 1 Vor dem Testansatz, den 500 pg/ml Glukagon Standard F mit dem Glukagon Nullstandard verdünnen (siehe Tabelle). Hierzu Glasröhrchen oder Glasfläschchen, verwenden. Jede Verdünnung gründlich durchmischen. Die Standards nach dem Gebrauch verwerfen.

Zugabe		zu...		ergibt Standard		
µL	Stand.	µL	Stand.	pg/ml	pmol/L	
50	Stand. F	950	0	B	25	7
100	Stand. F	900	0	C	50	14
200	Stand. F	800	0	D	100	29
500	Stand. F	500	0	E	250	72

- 2 Jeweils zwei Röhrchen mit T (Totalaktivität), **NSB** (Unspezifische Bindung), A (Maximale Bindung, B0) und B bis F beschriften. Jeweils 2 Röhrchen für Plasmaproben und Kontrollen beschriften.

Standard	Ca. pg/ml	Ca. pmol/L
A (MB)	0	0
B	25	7
C	50	14
D	100	29
E	250	72
F	500	144

Hinweis: Die Werte der Standards sind *chargenspezifisch*. Die exakten Konzentrationen entnehmen Sie bitte den Etiketten der Standardflaschen.

- 3 Jeweils **200 µl** des 0-Standards A in die **NSB** und A Röhrchen, und jeweils **200 µl** der restlichen Standards in die entsprechend beschrifteten Röhrchen pipettieren. Jeweils **200 µl** von jeder Patientenprobe und Kontrolle in die vorbereiteten Röhrchen pipettieren.

Es ist gute Laborpraxis Pipetten mit Einmalspitzen zu verwenden und die Spitze von Probe zu Probe zu wechseln um Verschleppung zu vermeiden.

Proben, in denen Konzentrationen oberhalb des höchsten Standards (Standard F, 500 pg/ml) erwartet

werden, sind mit 0-Standard vor dem Einsatz in den Test zu verdünnen.

- 4 **100 µl** Glukagon Antiserum (BLAU) in alle Röhrchen, außer **NSB** und T Röhrchen, hinzufügen. Mischen.

Für diesen Schritt und für die Zugabe des Tracers in Schritt 6 wird die Verwendung eines Dispensers empfohlen.

- 5 Röhrchen abdecken und für **24 Stunden bei 2–8°C** inkubieren.

Der komplette Ständer sollte mit Parafilm abgedeckt oder in einen verschließbaren Plastikbeutel gestellt werden, um Verdunstung zu vermeiden.

- 6 **100 µl** ¹²⁵I Glukagon (KLAR) in alle Röhrchen pipettieren. Mischen

Die T Röhrchen zum Messen bei Schritt 11 auf die Seite stellen. Sie bedürfen keiner weiteren Behandlung.

- 7 Die Röhrchen abdecken und für **24 Stunden bei 2–8°C** inkubieren.

Der komplette Ständer sollte mit Parafilm abgedeckt oder in einen verschließbaren Plastikbeutel gestellt werden, um Verdunstung zu vermeiden.

- 8 **1,0 ml kaltes** präzipitierendes Reagenz (ROT) in alle Röhrchen hinzufügen. Mischen.

Für die Zugabe von 1,0 ml wird die Verwendung eines Dispensers empfohlen.

- 9 Für **15 Minuten** bei 1500xg zentrifugieren.

- 10 Mit Hilfe eines Dekantierständers alle Röhrchen (außer die T-Röhrchen) dekantieren oder absaugen, das Präzipitat zur Messung zurückhalten.

Röhrchen für 10 Minuten umgedreht auf Fließpapier stehen lassen. Anschließend werden die Röhrchen vorsichtig ausgeklopft und abgestreift, um alle restlichen Tröpfchen zu entfernen.

- 11 Alle Röhrchen **1 Minute** messen.

Berechnung der Ergebnisse

Um die Konzentrationen aus der Logit-Log Darstellung der Standardkurve abzulesen werden zunächst der Mittelwert der zwei

Röhrchen bereinigt um den Mittelwert der **NSB** Counts pro Minute (cpm) berechnet:

Netto Counts = (Mittelwert CPM) minus (Mittelwert **NSB** CPM)

Anschließend wird die Bindung jedes Röhrchenpaars als Prozent der Maximalbindung (MB, B0) bestimmt. Hierzu werden die mittleren CPM des A-Standards korrigiert um die mittlere **NSB** als 100% gesetzt:

Prozentbindung = (Netto Counts / Netto **MB** Counts) × 100

(Die Berechnung kann durch Weglassen der Korrektur um die **NSB** vereinfacht werden. Für Proben innerhalb des Standardbereichs werden nahezu identische Konzentrationen berechnet, wenn B/B0 direkt aus den CPM ermittelt wird.)

Die so ermittelten B/B0 aller Standards außer des 0-Standards werden auf der y-Achse auf Logit-Log Papier gegen die Konzentration auf der x-Achse (logarithmisch) aufgetragen. Die Punkte werden mit bestmöglicher Annäherung durch eine gerade Linie verbunden. Die Ergebnisse der unbekannten Proben können dann durch Interpolation an der Kurve abgelesen werden.

Es ist gute Laborpraxis die Ergebnisse der Doppelbestimmung auf Übereinstimmung zu prüfen und eine Grafik der Standardkurve darzustellen (auch wenn die eigentliche Berechnung durch ein Computerprogramm erfolgt) um visuell zu überprüfen, ob für die Standardkurve die geeignete Transformation verwendet wurde und um eventuell abweichende Standardkurvenpunkte zu entdecken. Es wird weiterhin empfohlen, folgende Parameter der Berechnung zu protokollieren:

T = Totalaktivität (als Counts pro Minute)

%NSB = 100 × (Mittelwert NSB Counts / Total Counts)

%MB = 100 × (Netto Counts / Total Counts)

und die 20, 50 und 80 Prozent "intercepts," wobei

20% = Konzentration bei 20 Prozent Bindung, etc.

Bitte beachten Sie, dass auch andere Auswertungen z. B. nach der 4-Para-

meter-Logistik akzeptabel sind. Siehe: Dudley RA, et al. Guidelines for immunoassay data reduction. Clin Chem 1985;31:1264-71.

Auswertebeispiel: Dieses Beispiel dient nur zur Veranschaulichung und ist nicht dazu geeignet Werte aus einem anderen Testansatz damit zu ermitteln. Aufgrund der *Chargenabhängigkeit* der Standardkonzentrationen müssen die in der rechten Spalte der Tabelle gelisteten Konzentrationen nicht mit den Konzentrationen des ausgelieferten Testkits übereinstimmen. (siehe Tabelle "Example Run").

Qualitätskontrolle

Die im Kit mitgelieferten Glukagon Kontrollen sollten zur Überwachung der Testdurchführung im Rahmen der internen Qualitätskontrolle eingesetzt werden.

Patientenergebnisse dürfen nur dann freigegeben werden, wenn die laborspezifischen Akzeptanzkriterien erfüllt sind. Hierzu sind die jeweils gültigen Richtlinien zu berücksichtigen.

Es ist gute Laborpraxis die Chargennummern, sowie das Datum der ersten Öffnung bzw. Rekonstitution der verwendeten Komponenten zu protokollieren. Die wiederholte Messung von Proben kann bei der Beurteilung der Interassay Präzision hilfreich sein. Der Einsatz von Kontrollprobenpaaren an unterschiedlichen Positionen des Testansatzes ist hilfreich, um einen eventuellen Drift zu erkennen.

Zentrifugation: Die Testdurchführung erfordert das Zentrifugieren bei 1500xg für 15 Minuten. Eine Hochgeschwindigkeits-Kühlzentrifuge ist wünschenswert aber nicht grundsätzlich erforderlich. Benutzen Sie die nachfolgend aufgeführten Formeln, um die Beschleunigung bei Ihrer Zentrifuge bei einer vorgegebenen Geschwindigkeit oder der erforderlichen Geschwindigkeit (in Umdrehungen pro Minute) den gewünschten g-Wert zu berechnen.

$$g = 28,38 \times (U/\text{min} / 1\,000)^2 \times \text{Radius [Zoll]}$$

$$U/\text{min} = 187,7 \times \sqrt{(g / \text{Radius [Zoll]})}$$

oder

$$g = 11,18 \times (U/\text{min} / 1\,000)^2 \times \text{Radius [cm]}$$

$$U/\text{min} = 299,1 \times \sqrt{(g / \text{Radius [cm]})}$$

Referenzwerte

In einer Referenzwertstudie wurden Plasmaproben von 51 Freiwilligen im Glukagon Doppelantikörper RIA gemessen. In dieser Studie wurde ein Median von 112 pg/ml (32 pmol/l) und ein 95%-Bereich von

59 – 177 pg/ml (17 – 51 pmol/L)

ermittelt.

Im Labor sollten diese Ergebnisse *lediglich als Richtwerte betrachtet werden*. Jedes Labor sollte seine eigenen Referenzbereiche etablieren.

Grenzen der Methode

Bei der Überwachung von Patienten-Glukagonwerten ist es erforderlich, einen Basalwert für den Patienten mit dem gleichen Testsystem zu ermitteln, da es bei Verwendung von verschiedenen Testsystemen zu unterschiedlichen Werten kommen kann.

Leistungsdaten

Im folgenden Abschnitt sind Daten gezeigt, die für die Leistung des Glukagon Doppelantikörper RIA repräsentativ sind. Die Ergebnisse sind in pg/ml angegeben.

Umrechnungsfaktor:

$$\text{pg/ml} \times 0,2872 \rightarrow \text{pmol/L}$$

Messbereich: 25 – 500 pg/ml

(WHO IS 69/194) Die Standardwerte sind *chargen-spezifisch*.

Analytische Sensitivität: 13 pg/ml (3,7 pmol/L),

Intraassay-Präzision: Statistische Berechnung der Ergebnisse von 3 Proben, die in 20 Röhrchenpaaren in einem Ansatz gemessen wurden. (Siehe Tabelle „Intraassay-Precision“.)

Interassay-Präzision: Statistische Berechnung der Ergebnisse von 3 Proben, die in Röhrchenpaaren in 20 verschiedenen Ansätzen gemessen wurden. (Siehe Tabelle „Intraassay-Precision“.)

"End of Run" Effekt: Tritt bis ca. 180 Röhrchen nicht auf. (Siehe Tabelle "End-of-Run Effect".)

Spezifität: Die prozentuale Kreuzreaktivität wurde für intaktes Glukagon, Glukagonfragmente und

verwandte Komponenten ermittelt. Die Tabelle zeigt, der Doppelantikörper Glukagon-RIA ist hochspezifisch für Gklukagon. (siehe Tabelle „Specificity“.)

Bilirubin: Bilirubin hat in Konzentrationen bis zu 200 mg/l keinen Einfluss auf die Ergebnisse, der größer als die Impräzision des Assays selbst ist.

Hämolyse: Erythrozytenkonzentrate haben in Konzentrationen bis zu 30 µl/ml keinen Einfluss auf die Messung, der größer als die Impräzision des Assays selbst ist.

Linearität: Proben wurden in verschiedenen Verdünnungen getestet. (Siehe Tabelle "Linearity".)

Einfluss von Lagerung in Plastik und Glasröhrchen: Um den Einfluss der Lagerung von Patientenproben in Plastik- und Glasröhrchen zu ermitteln, wurde Blut von 10 Freiwilligen in EDTA-Röhrchen abgenommen und mit Aprotinin in einer Konzentration von 1,0 g/l versetzt. Das Plasma wurde in Glas- und in Plastikröhrchen portioniert und für 5 Tage gefroren gelagert. Alle Proben wurden dann im Glukagon-Doppelantikörper-RIA getestet, was zu folgenden Ergebnissen führte:

(Plastik) = 0,87 (Glas) – 6,0 pg/ml
 $r = 0,98$

Mittelwerte:
57 pg/ml (Plastik)
72 pg/ml (Glas)

Die Werte für die in Plastikröhrchen gelagerten Proben lagen durchwegs niedriger als die Werte für die in Glasröhrchen gelagerten Proben. Aufgrund dieser Ergebnisse wird empfohlen, Patientenproben in Glasröhrchen zu lagern.

Einfluss von Aprotinin: Um den Effekt von Aprotinin auf die Probenstabilität zu ermitteln, wurden 2 Sätze von EDTA Plasmaproben von 12 Freiwilligen abgenommen. Ein Satz wurde mit Aprotinin (1,0 g/l) versetzt. Alle Proben wurden dann im Glukagon-Doppelantikörper-Ria getestet. Durch lineare Regression:

(Ohne Aprotinin) =
1,07 (Mit Aprotinin) + 52 pg/ml
 $r = 0,77$

Mittelwerte:
111 pg/ml (Ohne Aprotinin)
55 pg/ml (Mit Aprotinin)

Die Analyse zeigt, dass die Werte in Abwesenheit von Aprotinin höher sind. Es wird angenommen, dass dies auf die Kreuzreaktivität mit Fragmenten die durch proteolytischen Abbau entstanden sind, zurückzuführen ist. Dies bestätigt die Notwendigkeit, Proben durch Zugabe von Aprotinin zu stabilisieren (siehe Kapitel „Probenvorbereitung“).

Methodenvergleich: Der DPC Doppelantikörper Glukagon-RIA wurde mit einem anderen, kommerziell erhältlichen, Glukagon Assay (Kit A) anhand von 20 Proben verglichen. Die DPC Ergebnisse waren generell niedriger als die Ergebnisse für Kit A. Durch lineare Regression:

(DPC) = 0,015 (Kit A) + 142 pg/ml
 $r = 0,051$

Mittelwerte:
145 pg/ml (DPC)
251 pg/ml (Kit A)

Die beiden Methoden unterscheiden sich in ihren Referenzwerten. Die obere Grenze des Referenzbereichs für den DPC Kit beträgt 130 pg/ml, aber 250 pg/ml für Kit A.

Unterschiede in den Referenzbereichen ist ein häufig auftretendes Phänomen von Immunoassays mit verschiedenen Antikörpern bei heterogenen Analyten. Dies ist eine mögliche Erklärung für die niedrigeren Werte mit dem DPC-Kit; möglicherweise erkennt Kit A Glukagon-Vorstufen und/oder Fragmente in einem höheren Ausmaß. Diese Hypothese wird durch die nicht vorhandene Kreuzreaktivität des DPC-Assays zu Präproglukagon 72–108, Präproglukagon 72–107, Präproglukagon 126–159, Gastrin inhibierendes Peptid, Oxyntomodulin, Sekretin und Vasoaktives Intestinales Peptid (VIP) untermauert. (Siehe Tabelle „Method Comparison“)

Standardisierung: Um die Standardisierung des Doppelantikörper Glukagon-RIAs zu verifizieren, wurde der WHO Internationale Standard für Glukagon Nummer 69/194 mit Hilfe des Nullstandard in korrespondierenden Konzentrationen zu den Kitkalibratoren entsprechend verdünnt. Diese Verdünnungen der WHO Präparation

wurde zusammen mit einem Satz DPC Kalibratoren im DPC Glukagon Doppelantikörper Assay gemessen.

Die Werte der prozentualen Bindung in der Tabelle bestätigen das parallele Verhalten gegenüber der WHO Präparation. Die DPC Kalibratoren verhalten sich wie Verdünnungen des Referenzmaterials. (Siehe Tabelle "Standardization").

Anwendungsberatung

Bei Rückfragen wenden Sie sich bitte an Ihre DPC Niederlassung.

Das Qualitätssystem der Diagnostic Products Corporation ist nach ISO 13485:2003 registriert.

Español

Double Antibody Glucagon

Utilidad del análisis: El análisis Double Antibody Glucagon es un radioinmunoensayo (¹²⁵I) diseñado para la determinación cuantitativa de glucagon en plasma con EDTA. Su uso es para diagnóstico *in vitro*, como una ayuda en el diagnóstico y tratamiento de los pacientes que tienen trastornos del metabolismo de hidratos de carbono, incluyendo diabetes mellitus, hipoglucemia e hiperglucemia.

Referencia: **KGND1** (100 tubos)



El kit de 100 tubos contiene menos de 2 microcurios (74 kilobecquerels) de glucagon marcado con ¹²⁵I radioactivo.

Resumen y Explicación del Test

El glucagon es un polipéptido de una cadena de 29 aminoácidos de largo, el cual se produce en las células pancreáticas alfa. Generalmente, es un antagonista de la insulina, la cual es secretada por las células pancreáticas beta. Al igual que la insulina, el glucagon está implicado en la regulación de los niveles de la glucosa circulante, pero a diferencia de la insulina, la cual típicamente actúa para oponerse a la hiperglucemia, el glucagon es parte de un sistema contra-regulador que incluye epinefrina y varios otros factores

generalmente de menor importancia, diseñado para defender al organismo contra la hipoglucemia.^{6,25,26} En respuesta a un incremento en la utilización de glucosa (como ocurre durante los periodos de ejercicio), o a un agotamiento inducido por la insulina, el glucagon ayuda a restaurar los niveles circulantes estimulando la producción de glucosa en el hígado.⁶

Por esto, las determinaciones de glucagon pueden ser relevantes para los pacientes diabéticos insulina-dependientes, quienes están siendo tratados con una terapia intensiva con insulina o considerados para la misma. En tal contexto, la contra-regulación defectuosa, caracterizada por una deficiencia *combinada* en las respuestas del glucagon y la epinefrina a la disminución de la glucosa circulante, ocasionaría un mayor riesgo de episodios hipoglucémicos graves inducidos por la insulina.^{1,4,5,6,24}

El glucagon está estructuralmente relacionado con otros péptidos neurohormonales, incluyendo la secretina, el péptido intestinal vasoactivo (VIP) y el péptido inhibidor gástrico.²² La hormona muestra una similitud considerable entre especies, especialmente entre los mamíferos del Viejo Mundo.^{7,22} La secuencia de aminoácidos del glucagon humano es idéntica a la del glucagon de vacas, cerdos, conejos, ratas y hámsteres; por otra parte, el glucagon de cobayo difiere en cinco posiciones. El glucagon de pavo y pollo difiere del glucagon humano en sólo una posición y el glucagon de pato y caimán difiere en dos.

El glucagon deriva del proglucagon, el cual está presente en las células alfa del páncreas y también en los intestinos. Este precursor incluye un péptido señal en la región amino terminal (residuos -24 a -1), seguido por una glicentina (residuos 1 a 69) y lo que se ha denominado el fragmento proglucagon (residuos 72 a 160). Este último incluye dos péptidos tipo glucagon designados GLP-1 y GLP-2. La glicentina, también conocida como glucagon de intestino e inmunoreactividad 1 tipo glucagon (GLI-1), incluye un péptido pancreático relacionado con la glicentina (GRPP, glicentina-1) seguido por el glucagon en sí mismo (residuos 33 a 61) y

un hexapéptido. El fragmento carboxílico terminal de la glicentina, el cual contiene el glucagon y el hexapéptido, ha sido llamado oxintomodulina, enteroglucagon, GLI-1 y glucagon-37.²²

Mientras que los intestinos secretan la mitad intacta amino terminal del proglucagon (es decir, la glicentina), la oxintomodulina y los fragmentos carboxilo terminal GLP-1 y GLP-2, el páncreas secreta principalmente la mitad intacta carboxilo terminal (es decir, el tan mentado fragmento proglucagon mayor) y los fragmentos amino terminal GRPP, glucagon y oxintomodulina.^{2,22} Debido a que la glicentina, llamada a veces proglucagon, no es un producto típico de la secreción del páncreas, puede no ser un intermedio normal en la biosíntesis del glucagon.² No obstante, el hecho de que los niveles circulantes de glucagon tienden a permanecer normales en los seres humanos después de una pancreatotomía total, da una pauta de que existe un mecanismo para transformar los productos intestinales en glucagon.^{2,26}

Principio del análisis

El procedimiento Double Antibody Glucagon de DPC es un radioinmunoensayo secuencial. Después de preincubar la muestra del paciente con un anticuerpo anti-glucagon, el glucagon marcado con ¹²⁵I compete con el glucagon de la muestra por los sitios de unión de los anticuerpos. Después de incubar por un tiempo determinado, la separación del glucagon unido del glucagon libre se logra mediante un método de doble anticuerpo acelerado por PEG, seguido de una centrifugación. Luego el precipitado que contiene la fracción unida al anticuerpo se lee en un contador gama y las concentraciones del paciente se leen de una curva de calibración.

Reactivos a pipetear: 3

Tiempo total de incubación: Dos incubaciones de 24 horas.

Cuentas totales en la iodización: aproximadamente 25 000 cpm,

Separación: La Solución Precipitante lista para usar contiene el segundo anticuerpo y PEG diluido.

Advertencias y precauciones

Para uso diagnóstico *in vitro*.

Reactivos: Almacenar de 2–8°C en una cámara preparada para almacenar material radioactivo. Desechar de acuerdo a la legislación en vigor.

No usar los reactivos después de su fecha de caducidad.

Algunos componentes suministrados en el kit pueden contener material de origen humano y/o otros componentes potencialmente peligrosos que necesiten ciertas precauciones.

Siga las precauciones universales y manipule todos los componentes como si fueran capaces de transmitir agentes infecciosos. Los materiales derivados de sangre humana han sido analizados y son negativos para sífilis; para anticuerpos frente al HIV 1 y 2; para el antígeno de superficie de hepatitis B y para los anticuerpos de hepatitis C.

Se ha usado Azida sódica, en concentraciones menores de 0,1 g/dl, como conservante. Para su eliminación, lavar con grandes cantidades de agua para evitar la constitución de residuos de azidas metálicas, potencialmente explosivas, en las cañerías de cobre y plomo.

Agua: Usar agua destilada o desionizada.

Radioactividad

Una copia de cualquier certificado de licencia de radioisótopos (específico o general) emitido a la aduana de los EE.UU. se registrará en los ficheros de Diagnostic Products Corporation antes de que se puedan enviar kits o componentes conteniendo material radioactivo. Estos materiales radioactivos pueden adquirirse por cualquier cliente con la licencia específica apropiada. Con una licencia general, estos materiales radioactivos pueden adquirirse solo por médicos, veterinarios en la práctica de la medicina veterinaria, laboratorios clínicos y hospitales — y estrictamente para la clínica *in vitro* o tests de laboratorio que no conlleven la administración interna o externa de material radioactivo o su radiación a humanos u otros animales. Su adquisición, recepción, almacenaje, uso, transferencia y desecho están regulados y se expenderá una licencia (general o

específica) de la Comisión Nuclear de EE.UU. o de un Estado con el NRC para su consiguiente control.

Manejar los materiales radioactivos de acuerdo a los requerimientos de su licencia general o específica. Para minimizar la exposición a la radiación, el usuario debe adherirse al cuarto conjunto de guías publicadas por el National Bureau of Standards con el nombre *Safe Handling of Radioactive Materials* (Handbook No. 92, issued March 9, 1964) y en las consiguientes publicaciones de las autoridades Federales o Estatales.

Limpiar y descontaminar rápidamente las superficies afectadas. Evitar la generación de aerosoles. Eliminar los residuos sólidos radioactivos de acuerdo con los requerimientos de su licencia. Licencias generales (NRC Form 483) pueden eliminar sus residuos sólidos radioactivos como residuos no radioactivos, después de retirar las etiquetas. Licencias específicas (NRC Form 313) se deben referir al Título 10, Código de Regulaciones Federales, Parte 20. Las licencias en Estados Asociados deben referirse a las normativas de su correspondiente Estado. Licencias generales pueden eliminar sus residuos líquidos radioactivos contenidos en este tipo de productos como cualquier otro material líquido, quitando las etiquetas de los contenedores y procesándolos como residuos sólidos. Licencias específicas pueden eliminar pequeñas cantidades de residuos líquidos radioactivos contenidos en este tipo de productos como cualquier otro material líquido. Refiérase a la normativa aplicable a su laboratorio.

Materiales suministrados

Antisuero para glucagon (GND1)

Antisuero liofilizado para glucagon producido en conejos, con conservante. Reconstituir añadiendo **10 ml** de agua destilada. Mezclar por inversión *suave*. Estable a 2–8°C durante 30 días después de su reconstitución. Color: azul.

KGND1: 1 vial

¹²⁵I Glucagon (GND2)

Glucagon humano sintético iodizado y liofilizado, con conservante. Justo antes del ensayo, reconstituir añadiendo **10 ml** de agua destilada. Mezclar por inversión

suave. Estable a 2–8°C durante 30 días después de su reconstitución.

KGND1: 1 vial

Calibrador cero para glucagon (GND3)

Calibrador cero liofilizado en una matriz de base proteica, con conservante. *Por lo menos 30 minutos antes de usar*, reconstituir cada vial con **10 ml** de agua destilada. Mezclar por inversión *suave*. Estable a 2–8°C durante 30 días después de su reconstitución, o 2 meses (alicuotado) a –20°C.

KGND1: 2 viales

Calibrador F para glucagon (GND8)

Calibrador liofilizado que contiene glucagon humano sintético en una matriz de base proteica, con conservante. *Por lo menos 30 minutos antes de usar*, reconstituir cada vial con **2,0 ml** de agua destilada o desionizada. Usar una pipeta volumétrica y mezclar por inversión *suave*. *Desechar después de usar*.

KGND1: 3 viales

El calibrador F tiene un valor *lote-específico* de aproximadamente 500 picogramos de glucagon humano sintético por mililitro (pg/ml); equivalentemente 144 picomoles por litro (pmol/l). Ver las etiquetas de los viales para conocer los valores exactos en pg/ml. El ensayo está normalizado en términos del Estándar Internacional para Glucagon de la World Health Organization, número 69/194.

Solución de Precipitación (GNRG)

110 ml de una Solución de Precipitación que consiste de gama globulina de cabra anti-conejo (GARGG) y polietilén glicol diluido (PEG) en solución salina, con gentamicina como conservante. La Solución de Precipitación se suministra en forma líquida, lista para usar. Quitar completamente el sello de papel aluminio y guardar refrigerada. Estable a 2–8°C durante 30 días después de su apertura. Debido a que después de refrigerar se puede formar un precipitado fino (pero visible), la Solución de Precipitación deberá mezclarse bien antes de usar, sin crear espuma. Color: Rojo.

KGND1: 1 vial

Controles de glucagon (GNCO1, GNCO2)

Dos viales marcados como Control 1 y 2 de Glucagon, conteniendo glucagon humano sintético en una matriz de base proteica, con conservante. Los controles se suministran liofilizados. *Por lo menos 30 minutos antes de usar*, reconstituir cada vial con **1,0 ml** de agua destilada. Usar una pipeta volumétrica y mezclar por inversión *suave*. *Desechar después de usar*. Ver los valores de glucagon en pg/ml en el prospecto de los controles. **KGND1**: 3 juegos.

Materiales requeridos pero no suministrados

Contador gama

Centrífuga – refrigerada y capaz de producir por lo menos 1500 xg.

Vortex

Preparación de los reactivos

Agua destilada o desionizada

Pipetas para medir 5,0 ml y 10 ml

Pipeta volumétrica: 1,0 ml

Radioinmunoanálisis

Tubos de *vidrio* no tratados de 12 x 75 mm – disponibles en DPC. Los tubos deberán ser de vidrio de borosilicato de alta calidad. Debido a que el glucagon tiende a adsorberse a las superficies de plástico, se deberá emplear tubos de vidrio (en lugar de tubos de plástico) para el ensayo.

Micropipetas – 50 µl, 100 µl, 200 µl, 500 µl y 1,0 ml. Para las adiciones de 100 µl, se recomienda usar un dispensador de repetición confiable. Para añadir 1,0 ml de la Solución de Precipitación se recomienda usar un dispensador estilo jeringa con una precisión de $\pm 0,05$ ml.

Parafilm

Rack de decantación – disponible en DPC

Papel gráfico Logit-log – disponible en DPC (Referencia: ZP797)

Recogida de la muestra

El paciente no necesita estar en ayunas así como tampoco cualquier otro tipo de preparación. Recoger la sangre por venipunción²⁷ en tubos con EDTA

colocados en *hielo*, y anotar la hora. Los tubos deberán estar inmersos en un baño de hielo a 2–8°C durante toda la recolección y la manipulación.

Inmediatamente después de recoger la sangre, añadir 5 000 unidades inactivadoras de calicreína (KIU) por 10 ml de sangre entera, en la forma de Trasylol (500 µl) o Aprotinina (1 mg). Mezclar bien y guardar frío hasta la separación.

Separar el plasma de las células por centrifugación en una centrífuga *refrigerada*. Aspirar el plasma con una pipeta Pasteur de vidrio, luego transferirlo a un tubo de *vidrio* y congelar inmediatamente. Alicuotar si es necesario.

La lipemia puede interferir con el ensayo. Se recomienda el uso de una ultracentrífuga para aclarar las muestras lipémicas.

Las muestras hemolizadas podrían indicar una mala manipulación de la muestra antes de ser recibida por el laboratorio; en este caso, los resultados deben interpretarse con precaución.

Los tubos para recoger sangre de distintos fabricantes pueden producir valores diferentes, dependiendo del material del tubo y de los aditivos, incluyendo barreras de gel o barreras físicas, activadores de la coagulación y/o anticoagulantes. El glucagon Double Antibody no ha sido analizado con todos los distintos tipos de tubos.

Volumen requerido: 200 µl de plasma EDTA por tubo.

Almacenamiento: *Cuidado:* No usar tubos o pipetas de plástico en ninguna parte de la preparación. Mantener las muestras frías en todo momento y fuera de la luz directa. La descongelación o recongelación de las muestras o la exposición prolongada a temperatura ambiente (15–28°C) puede resultar en valores de glucagon significativamente más bajos.

Procedimiento del Radioinmunoanálisis

Todos los componentes, excepto la Solución de Precipitación, deben llevarse a temperatura ambiente (15–28°C) antes de su uso.

Cuidado: Debido a que el glucagon tiende a adsorberse a las superficies de plástico, se deberá emplear tubos de *vidrio* para el ensayo, en lugar de tubos de plástico. (El uso de tubos de plástico podría resultar en la pérdida de todo el glucagon detectable).

- 1 Justo antes del ensayo, diluir los 500 pg/ml del calibrador F para glucagon con el calibrador cero para glucagon, usando tubos o viales de *vidrio*, como se describe en la tabla a continuación. Mezclar bien cada dilución en el Vortex. Desechar los calibradores después de usar.

Añadir esto...		A esto...		Da este calibrador		
µl	Calib.	µl	Calib.	pg/ml	pmol/l	
50	Calib. F	950	Cero	B	25	7
100	Calib. F	900	Cero	C	50	14
200	Calib. F	800	Cero	D	100	29
500	Calib. F	500	Cero	E	250	72

- 2 Marcar dieciséis tubos de vidrio por duplicado: T (cuentas totales), **NSB** (unión no específica), A (unión máxima) y B – F. Marcar tubos adicionales, también por duplicado, para las muestras de plasma y los controles.

Calibrador	Aproximar pg/ml	Aproximar pmol/l
A (MB)	0	0
B	25	7
C	50	14
D	100	29
E	250	72
F	500	144

Nota: El valor de los calibradores es *lote-específico*. Ver las etiquetas de los viales para conocer los valores exactos en pg/ml.

- 3 Pipetear **200 μ l** del calibrador cero A en los tubos **NSB** y A, y **200 μ l** de cada uno de los calibradores restantes B – F en tubos correspondientemente marcados. Pipetear **200 μ l** de cada muestra de plasma del paciente y de cada control en los tubos preparados.

Es una buena práctica el uso de micropipetas con punta desechables, cambiando las puntas entre las

muestras, para evitar la contaminación por arrastre.

Las muestras que se espera que contenga concentraciones de glucagon mayores que la del calibrador más alto (500 pg/ml) deberán diluirse con el calibrador cero antes del análisis.

- 4 Añadir **100 μ l** de Antisuero para Glucagon (AZUL) a todos los tubos, excepto a los tubos **NSB** y T. Mezclar en el Vortex.

Para este paso y para añadir el trazador en el paso 6 se recomienda usar un dispensador de repetición.

- 5 Cubrir el rack e incubar durante **24 horas a 2–8°C**.

Cubrir todo el rack con Parafilm o colocar los racks en bolsas de plástico para evitar la evaporación.

- 6 Añadir **100 μ l** de 125 I Glucagon (CRISTALINO) a todos los tubos. Mezclar en el Vortex.

Retirar los tubos T para su posterior conteo en el paso 11. No requieren más procesamiento posterior.

- 7 Cubrir el rack e incubar durante **24 horas a 2–8°C**.

Cubrir todo el rack con Parafilm o colocar los racks en bolsas de plástico para evitar la evaporación.

- 8 Añadir **1,0 ml** de la Solución de Precipitación (ROJA) *fría* a todos los tubos. Mezclar en el Vortex.

Para la adición de 1,0 ml de reactivo se puede emplear un dispensador de repetición.

- 9 Centrifugar **15 minutos** a 1500 xg.

- 10 Usando un rack de decantación de espuma, decantar (o aspirar) el sobrenadante, reteniendo el precipitado para el conteo.

Dejar escurrir los tubos invertidos sobre papel absorbente durante 10 minutos. Luego, golpear los tubos suavemente y secar los bordes para remover las gotas residuales.

- 11 Contar cada tubo durante **1 minuto**.

Cálculo de resultados

Para obtener resultados en términos de concentración a partir de una

representación logit-log de la curva de calibración, primero hay que calcular para cada pareja de tubos las cuentas medias por minuto corregidas con el **NSB**:

Cuentas netas = (Media CPM) menos (Media **NSB** CPM)

Entonces, determinar la unión de cada pareja de tubos como un porcentaje de la unión máxima (MB), tomando las cuentas corregidas con el **NSB** de los tubos A como 100%:

Porcentaje de Unión = (Cuentas netas / Cuentas **MB** netas) × 100

(El cálculo puede simplificarse omitiendo la corrección de las uniones no específicas; las muestras dentro del rango de calibración van a dar virtualmente el mismo resultado cuando el porcentaje de unión es calculado directamente a partir de la media de las CPM).

Usando papel gráfico logit-log, representar el porcentaje de unión en el eje vertical frente a la concentración en el eje horizontal (logarítmico) para cada calibrador no cero y dibujar la línea que pase por esos puntos aproximadamente. Los resultados de las muestras pueden ser leídos en la curva por interpolación.

Es una buena práctica inspeccionar los resultados para comprobar la concordancia entre los replicados, y realizar una gráfica de la curva de calibración (aunque los cálculos se realicen por ordenador), para ver la transformación más apropiada a usar y las posibles desviaciones en los puntos de calibración. También, recomendamos mantener un registro de los siguientes parámetros de la reducción de datos:

T = Cuentas totales (como cuentas por minuto)

%NSB = $100 \times (\text{Media cuentas NSB} / \text{cuentas totales})$

%MB = $100 \times (\text{Cuentas netas} / \text{Cuentas totales})$

Y los cortes 20, 50 y 80 por ciento, donde

20% = Concentración al 20 por ciento de unión, etc.

Otras aproximaciones, por ejemplo, logística 4-parámetros, también son aceptables. Ver Dudley RA, et al. "Guidelines for immunoassay data reduction". Clin Chem 1985;31:1264-71.

Ejemplo: Sólo como ilustración, no se puede utilizar para calcular resultados. Al ser los valores de los calibradores *lote-específicos*, las concentraciones expresadas en la columna derecha no pueden coincidir con los valores de los calibradores suministrados en su envío. (Ver tabla "Example Run").

Control de Calidad

El control o controles de glucagon suministrados con el kit deberán usarse como material de control de calidad para monitorear el rendimiento del ensayo.

Informar los resultados de los pacientes sólo si los resultados de los controles para este ensayo están dentro de los criterios de aceptabilidad establecidos por su laboratorio.

Es una buena práctica de laboratorio registrar para cada ensayo los números de lote de los componentes usados, así como las fechas en las que fueron abiertos por primera vez y reconstituidos. También recomendamos el uso de gráficos diarios de los controles — como se describe, por ejemplo, en Westgard JO, et al. A multi-rule chart for quality control. Clin Chem 1981;27:493-501. Las muestras repetidas pueden servir como una herramienta de valor adicional para monitorizar la precisión interensayo, y las parejas de los tubos del control pueden espaciarse a lo largo de la tanda de ensayo para verificar la ausencia de deriva significativa.

Centrifugación: El procedimiento establece centrifugar a 1500 *xg* durante 15 minutos. El uso de una centrífuga refrigerada es deseable pero no esencial. Usar las fórmulas que se dan a continuación para calcular la aceleración de su centrífuga a una velocidad dada, o la velocidad (en revoluciones por minuto) requerida para lograr la fuerza *g* deseada.

Fuerza *g* = $28,38 \times (\text{rpm} / 1\,000)^2 \times \text{radio}$ [pulgadas]

rpm = $187,7 \times \sqrt{(\text{fuerza } g / \text{radio [pulgadas]})}$

o

Fuerza *g* = $11,18 \times (\text{rpm} / 1\,000)^2 \times \text{radio [cm]}$

rpm = $299,1 \times \sqrt{(\text{fuerza } g / \text{radio [cm]})}$

Valores esperados

Se realizó un estudio del intervalo de referencia en el cual se analizaron muestras de plasma de 51 voluntarios del laboratorio mediante el procedimiento Double Antibody Glucagon. Este estudio produjo una mediana de 112 pg/ml (32 pmol/l) y un intervalo – correspondiente al 95% de las observaciones del centro – de 59 – 177 pg/ml (17 – 51 pmol/l)

Los laboratorios deben considerar estos resultados *sólo como una guía*. Cada laboratorio deberá establecer sus propios intervalos de referencia.

Limitaciones

Cuando se monitorean los niveles de glucagon de un paciente, se debe establecer un valor basal para ese paciente usando el mismo sistema de análisis, ya que se han observado diferencias en los valores de glucagon medidos por análisis distintos.

Características analíticas

Para obtener datos representativos del rendimiento del kit Double Antibody Glucagon, ver la sección Tablas y Gráficos. Los resultados se expresan en pg/ml.

Factor de Conversión:

pg/ml $\times$ 0,2872 $\rightarrow$ pmol/l

Intervalo de calibración: 25 – 500 pg/ml (WHO IS 69/194) Los valores de los calibradores son *lote-específicos*.

Sensibilidad analítica: 13 pg/ml (3,7 pmol/l),

Precisión intraensayo (dentro de una tanda): Las estadísticas se calcularon para las muestras a partir de los resultados de 20 pares de tubos en una sola tanda de análisis. (Ver la tabla "Intraassay Precision".)

Precisión entre ensayos (de una tanda a otra): Las estadísticas se calcularon para las muestras a partir de los resultados obtenidos en pares de tubos en 20 ensayos distintos. (Ver la tabla "Interassay Precision".)

Efecto deriva: Ninguno hasta aproximadamente 180 tubos. (Ver la tabla "End-of-Run Effect".)

Especificidad: El porcentaje de reactividad cruzada se calculó peso en peso para el glucagon intacto, los fragmentos de glucagon y los compuestos relacionados; la tabla muestra que el procedimiento Double Antibody Glucagon es altamente específico para el glucagon. (Ver la tabla "Specificity".)

Bilirrubina: La presencia de bilirrubina, en concentraciones hasta 200 mg/l, no tiene ningún efecto sobre los resultados en términos de precisión.

Hemólisis: La presencia de eritrocitos hasta concentraciones de 30 μ l/ml no tiene efecto en los resultados, en lo concerniente a la precisión del ensayo.

Linealidad: Las muestras fueron analizadas con varias diluciones. (Ver la tabla "Linearity".)

Efecto del almacenamiento en tubos de plástico y vidrio: Para determinar el efecto de guardar las muestras de los pacientes en tubos de plástico y en tubos de vidrio, se recogió sangre de 10 voluntarios en tubos con EDTA y cargados con aprotinina, hasta una concentración de un gramo de aprotinina por litro (1,0 g/l). El plasma se alicuotó en tubos de vidrio y de plástico, los cuales se guardaron congelados durante 5 días. Luego se analizaron todas las muestras mediante el procedimiento Double Antibody Glucagon obteniéndose los siguientes resultados:

(Plástico) = 0,87 (Vidrio) – 6,0 pg/ml
 $r = 0,98$

Medias:
57 pg/ml (Plástico)
72 pg/ml (Vidrio)

Los valores que se obtuvieron para las alícuotas guardadas en tubos de plástico fueron consistentemente más bajos que los valores equivalentes para las alícuotas guardadas en tubos de vidrio. En base a este estudio, se recomienda guardar las muestras de los pacientes en tubos de vidrio.

Efecto de la aprotinina: Para determinar el efecto de la aprotinina sobre la estabilidad de las muestras de los pacientes, se recogieron dos juegos de doce muestras de plasma con EDTA de 12 voluntarios. Uno de los juegos se cargó con aprotinina (1,0 g/l). Luego se analizaron todas las muestras mediante el

procedimiento Double Antibody Glucagon.
Por regresión lineal:

(Sin aprotinina) =
1,07 (Con aprotinina) + 52 pg/ml
 $r = 0,77$

Medias:
111 pg/ml (Sin aprotinina)
55 pg/ml (Con aprotinina)

El análisis muestra que los resultados son más altos en ausencia de aprotinina, presumiblemente debido a la reacción cruzada de los fragmentos de glucagon que surgen de la degradación proteolítica. Esto confirma la necesidad de estabilizar las muestras añadiendo aprotinina, como se indica en la sección de Recogida de la Muestra.

Comparación de los métodos: Se comparó el kit Double Antibody Glucagon de DPC con otro ensayo para glucagon comercialmente disponible (Kit A), en 20 muestras. Los resultados de DPC fueron generalmente más bajos que los resultados con el Kit A. Por regresión lineal:

(DPC) = 0,015 (Kit A) + 142 pg/ml
 $r = 0,051$

Medias:
145 pg/ml (DPC)
251 pg/ml (Kit A)

Los dos kits difieren del mismo modo en los valores esperados; el límite superior del intervalo de referencia para el kit de DPC es 130 pg/ml, y 250 pg/ml para el Kit A.

Las diferencias en los intervalos de referencia son en realidad una característica común de los inmunoanálisis que utilizan distintos anticuerpos y analitos heterogéneos. Esto puede ayudar a explicar los valores más bajos generados por el kit de DPC; estos sugieren que el Kit A reconoce, en mayor grado, los precursores del glucagon y/o los fragmentos del glucagon. Esta hipótesis es corroborada por la demostrada falta de reactividad cruzada del ensayo de DPC con los fragmentos 72-108, 72-107 y 126-159 del preproglucagon, el péptido inhibidor gástrico, la oxintomodulina, la secretina y el péptido intestinal vasoactivo (VIP). (Ver la tabla "Method Comparison").

Normalización: Para verificar la normalización del procedimiento Double Antibody Glucagon, se diluyó el Estándar

Internacional para Glucagon de la World Health Organization, número 69/194, a concentraciones correspondientes con los niveles de los calibradores no cero. El calibrador cero de DPC se utilizó como diluyente. Estas diluciones de la preparación WHO, junto con un juego de calibradores de DPC, se procesaron mediante el procedimiento Double Antibody Glucagon de DPC.

Los valores de porcentaje unido (%B/B₀) indicados en la tabla confirman que existe paralelismo con la preparación WHO. Los calibradores de DPC se comportan como diluciones del material de referencia. (Ver la tabla "Standardization".)

Asistencia técnica

Póngase en contacto con el distribuidor nacional.

El Sistema de Calidad de Diagnostic Products Corporation está registrado para la ISO 13485:2003.

Français

Glucagon à double anticorps

Domaine d'utilisation : le glucagon à double anticorps est un dosage radioimmunologique ¹²⁵I conçu pour la mesure quantitative du glucagon dans le plasma EDTA. Il est conçu pour utilisation diagnostique in vitro comme une aide au diagnostic et au traitement de patients atteints de troubles du métabolisme des glucides, en particulier de diabète mellitus, d'hypogycémie et d'hyperglycémie.

Référence catalogue : **KGND1** (100 tubes)



Le coffret de 100 tubes contient moins de 2 microcuries (74 kilobecquerels) de glucagon réactif marqué à l'iode 125.

Introduction

Le glucagon est un polypeptide constitué d'une chaîne de 29 acides aminés sécrété par les cellules alpha du pancréas. Son action est généralement antagoniste à celle de l'insuline, qui est sécrétée par les cellules bêta du pancréas. Comme l'insuline, le glucagon agit sur la régulation du niveau de glucose en circulation, mais

à l'inverse de l'insuline, qui s'oppose généralement à l'hyperglycémie, le glucagon fait partie d'un système contre-régulateur comprenant l'épinéphrine et plusieurs autres facteurs, généralement moins importants, qui agit contre l'hypoglycémie.^{6,25,26} En réponse à une augmentation de l'utilisation du glucose (p. ex. pendant l'effort physique) ou à un appauvrissement dû à l'insuline, le glucagon permet de restaurer le niveau de glucose en circulation en stimulant la production de glucose dans le foie.⁶

L'évaluation du glucagon peut ainsi être utile aux patients atteints de diabète insulino-dépendant sous traitement intensif à l'insuline ou candidats à ce type de traitement. Dans cette situation, une contre-régulation déficiente, caractérisée par une réponse déficiente en glucagon et en épinéphrine à des diminutions du glucose en circulation, augmenterait le risque d'épisodes hypoglycémiques sévères causés par l'insuline.^{1,4,5,6,24}

Le glucagon est apparenté structurellement à d'autres peptides neurohormonaux, notamment la sécrétine, le polypeptide intestinal vasoactif (VIP) et le peptide inhibiteur gastrique (GIP).²² Cette hormone est considérablement similaire d'une espèce à l'autre, en particulier entre mammifères de l'Ancien Monde.^{7,22} La séquence d'acide aminés du glucagon humain est identique à celle du glucagon de la vache, du porc, du lapin, du rat et du hamster ; en revanche, le glucagon du cochon d'Inde est différent en cinq endroits. Le glucagon de la dinde et de la poule ne diffère du glucagon humain qu'en un endroit ; le glucagon du canard et de l'alligator en deux endroits.

Le glucagon est dérivé du préproglucagon, qui est présent dans les cellules alpha du pancréas et dans les intestins. Ce précurseur contient un peptide signal N-terminal (résidus -24 à -1) suivi par la glicentine (résidus 1 à 69) et ce qui a été appelé le fragment majeur du proglucagon (résidus 72 à 160). Ce dernier contient deux peptides semblables au glucagon, dénommés GLP-1 et GLP-2. La glicentine, ou glucagon intestinal, ou immunoréactivité semblable au glucagon 1 (GLI-1), contient le peptide pancréatique apparenté à la glicentine (GRPP, glicentine-1) suivi par le glucagon lui-même (résidus 33 à 61) et un

hexapeptide. Le fragment C-terminal de la glicentine, qui contient le glucagon et l'hexapeptide, a été dénommé oxyntomoduline, entéroglucagon, GLI-1 et glucagon-37.²²

Tandis que les intestins sécrètent principalement la moitié N-terminale intacte du préproglucagon (c.-à-d. la glicentine) ainsi que l'oxyntomoduline et les fragments C-terminaux GLP-1 et GLP-2, le pancréas sécrète principalement la moitié C-terminale intacte (c.-à-d. le fragment majeur du proglucagon) ainsi que les fragments N-terminaux GRPP, le glucagon et l'oxyntomoduline.^{2,22} Comme la glicentine, qui est parfois appelée proglucagon, n'est pas une sécrétion habituelle du pancréas, elle n'est peut-être pas un intermédiaire normal dans la biosynthèse du glucagon.² Quoi qu'il en soit, le fait que le niveau de glucagon en circulation de sujets humains ait tendance à demeurer normal après une pancréatectomie totale suggère qu'il existe un mécanisme transformant des produits intestinaux en glucagon.^{2,26}

Principe du test

La procédure de test du glucagon à double anticorps de DPC est un dosage radioimmunologique séquentiel. Après préincubation de l'échantillon du patient avec un anticorps anti-glucagon, le glucagon marqué à l'¹²⁵I est en concurrence avec le glucagon contenu dans l'échantillon pour l'acquisition de sites à anticorps. Après une durée d'incubation déterminée, le glucagon libre et le glucagon lié sont séparés par la méthode à double anticorps accélérée au PEG puis par centrifugation. Le précipité contenant la fraction liée aux anticorps est alors compté et les concentrations du patient sont lues par rapport à une courbe de calibration.

Réactifs à distribuer : 3

Temps d'incubation totale : deux incubations de 24 heures.

Activité totale en début de marquage : environ 25 000 cpm.

Séparation : la solution de précipitation prête à l'emploi combine le second anticorps et le PEG dilué.

Précautions d'emploi

Réservé à un usage diagnostique *in vitro*.

Réactifs : conserver à +2–8°C dans un réfrigérateur autorisé à recevoir des matériaux radioactifs. Éliminer les déchets conformément aux lois en vigueur.

Ne pas utiliser les réactifs au delà de leur date d'expiration.

Certains composants fournis avec ce coffret peuvent contenir des agents humains et/ou d'autres éléments potentiellement infectieux qui nécessitent certaines précautions.

Respecter les précautions d'emploi et manipuler tous les composants du coffret comme des produits potentiellement infectieux. Les réactifs dérivés de produits humains et utilisés dans ce coffret ont subi un test sérologique pour la syphilis et des tests de dépistage pour les anticorps anti-VIH1 et 2, anti-HCV et pour l'antigène de surface de l'hépatite B, qui se sont tous avérés négatifs.

De l'azide de sodium (à moins de 0,1 g/dl) a été ajouté comme conservateur ; lors de l'élimination, l'évacuer avec de grandes quantités d'eau pour éviter une accumulation d'azides métalliques explosifs dans les canalisations.

Eau : utiliser de l'eau distillée ou désionisée.

Radioactivité

Ce coffret de réactif est réservé à l'usage *in vitro* (Autorisation DGSNR).

Règles de base de protection contre les rayonnements ionisants et précautions d'emploi.

Ce produit radioactif ne peut être reçu, acheté, détenu ou utilisé que par des personnes autorisées à cette fin et dans des laboratoires dotés de cette autorisation. Cette solution ne peut en aucun cas être administrée à l'homme ou aux animaux. Respecter impérativement les dates de péremption indiquées sur l'emballage extérieur et sur les étiquettes des différents réactifs du coffret. Tous les réactifs, dont les tubes revêtus d'anticorps, doivent être conservés à + 4/+ 8° C dans leur conditionnement d'origine avant d'être utilisés. L'achat, la possession, l'utilisation et l'échange de matières radioactives sont soumis aux

réglementations en vigueur dans le pays de l'utilisateur. Les règles de base de protection contre les rayonnements ionisants doivent être respectées selon les procédures en vigueur. Ne pas pipeter les solutions radioactives avec la bouche. Éviter le contact direct avec la peau ou les muqueuses de tout produit radioactif en portant des blouses et gants de protection. Toute matière radioactive doit être manipulée dans un local réservé à cet effet éloigné de tout passage. Les produits radioactifs doivent être stockés dans leur conditionnement d'origine dans un local approprié. Un cahier de réception et de stockage de produits radioactifs doit être tenu à jour. Le matériel de laboratoire et la verrerie qui ont été contaminés doivent être éliminés au fur et à mesure afin d'éviter la contamination croisée de plusieurs isotopes. Chaque contamination ou perte de substance radioactive doit être réglée selon les procédures établies. Toute mise aux déchets de matière radioactive doit se faire conformément aux réglementations en vigueur. Ne pas manger, ni boire, ni fumer, ni appliquer de produits cosmétiques dans les laboratoires où des produits radioactifs sont utilisés. Les réactifs radioactifs ne peuvent être vendus qu'à des personnes habilitées à manipuler des substances radioactives.

Matériaux fournis

Antisérum au glucagon (GND1)

Antisérum au glucagon lyophilisé, cultivé dans des lapins, avec conservateur. Reconstituer en ajoutant **10 ml** d'eau distillée. Mélanger *doucement* par inversion. Stable à 2–8°C pendant 30 jours après reconstitution. Couleur : bleu.
KGND1 : 1 flacon

Glucagon ¹²⁵I (GND2)

Glucagon humain synthétique iodé lyophilisé, avec conservateur. Immédiatement avant le dosage, reconstituer en ajoutant **10 ml** d'eau distillée. Mélanger *doucement* par inversion. Stable à 2–8°C pendant 30 jours après reconstitution.
KGND1 : 1 flacon

Calibreur zéro du glucagon (GND3)

Calibreur zéro lyophilisé dans une matrice à base de protéine, avec conservateur. 30

minutes au moins avant utilisation, reconstituer chaque flacon en ajoutant **10 ml** d'eau distillée. Mélanger *doucement* par inversion. Stable à 2–8°C pendant 30 jours après reconstitution, ou pendant deux mois (aliquoté) à –20°C.

KGND1 : 2 flacons

Calibreur F du glucagon (GND8)

Calibreur lyophilisé contenant du glucagon humain synthétique dans une matrice à base de protéine, avec conservateur. *30 minutes au moins avant utilisation*, reconstituer chaque flacon en ajoutant **2,0 ml** d'eau distillée ou désionisée. Utiliser une pipette volumétrique et mélanger *doucement* par inversion. *Jeter après utilisation*.

KGND1 : 3 flacons

Le calibreur F a une valeur *spécifique à chaque lot* d'environ 500 picogrammes de glucagon humain synthétique par millilitre (pg/ml), soit 144 picomoles par litre (pmol/L). Se reporter à l'étiquette du flacon pour les valeurs exactes en pg/ml. Le dosage est standardisé conformément à la Norme Internationale pour le Glucagon de l'Organisation Mondiale de la Santé numéro 69/194.

Solution à précipité (GNRG)

110 ml de solution à précipité composée de globuline de chèvre anti-gamma-globuline de lapin (GARGG) et de polyéthylène glycol (PEG) dilué en solution saline, conservée par de la gentamicine. La solution à précipité est fournie sous forme liquide prête à l'emploi. Enlever complètement la fermeture en papier aluminium et conserver au réfrigérateur : stable à +2–8°C pendant 30 jours après ouverture. Comme un précipité fin mais visible peut se former après réfrigération, la solution à précipité doit être bien mélangée avant utilisation, sans mousser. Couleur : rouge.

KGND1 : 1 flacon

Glucagon contrôle (GNCO1, GNCO2)

Deux flacons, marqués Glucagon Contrôle 1 et 2, contenant du glucagon humain synthétique dans une matrice à base de protéine, avec conservateur. Les contrôles sont fournis sous forme lyophilisée. *30 minutes au moins avant utilisation*, reconstituer chaque flacon en ajoutant **1,0 ml** d'eau distillée. Utiliser une pipette volumétrique et mélanger *doucement* par

inversion. *Jeter après usage*. Se reporter à l'étiquette du flacon pour les valeurs exactes en pg/ml.

KGND1 : 3 jeux.

Matériel requis mais non fourni

Compteur gamma

Centrifugeur, réfrigéré et capable de 1500xg au moins.

Agitateur de type vortex.

Préparation réactive

Eau distillée ou désionisée

Pipettes de mesure 5,0 ml et 10 ml

Pipette volumétrique : 1,0 ml

Dosage radioimmunologique

Tubes en verre ordinaire de 12x75 mm, disponibles auprès de DPC. Ces tubes doivent être composés de verre borosilicate de haute qualité. En raison de la tendance du glucagon à s'adsorber aux surfaces de plastique, des tubes en verre (et non en plastique) doivent être employés pour le dosage.

Micropipettes : 50 µl, 100 µl, 200 µl, 500 µl et 1,0 ml. Pour les ajouts de 100 µl, il est recommandé d'utiliser un récipient distributeur à répétition fiable. Un distributeur tel qu'une seringue précis à 0,05 ml près est recommandé pour l'ajout d'1,0 ml de solution à précipité.

Parafilm

Un portoir de décantation, disponible auprès de DPC

Papier graphe Logit-log, disponible auprès de DPC (Référence catalogue : ZP797)

Recueil des échantillons

Le patient n'a pas besoin d'être à jeun et aucune préparation spéciale n'est requise. Effectuer une prise de sang par ponction veineuse²⁷ dans des tubes EDTA *glacés* et prendre note de l'heure. Les tubes doivent être immergés dans de la glace à 2–8°C pendant l'intégralité du recueil et de la manipulation du sang.

Tout de suite après le recueil du sang, ajouter 5 000 unités inhibitrices de la Kallikrein (KIU) pour 10 ml de sang entier, sous forme de Trasylol (500 µl) ou d'aprotinine (1 mg). Mélanger à fond et conserver au froid jusqu'à séparation.

Séparer le plasma et les cellules par centrifugation dans un centrifugeur *réfrigéré*. Aspirer le plasma avec une pipette Pasteur en verre, puis transférer le plasma dans un tube en verre et congeler immédiatement. Aliquoter si nécessaire.

La lipémie peut interférer avec le dosage. Il est recommandé de clarifier les échantillons hyperlipémiques par ultracentrifugation.

Des échantillons hémolysés peuvent être révélateurs d'une préparation inadéquate du prélèvement avant son envoi au laboratoire ; il faudra donc interpréter les résultats avec prudence.

Des tubes pour prélèvements sanguins provenant de fabricants différents peuvent donner des résultats différents, selon les matériaux et additifs utilisés, y compris gels ou barrières physiques, activateurs de la coagulation et/ou anticoagulants. Le coffret Glucagon Double Antibody n'a pas été testé sur tous les types de tubes possibles.

Volume nécessaire : 200 µl de plasma EDTA par tube.

Stockage : *attention* : n'utiliser de tubes ou de pipettes en plastique à aucune étape de la préparation. Tenir les échantillons au froid à tout moment et à l'écart de la lumière directe. Dégeler et recongeler les échantillons ou les stocker à température ambiante (15–28°C) pendant une durée prolongée peut être à l'origine de quantités de glucagon fortement réduites.

Protocole de dosage

Tous les composants à l'exception de la solution à précipité doivent être à température ambiante (15–28°C) avant utilisation.

Attention : en raison de la tendance du glucagon à s'adsorber aux surfaces de plastique, des tubes en verre et non en plastique doivent être employés pour le dosage. (L'utilisation de tubes de plastique pourrait causer la perte de tout le glucagon détectable.)

- 1 Immédiatement avant le dosage, diluer le calibre F du glucagon à 500 pg/ml dans le calibre zéro du glucagon, à l'aide de tubes ou de flacons en verre, comme indiqué dans le tableau ci-dessous. Agiter à fond

chaque mélange au vortex. Jeter les calibres après usage.

Ajouter...		À...		Pour donner ce calibre		
µl	Calib.	µl	Calib.	pg/ml	pmol/l	
50	Calib. F	950	Zéro	B 25	7	
100	Calib. F	900	Zéro	C 50	14	
200	Calib. F	800	Zéro	D 100	29	
500	Calib. F	500	Zéro	E 250	72	

- 2 Étiqueter seize tubes en verre en double : T (totaux), **NSB** (liage non spécifique), A (liage maximal) et B jusqu'à F. Étiqueter d'autres tubes, en double également, pour les échantillons de plasma et les contrôles.

Calibre	pg/ml (approx.)	pmol/L (approx.)
A (MB)	0	0
B	25	7
C	50	14
D	100	29
E	250	72
F	500	144

NB : la valeur des calibres est *spécifique à chaque lot*. Se reporter à l'étiquette du flacon pour les valeurs exactes en pg/ml.

- 3 Pipeter **200 µl** du calibre zéro A dans les tubes **NSB** et A, et **200 µl** de chacun des calibres restants B à F dans les tubes étiquetés correspondants. Pipeter **200 µl** de chaque échantillon de plasma du patient et de chaque contrôle dans les tubes préparés.

Il est bon d'utiliser des embouts de micropipettes jetables et de changer d'embout d'un échantillon à l'autre de manière à éviter toute contamination.

Les échantillons dont la concentration en glucagon attendue est supérieure à celle du calibre le plus concentré (calibre F, 500 pg/ml) doivent être dilués dans le calibre zéro avant le dosage.

- 4 Ajouter **100 µl** d'antisérum au glucagon (BLEU) à tous les tubes sauf les tubes **NSB** et T. Agiter au vortex.

Un distributeur à répétition est recommandé à cette étape et pour l'ajout de traceur à l'étape 6.

- 5** Couvrir le portoir et incubé pendant **24 heures à 2–8°C**.

Couvrir le portoir complètement avec du Parafilm ou placer les portoirs dans des sacs en plastique pour éviter l'évaporation.

- 6** Ajouter **100 µl** de Glucagon ¹²⁵I (INCOLORE) à chaque tube. Agiter au vortex.

Retirer les tubes T pour le comptage à l'étape 11; ils n'ont pas d'autre traitement.

- 7** Couvrir le portoir et incubé pendant **24 heures à 2–8°C**.

Couvrir le portoir complètement avec du Parafilm, ou placer les portoirs dans des sacs en plastique pour éviter l'évaporation.

- 8** Ajouter **1,0 ml** de solution à précipité *froide* (ROUGE) à chaque tube. Agiter au vortex.

Pour l'ajout d'1,0 ml de réactif, il est possible d'employer un distributeur à répétition.

- 9** Centrifuger pendant **15 minutes** à 1500xg.

- 10** À l'aide d'un portoir de décantation en mousse, décanter (ou aspirer) le surnageant, en conservant le précipité pour le comptage.

Laisser les tubes reposer verticalement sur du papier absorbant pendant 10 minutes, puis tapoter les tubes et sécher les bords pour éliminer les gouttelettes restantes.

- 11** Compter chaque tube pendant **1 minute**.

Calcul des résultats

Afin d'obtenir des résultats en concentrations à partir d'une représentation logit-log de la courbe de calibration, calculer pour chaque doublet de tubes les coups corrigés : moyenne cpm-moyenne des cpm du **NSB** :

CPM corrigés = (Moyenne cpm) moins (Moyenne cpm **LNS**)

Puis déterminer pour chaque doublet la capacité de liaison en pourcentage de

liaison maximale (MB) corrigée des cpm dus au **NSB** des tubes A tubes considérés à 100% :

$$\% \text{ liaison} = (\text{cpm corrigés} / \text{cpm corrigés LM}) \times 100$$

(Le calcul peut être simplifié en négligeant la correction due au **NSB**. Les échantillons dans la gamme de calibration donnent des résultats pratiquement identiques quand la capacité de liaison est calculée directement à partir de la moyenne des CPM.)

En utilisant un papier logit-log, porter en ordonnée les pourcentages de liaison en fonction des concentrations des calibreurs qui ne sont pas à zéro, en abscisse. Tracer une droite passant approximativement par ces points. Les concentrations des échantillons inconnus sont déterminées par interpolation sur la courbe standard.

Il est bon de vérifier les doublets et de construire une représentation graphique de la courbe de calibration (même si celle-ci est faite par ordinateur) avec les différentes valeurs de façon à visualiser le meilleur tracé ; c'est une façon de détecter les points déviants. Nous recommandons aussi de suivre les paramètres suivants :

T = Activité totale (cpm)

%LNS = $100 \times (\text{Moyenne des cpm du LNS} / \text{cpm Totaux})$

%LM = $100 \times (\text{cpm corrigés} / \text{cpm totaux})$

Et les ordonnées à l'origine à 20, 50 et 80 % avec

20% = Concentration à 20% de liaison, etc.

NB : d'autres approches sont possibles, comme l'intégration de paramètres 4-p logistiques. Se rapporter à Dudley RA, et al. Guidelines for immunoassay data reduction. Clin Chem 1985;31:1264-71.

Exemple de série : à titre d'exemple uniquement, et non pour calculer des résultats provenant d'une autre série. Comme les valeurs des calibreurs sont *spécifiques à chaque lot*, les concentrations indiquées peuvent être différentes de celles de vos livraisons. (Voir le tableau « Example Run ».)

Assurance qualité

Le glucagon contrôle fourni doit être utilisé comme matériau d'assurance qualité pour vérifier les performances du dosage.

Les résultats de patient ne doivent être validés que si les résultats des contrôles correspondent aux critères d'acceptation établis par votre laboratoire.

Il est bon d'enregistrer pour chaque dosage les numéros de lot des composants utilisés ainsi que la date à laquelle ils ont été reconstitués ou ouverts. Nous recommandons également de noter jour après jour les résultats des contrôles, comme décrit par exemple dans Westgard JO, et al. A multi-rule chart for quality control. Clin Chem 1981;27:493-501. Noter qu'un redosage d'échantillon peut être très utile pour suivre la précision inter-essai, et que les doublets de tubes contrôle peuvent être espacés de façon à vérifier l'absence de dérive significative.

Centrifugation : cette procédure nécessite une centrifugation à 1500×g pendant 15 minutes. Un centrifugeur réfrigéré à grande vitesse est recommandé mais non indispensable. Utiliser les formules ci-dessous pour calculer l'accélération de votre centrifugeur à une vitesse donnée ou la vitesse (en révolutions par minute) nécessaire pour obtenir une force g donnée.

$$\text{force g} = 28,38 \times (\text{tpm} / 1\,000)^2 \times \text{rayon [pouces]}$$

$$\text{tpm} = 187,7 \times \sqrt{(\text{force g} / \text{rayon [pouces]})}$$

ou

$$\text{force g} = 11,18 \times (\text{tpm} / 1\,000)^2 \times \text{rayon [cm]}$$

$$\text{tpm} = 299,1 \times \sqrt{(\text{force g} / \text{rayon [cm]})}$$

Valeurs de référence

Une étude d'intervalles de référence a été réalisée dans laquelle des échantillons de plasma de 51 laborantins volontaires ont été dosés par la procédure de test du glucagon à double anticorps. Cette étude a observé une moyenne de 112 pg/ml (32 pmol/L) et un intervalle (correspondant aux 95% centraux des observations) de 59 – 177 pg/ml (17 – 51 pmol/L)

Ces valeurs sont données à titre indicatif uniquement. Chaque laboratoire doit établir ses propres valeurs de référence.

Limites

Pendant l'observation du niveau de glucagon d'un patient, il faut établir un seuil de comparaison pour ce patient en utilisant le même système de dosage, car des différences en niveau de glucagon mesuré par différents dosages ont été observées.

Performances du test

Voir Tableaux et Graphiques pour des données représentatives des performances du coffret de test du glucagon à double anticorps. Les résultats sont exprimés en pg/ml.

Facteur de conversion :

pg/ml × 0,2872 → pmol/l

Intervalle de linéarité : 25 – 500 pg/ml (OMS NI 69/194) Les valeurs des calibreurs sont *spécifiques à chaque lot*.

Sensibilité analytique : 13 pg/ml (3,7 pmol/l),

Précision intra-dosage (au sein d'une même série) : ces statistiques ont été calculées pour un échantillon de résultats de 20 paires de tubes tirés d'un seul dosage. (Voir le tableau « Intraassay Precision ».)

Précision inter-dosage (entre plusieurs séries) : ces statistiques ont été calculées pour un échantillon de résultats de paires de tubes tirées de 20 dosages différents. (Voir le tableau « Précision intertest ».)

Effet de la position des tubes : aucun jusqu'à 180 tubes. (Voir le tableau « End-of-Run Effect ».)

Spécificité : le pourcentage de réaction croisée a été calculé à poids égal pour le glucagon intact, les fragments de glucagon, et les composés apparentés. Le tableau montre que le test du glucagon à double anticorps est hautement spécifique pour le glucagon. (Voir le tableau « Specificity ».)

Bilirubine : la présence de bilirubine ne présente aucun effet sur les résultats ni sur la précision du dosage si la concentration ne dépasse pas 200 mg/l.

Hémolyse : la présence d'agrégat d'hématies jusqu'à une concentration de 30 µl/ml n'a aucun effet sur les résultats quant à la précision du dosage.

Test de dilution : des échantillons ont été dosés à différentes concentrations. Voir le tableau « Linearity ».

Effets du stockage en tubes en plastique et en tubes en verre : afin de déterminer les effets du stockage d'échantillons de patient en tubes en plastique et en tubes en verre, le sang de 10 volontaires a été prélevé dans des tubes EDTA dans lesquels a été ajoutée de l'aprotinine concentrée à 1 gramme d'aprotinine par litre (1,0 g/l). Le plasma a été aliquoté dans des tubes en verre et des tubes en plastique, qui ont été stockés congelés pendant 5 jours. Chaque échantillon a ensuite été dosé suivant la procédure de test du glucagon à double anticorps. Les résultats suivants ont été obtenus :

(Plastique) = 0,87 (Verre) – 6,0 pg/ml
 $r = 0,98$

Moyennes :
57 pg/ml (Plastique)
72 pg/ml (Verre)

Les valeurs obtenues pour les aliquotes stockées en tubes en plastique sont systématiquement inférieures à celles obtenues pour les aliquotes correspondantes stockées en tubes en verre. Pour cette raison, il est recommandé de stocker les échantillons de patients en tubes en verre.

Effets de l'aprotinine : afin de déterminer les effets de l'aprotinine sur la stabilité des échantillons de patients, deux jeux de douze échantillons de plasma EDTA ont été prélevés sur 12 volontaires. De l'aprotinine concentrée à 1,0 g/l a été ajoutée à l'un des jeux. Chaque échantillon a ensuite été dosé suivant la procédure de test du glucagon à double anticorps. Par régression linéaire :

(sans aprotinine) =
1,07 (avec aprotinine) + 52 pg/ml
 $r = 0,77$

Moyennes :
111 pg/ml (sans aprotinine)
55 pg/ml (avec aprotinine)

Cette analyse démontre que les résultats sont plus élevés en l'absence d'aprotinine, probablement à cause de fragments de glucagon en réaction croisée issus de la dégradation protéolytique. Ceci confirme qu'il est nécessaire de stabiliser les échantillons en ajoutant de l'aprotinine,

comme indiqué dans le paragraphe consacré au recueil des échantillons.

Comparaison de méthodes : la méthode de test du glucagon à double anticorps de DPC a été comparée à un autre coffret de dosage du glucagon disponible commercialement (coffret A) sur 20 échantillons. Les résultats de DPC sont généralement moins élevés que les résultats du coffret A. Par régression linéaire :

(DPC) = 0,015 (coffret A) + 142 pg/ml
 $r = 0,051$

Moyennes :
145 pg/ml (DPC)
251 pg/ml (coffret A)

Ces deux dosages ont également des valeurs attendues différentes ; la limite supérieure de l'intervalle de référence du dosage de DPC est de 130 pg/ml, tandis que celle du coffret A est de 250 pg/ml.

Il est commun de trouver des différences entre intervalles de références pour des dosages immunométriques qui utilisent des anticorps différents et des analytes hétérogènes. Ceci peut expliquer en partie les valeurs inférieures rendues par le coffret DPC ; ces valeurs suggèrent que le coffret A reconnaît davantage de précurseurs et/ou de fragments du glucagon. Cette hypothèse est confirmée par l'absence prouvée de réaction croisée au préproglucagon 72–108, au préproglucagon 72–107, au préproglucagon 126–159, au peptide inhibiteur gastrique, à l'oxytomoduline, à la sécrétine et au peptide intestinal vasoactif (VIP) du dosage de DCP. (Voir le tableau « Method Comparison ».)

Standardisation : afin de vérifier la standardisation de la procédure de test du glucagon à double anticorps, la Norme Internationale pour le Glucagon de l'Organisation Internationale de la Santé numéro 69/194 a été diluée à des concentrations correspondant aux niveaux des calibreurs non-zéro à l'aide du calibreur zéro de DPC. Ces dilutions de la préparation de l'OMS ainsi qu'un jeu de calibreurs de DPC ont été traités par la procédure de test du glucagon à double anticorps de DPC.

Les valeurs de pourcentage lié (%B/B₀) indiquées dans le tableau confirment le parallélisme avec la préparation de l'OMS. Les calibreurs DPC se comportent comme

des dilutions du produit de référence. (Voir le tableau « Standardization ».)

Assistance technique

Contacter votre distributeur national.
Distribué en France par DPC France 90
bd National 92257 La Garenne-Colombes.

Le système d'assurance qualité de DPC est
certifié ISO 13485 (2003).

Italiano

Doppio Anticorpo Glucagone

Uso: il dosaggio Doppio Anticorpo Glucagone è un radioimmunosaggio marcato con I¹²⁵ per la misurazione quantitativa del glucagone nel plasma EDTA. A solo uso diagnostico *in vitro* quale ausilio nella diagnosi e nella terapia di pazienti con disturbi del metabolismo glucidico comprensivo del diabete mellito, dell'ipoglicemia e dell'iperglicemia.

Codice: **KGND1** (100 provette)



Il kit da 100 determinazioni
contiene meno di 2 microcurie
(74 kilobecquerel) di Glucagone
marcato con I¹²⁵.

Riassunto e Spiegazione del Test

Il glucagone è un polipeptide a catena singola che comprende 29 aminoacidi, prodotto nelle cellule pancreatiche alfa. La sua azione, è generalmente antagonista rispetto a quella dell'insulina, che viene secreta dalla cellule pancreatiche beta. Come l'insulina, il glucagone è coinvolto nella regolazione dei livelli di glucosio circolante; ma mentre l'insulina agisce tipicamente per opporsi all'iperglicemia, il glucagone è parte di un sistema che agisce in maniera esattamente opposta – inclusa l'epinefrina ed altri fattori, normalmente di importanza inferiore – atti a difenderci dall'ipoglicemia.^{6,25,26} In risposta ad un utilizzo maggiore di glucosio (come durante i periodi di esercizio fisico) o ad uno minore indotto dall'insulina, il glucagone aiuta a ripristinare i livelli circolanti stimolando la produzione di glucosio nel fegato.⁶

Le determinazioni di glucagone possono quindi essere rilevanti in pazienti affetti da diabete insulino dipendente sottoposti o che potrebbero essere sottoposti a terapia intensiva con insulina. In tale contesto, una controregolazione difensiva – caratterizzata da una deficienza combinata sia nella risposta del glucagone che dell'epinefrina per decrementare i livelli di glucosio in circolo – aumenterà il rischio di gravi episodi di ipoglicemia indotta da insulina.^{1,4,5,6,24}

Il glucagone è strutturalmente relazionato ad altri peptidi neuroendocrinali, inclusi secretina, polipeptidi intestinali vasoattivi (VIP) e peptidi gastrici inibitori (GIP).²² L'ormone presenta considerevoli similitudini da specie a specie specialmente tra i mammiferi del Vecchio Mondo.^{7,22} La sequenza di aminoacidi del glucagone umano è identica a quella del glucagone che si trova nelle mucche, nei maiali, nei conigli, nei topi e nei criceti; il glucagone delle cavie, invece, differisce in cinque posizioni. Il glucagone dei tacchini e dei polli differisce da quello umano per una sola posizione: quello delle anitre e degli alligatori per due.

Il glucagone deriva dal preproglucagone, che è presente nelle cellule alfa del pancreas ed anche nei visceri. Questo precursore include un peptide a segnale N-terminale (residui da -24 a -1), seguito dalla glicentina (residui da 1 a 69) e quello che è stato chiamato come maggior frammento del proglucagone (residui da 72 a 160). Quest'ultimo include due peptidi glucagone-simili, chiamati GLP-1 e GLP-2. La glicentina, conosciuta anche come glucagone dei visceri e l'immunoreattività 1 glucagone simile (GLI-1) include un peptide pancreatico glicentina-relazionato (GRPP, glicentina-1) seguito dal glucagone stesso (residui da 33 a 61) ed un esapeptide. Il frammento C-terminale della glicentina, che contiene glucagone ed esapeptide è stato più volte denominato ossintomodulina, enteroglucagone, GLI-2 e glucagone-37.²²

Mentre i visceri secernono principalmente la metà N-terminale intatta del preproglucagone (i.e., glicentina) insieme all'ossintomodulina ed a frammenti C-terminali GLP-1 e GLP-2, il pancreas secerne principalmente la metà C-terminale (i.e. il cosiddetto frammento principale del proglucagone) insieme ai

frammenti N-terminali GRPP, il glucagone e l'ossintomodulina.^{2,22} Poiché la glicentina, chiamata qualche volta proglucagone, non è un prodotto tipico secreto dal pancreas, può non essere un intermediario normale nella biosintesi del glucagone.² Nonostante ciò, il fatto che i livelli di glucagone circolante tendano a rimanere normali nei soggetti dopo pancreatectomia totale suggerisce l'esistenza di un qualche meccanismo per la trasformazione dei prodotti intestinali in glucagone.^{2,26}

Procedura del Dosaggio

Il Dosaggio Doppio Anticorpo Glucagone è un radioimmunosaggio sequenziale. Dopo pre-incubazione del campione del paziente con un anticorpo anti-glucagone, il glucagone marcato con ¹²⁵I compete con il glucagone presente nel campione per i siti anticorpali. Dopo incubazione per un tempo prefissato, viene ottenuta la separazione del libero dal legato con il metodo doppio anticorpo PEG-accelerato, seguito da centrifugazione. Il precipitato che contiene la frazione dell'anticorpo legato e quindi contato e le concentrazioni dei pazienti vengono lette dalla curva di calibrazione.

Reagenti da Dispensare: 3

Tempo Totale di Incubazione: Due incubazioni da 24 ore.

Conte Totali alla iodinazione: circa 25 000 cpm,

Separazione: La Soluzione Precipitante pronta all'uso combina il secondo anticorpo ed il PEG diluito.

Avvertenze e Precauzioni

Ad uso diagnostico *in vitro*.

Reagenti: Conservare a 2–8°C in un frigorifero appositamente destinato al materiale radioattivo. Eliminare secondo le normative di legge vigenti.

Non utilizzare reagenti oltre la data di scadenza.

Alcuni componenti forniti in questo kit possono contenere materiale di origine umana e/o altri ingredienti potenzialmente pericolosi che necessitano di precauzioni di utilizzo.

Seguire le precauzioni universali, e manipolare tutti i componenti come se

potessero trasmettere agenti infettivi. Sono stati dosati materiali di origine umana e sono stati trovati non reattivi per la Sifilide; per gli Anticorpi Anti-HIV 1 e 2; per l'Antigene di Superficie dell'Epatite B; e per gli Anticorpi Anti-Epatite C.

E' stata aggiunta Sodio Azide a concentrazioni inferiori a 0,1 g/dL come conservante. Al momento dell'eliminazione, irrorare con molta acqua per evitare la formazione di azidi metalliche potenzialmente esplosive nelle tubature di piombo e di rame.

Acqua: Utilizzare solo acqua distillata o deionizzata.

Radioattività: Una copia di tutti i certificati di Autorizzazione per radioisotopi (Specifici o Generici) rilasciata ad un cliente americano deve essere conservata in file presso la Diagnostic Products Corporation prima che i kit o i componenti contenenti materiale radioattivo possano essere spediti. Questi materiali radioattivi possono essere acquisiti da qualsivoglia cliente in possesso dell'Autorizzazione Specifica. Con l'Autorizzazione Generica questi materiali radioattivi possono essere acquistati solo da medici, veterinari che esercitino la professione, laboratori clinici ed ospedalieri – e solo per l'esecuzione di test clinici o di laboratorio in vitro che non implicino somministrazione interna o esterna del materiale radioattivo o delle sue radiazioni alle persone o animali. La sua acquisizione, ricevimento, conservazione, utilizzo, trasferimento ed eliminazione sono soggette a regolamentazioni e ad Autorizzazione (Generica o Specifica) della Commissione Statunitense per il Nucleare o dello Stato con il quale l'NRC abbia stipulato un accordo per l'esercizio del controllo regolatorio.

Manipolare i materiali radioattivi secondo quanto previsto dall'Autorizzazione Generica o Specifica. Per minimizzare l'esposizione alle radiazioni, l'utilizzatore deve attenersi alle linee guida stabilite dal National Bureau of Standards publication su "*Safe Handling of Radioactive Materials*" "*Norme per una corretta manipolazione dei Materiali Radioattivi*". (Guida N° 92, pubblicata il 9 Marzo 1964) e successive edizioni pubblicate dallo Stato e dalle Autorità Federali.

Assorbire immediatamente le fuoriuscite e decontaminare le superfici contaminate. Evitare la formazione di aerosol. Eliminare i rifiuti solidi radioattivi secondo quanto previsto dall'Autorizzazione. Le licenze generiche (possessori di NRC Form 483) possono eliminare i rifiuti radioattivi solidi come non radioattivi, dopo aver rimosso l'etichetta. I detentori di autorizzazioni specifiche (NRC Form 313) devono fare riferimento al Titolo 10, Codice delle Regolamentazioni Federali Parte 20. I detentori di Autorizzazioni negli Stati che hanno stipulato un accordo con l'NRC dovrebbero far riferimento alle regolamentazioni idonee dei loro stati. I detentori di Autorizzazioni Generali possono eliminare i rifiuti radioattivi liquidi del tipo contenuto in questo prodotto attraverso il lavello del laboratorio. I detentori di autorizzazione devono eliminare o rendere illeggibili le etichette dei contenitori vuoti di materiali radioattivi prima di eliminare i rifiuti solidi. I detentori di autorizzazioni specifiche possono eliminare piccoli quantitativi di rifiuti radioattivi liquidi del tipo utilizzato in questo prodotto attraverso il lavello del laboratorio. Fare riferimento alle regolamentazioni appropriate applicabili al Vostro laboratorio.

Materiali forniti

Antisiero Glucagone (GND1)

Antisiero glucagone di coniglio liofilo, con conservanti. Ricostituire con l'aggiunta di **10 mL** di acqua distillata. Mescolare capovolgendo la provetta. Stabile a 2–8°C per 30 giorni dopo la ricostituzione. Colore: blu.

KGND1: 1 flacone

Glucagone marcato con I¹²⁵ (GND2)

Glucagone liofilo, umano sintetico ed iodinato, con conservanti. Prima del dosaggio, ricostituire aggiungendo **10 mL** di acqua distillata. Mescolare capovolgendo. Stabile a 2–8°C per 30 giorni dopo la ricostituzione.

KGND1: 1 flacone

Glucagone Calibratore Zero (GND3)

Calibratore zero liofilo in una matrice a base proteica, con conservanti. *Almeno 30 minuti prima dell'utilizzo*, ricostituire ciascun flacone con **10 mL** di acqua distillata. Mescolare capovolgendo il

flacone. Stabile a 2–8°C per 30 giorni dopo la ricostituzione o per 2 mesi (aliquotato) a –20°C.

KGND1: 2 flaconi

Glucagone Calibratore F (GND8)

Un calibratore liofilo contenente glucagone umano sintetico in una matrice a base proteica, con conservanti. *Almeno 30 minuti prima dell'utilizzo*, ricostituire ciascun flacone con **2,0 mL** di acqua distillata o deionizzata. Utilizzare una pipetta volumetrica e mescolare capovolgendo. *Eliminare dopo l'utilizzo*.

KGND1: 3 flaconi

Il calibratore F ha un valore *lotto-specifico* di circa 500 picogrammi di glucagone sintetico umano per millilitro (pg/mL); equivalenti a 144 picomoli per litro (pmol/L). Fare riferimento alle etichette delle provette per i valori esatti in pg/mL. Il dosaggio è standardizzato in termini di WHO Standard Internazionale per il Glucagone, numero 69/194.

Soluzione Precipitante (GNRG)

110 mL di Soluzione Precipitante composta da gamma globulina di capra anti-coniglio (GARGG) diluire il polietilene glicole (PEG) nella soluzione salina, con gentamicina come conservante. La Soluzione Precipitante viene fornita in forma liquida, pronta all'uso. Togliere il foglio di alluminio completamente e conservare refrigerato: Stabili a 2–8°C per 30 giorni dopo l'apertura. Poiché può formarsi un sottile strato di precipitato (visibile) dopo la refrigerazione, la Soluzione Precipitante deve essere mescolata completamente prima dell'uso, *facendo attenzione alla formazione di schiuma. Colore: Rosso.

KGND1: 1 flacone

Controlli Glucagone (GNCO1, GNCO2)

Due flaconi, etichettati Controllo Glucagone 1 e 2, contenenti glucagone umano sintetico in una matrice a base proteica, con conservanti. I controlli sono forniti liofilati. *Almeno 30 minuti prima dell'utilizzo*, ricostituire ciascun flacone con **1,0 mL** di acqua distillata. Utilizzare una pipetta volumetrica e mescolare capovolgendo. *Eliminare dopo l'uso*. Fare riferimento alla metodica dei controlli per i valori di glucagone in pg/mL.

KGND1: 3 set.

Materiali Richiesti Ma Non Forniti

Gamma counter

Centrifuga – refrigerata ad almeno 1500xg.

Vortex mixer

Preparazione dei Reagenti

Acqua distillata o deionizzata.

Pipette per la dispensazione di 5,0 mL e 10 mL

Pipetta volumetrica da 1,0 mL

Radioimmunosaggio

Provette semplici *di vetro* da 12x75 mm – disponibili da DPC. Le provette devono essere di vetro borosilicato ad elevata qualità. Poiché il glucagone ha la tendenza ad assorbire le superfici di plastica, occorre utilizzare provette di vetro (piuttosto che di plastica).

Micropipette – 50 µL, 100 µL, 200 µL, 500 µL e 1,0 mL. Si consiglia l'utilizzo di un dispensatore a ripetizione per l'aggiunta di 100 µL. Si consiglia l'utilizzo di un dispensatore accurato entro $\pm 0,05$ mL per l'aggiunta di 1,0 mL di Soluzione Precipitante.

Parafilm

Foam per la decantazione delle provette – disponibile presso DPC

Carta per grafici logit-log– disponibile presso DPC (Codice: ZP797)

Prelievo dei Campioni

Non è necessario che il paziente sia a digiuno, non sono necessarie preparazioni particolari. Prelevare i campioni di sangue²⁷ in provette EDTA *gelate*, annotando l'ora del prelievo. Le provette devono essere immerse in un bagnetto ghiacciato a 2–8°C lungo tutto il processo di prelievo e manipolazione del campione.

Subito dopo il prelievo, aggiungere 5 000 Unità Inattivanti di Callicreina (KIU) per 10 mL di sangue intero, sotto forma di Trasilol (500 µL) o Aprotinina (1 mg). Mescolare completamente e mantenere refrigerato fino alla separazione.

Separare il plasma dalle cellule attraverso centrifugazione in una centrifuga *refrigerata*. Aspirare il plasma con una

pipetta di vetro Pasteur, quindi trasferirlo in una provetta di *vetro* e congelarlo immediatamente. Aliquotare se necessario.

La lipemia può interferire nel dosaggio. Si consiglia l'utilizzo di un'ultracentrifuga per schiarire i campioni lipemici.

I campioni emolizzati possono indicare un trattamento non idoneo del campione prima dell'arrivo al laboratorio; per questo motivo, i risultati devono essere interpretati con prudenza.

Provette per il prelievo di sangue di produttori diversi possono dare valori differenti, a seconda dei materiali e degli additivi usati, incluso gel o barriere fisiche, attivatori di coaguli e/o anticoagulanti. L'Double Antibody Glucagone non è stato verificato con tutte le possibili variazioni di tipi di provette.

Volume Richiesto: 200 µL di plasma EDTA per provetta.

Conservazione: *Attenzione:* non utilizzare provette o pipette di plastica per la preparazione dei campioni. Mantenere i campioni refrigerati sempre e lontani dalla luce diretta. Scongelo e ricongelamento o un'esposizione prolungata a temperatura ambiente (15–28°C) possono generare valori di glucagone più bassi.

Dosaggio Radioimmunologico

Tutti i componenti ad eccezione della Soluzione Precipitante devono essere a temperatura ambiente (15–28°C) prima dell'utilizzo.

Attenzione: A causa della tendenza del glucagone ad assorbire le superfici di plastica, occorre utilizzare provette di vetro. (l'utilizzo di provette di plastica potrebbe provocare la perdita della possibilità di rilevare il glucagone.)

- 1 Prima del dosaggio, diluire il Calibratore F da 500 pg/mL nel Calibratore Zero utilizzando provette o flaconi di vetro. Vortexare ciascuna diluizione completamente. Eliminare i calibratori dopo l'utilizzo.

Aggiungere questo...		A questo...		Ottenendo questo Calibratore		
μL	Calib.	μL	Calib.		pg/mL	pmol/L
50	Calib. F	950	Zero	B	25	7
100	Calib. F	900	Zero	C	50	14
200	Calib. F	800	Zero	D	100	29
500	Calib. F	500	Zero	E	250	72

- 2** Etichettare sedici provette di vetro in duplicato: T (conte totali), **NSB** (legame non Specifico), A (Legame Massimo) e dalla B alla F. Etichettare altre provette, anch'esse in duplicato, per i campioni di plasma ed i controlli.

Calibratori	Circa pg/mL	Circa pmol/L
A (MB)	0	0
B	25	7
C	50	14
D	100	29
E	250	72
F	500	144

Nota: I valori di questi calibratori sono *lotto-specifici*. Fare riferimento alle etichette delle provette per i valori esatti in pg/mL.

- 3** Dispensare **200 μL** del calibratore zero nelle provette **NSB** ed A, e **200 μL** di ciascuno dei calibratori rimanenti dal B alla F nelle provette etichettate in maniera corrispondente. Dispensare **200 μL** di ciascun campione di plasma e di ciascun controllo nelle provette preparate.
- Si consiglia di utilizzare un puntale monouso, cambiando il puntale tra un campione e l'altro, per evitare la contaminazione da carryover.
- Campioni con concentrazioni attese di glucagone superiori al calibratore più alto (calibratore F, 500 pg/mL) devono essere diluiti nel calibratore zero prima del dosaggio.
- 4** Aggiungere **100 μL** di Antisiero Glucagone (BLUE) a tutte le provette ad eccezione delle provette **NSB** e T. Vortexare.
- Si consiglia un dispensatore a ripetizione per questo passaggio e per l'aggiunta del tracciante al punto 6.
- 5** Coprire il rack ed incubare per **24 ore a 2–8°C**.

Coprire i rack con Parafilm o collocarli in buste di plastica per evitare l'evaporazione.

- 6** Aggiungere **100 μL** di Glucagone marcato con ^{125}I (CHIARO) a tutte le provette. Vortexare.
- Eliminare le provette T per le conte al punto 11; Non sono necessari ulteriori passaggi.
- 7** Coprire il rack ed incubare per **24 ore a 2–8°C**.
- Coprire tutto il rack con Parafilm o collocare i rack in confezioni di plastica per evitare l'evaporazione.
- 8** Aggiungere **1,0 mL** di Soluzione Precipitante *fredda* (ROSSO) a tutte le provette. Vortexare.
- Per l'aggiunta dei 1,0 mL di reagente, può essere utilizzato un dispensatore a ripetizione.
- 9** Centrifugare per **15 minuti** a 1500xg.
- 10** Utilizzando un foam per la decantazione, decantare (o aspirare) il supernatante, lasciando il precipitato per le conte.
- Lasciar le provette capovolte su carta assorbente per 10 minuti, quindi tamponarle e blottarne i bordi per rimuovere le goccioline residue.
- 11** Contare ciascuna provetta per **1 minuto**.

Calcolo dei Risultati

Per ottenere i risultati in termini di concentrazione da una rappresentazione logit-log della curva di calibrazione, calcolare inizialmente per ogni coppia di provette le conte medie al minuto corrette con **NSB**:

Conte Nette = (Media dei CPM) Meno (Media CPM **NSB**)

Quindi determinare il legame di ogni coppia di provette come percentuale del legame massimo (MB), con le conte corrette-**NSB** delle provette A prese al 100%:

Percentuale di Legato = (Conte Nette / Conte Nette **MB**) $\times$ 100

(Il calcolo può essere semplificato omettendo la correzione per il legame non specifico; i campioni entro il range dei

calibratori danno virtualmente gli stessi risultati quando la Percentuale di Legato viene calcolata direttamente dai CPM Medi).

Utilizzando la carta logit-log, tracciare la Percentuale di Legato sull'asse verticale (probabilità) verso la Concentrazione sull'asse orizzontale (logaritmica) per ciascuno dei calibratori non zero e tracciare una linea retta approssimativamente lungo il tracciato di questi punti. I risultati per i campioni non noti possono essere letti dalla retta attraverso interpolazione.

Si consiglia di visionare i risultati per stabilire la correlazione entro i replicati e tracciare un grafico della curva di calibrazione (anche se i calcoli vengono effettuati dal computer) per visualizzare l'appropriatezza della trasformazione utilizzata e per individuare i punti devianti all'interno della calibrazione. Consigliamo anche di mantenere una rintracciabilità dei parametri utilizzati per la riduzione dei dati:

$T = \text{Conte Totali} (\text{conte al minuto})$

$\%NSB = 100 \times (\text{Conte NSB Medie} / \text{Conte Totali})$

$\%MB = 100 \times (\text{Conte Nette} / \text{Conte Totali})$

E le "intercette" al 20, 50 ed 80%, dove
20% = Concentrazione al 20% di Legato ecc.

Nota: sono accettabili anche altri tipi di approccio, quali: l'implementazione della logistica a 4 parametri. Vedi Dudley Ra et al. Guidelines for immunoassay data Reduction. Clin Chem 1985;31:1264-71.

Seduta Esemplificativa: a solo scopo illustrativo e non per calcolare i risultati di un'altra seduta. I valori dei calibratori sono *lotto-specifici*, le concentrazioni elencate nella colonna più a destra possono non essere in linea con i valori dei calibratori forniti nel kit. (vedi tabella "Example Run").

Controllo di Qualità

I controlli Glucagone forniti con il kit devono essere utilizzati come materiale per il controllo di qualità per monitorare le prestazioni del dosaggio.

Riportare i risultati dei pazienti solo se i risultati dei controlli sono conformi ai criteri di accettabilità del Vostro laboratorio.

Si consiglia per ogni dosaggio di annotare i numeri di lotto dei componenti utilizzati, le date di ricostituzione o di apertura. Si consiglia anche di tracciare i grafici dei risultati dei controlli giorno dopo giorno – come descritto, ad esempio, in Westgard JO, et al. A multi-rule chart for quality control. Clin Chem 1981;27:493-501. Campioni ripetuti possono servire come ulteriore strumento per monitorare la precisione inter-dosaggio; coppie di campioni intervallate lungo tutto il dosaggio possono essere d'aiuto nel verificare l'assenza di deviazioni significative.

Centrifugazione: la procedura richiede una centrifugazione a 1500xg per 15 minuti. Una centrifuga refrigerata ad alta velocità è auspicabile, ma non essenziale. Utilizzare le formule sottostanti per calcolare l'accelerazione della centrifuga ad una data velocità, o la velocità (in rivoluzioni per minuto) richiesta per raggiungere una data forza g:

$\text{forza g} = 28,38 \times (\text{rpm} / 1\,000)^2 \times \text{raggio [pollici]}$

$\text{rpm} = 187,7 \times \sqrt{(\text{forza g} / \text{raggio [pollici]})}$

o

$\text{forza g} = 11,18 \times (\text{rpm} / 1\,000)^2 \times \text{raggio [cm]}$

$\text{rpm} = 299,1 \times \sqrt{(\text{forza g} / \text{raggio [cm]})}$

Valori Attesi

E' stato effettuato uno studio sui range di riferimento nel quale campioni di plasma provenienti da 51 volontari di laboratorio sono stati dosati con il dosaggio Doppio Anticorpo Glucagone. Questo studio ha prodotto una mediana di 112 pg/mL (32 pmol/L) ed un range – corrispondente al range centrale al 95% delle osservazioni - di

59 – 177 pg/mL (17 – 51 pmol/L)

I laboratori devono considerare questi risultati *soltanto come linee guida*. Ogni laboratorio dovrebbe stabilire i propri range di riferimento.

Limiti

Nel monitoraggio di un paziente per i livelli di glucagone, occorre stabilire i livelli di base per quel paziente utilizzando lo stesso sistema di dosaggio, poiché sono state osservate differenze nei valori di glucagone misurati da dosaggi diversi.

Prestazioni del Dosaggio

Vedi Tabelle e Grafici per dati rappresentativi delle prestazioni del Dosaggio Doppio Anticorpo Glucagone. I risultati sono espressi in pg/mL.

Fattore di Conversione:

pg/mL $\times$ 0,2872 $\rightarrow$ pmol/L

Range di Calibrazione: 25 – 500 pg/mL (WHO IS 69/194)

I valori dei calibratori sono *lotto-specifici*.

Sensibilità Analitica: 13 pg/mL (3,7 pmol/L),

Precisione Intra-Dosaggio (All'interno della stessa seduta): Sono state calcolate statistiche per ciascuno dei tre campioni dai risultati di 20 coppie di provette in un unico dosaggio. (Vedi tabella "Intraassay Precision".)

Precisione Inter-Dosaggio (Da una seduta all'altra): Sono state calcolate statistiche per ciascuno dei tre campioni dai risultati di coppie di provette in 20 sedute differenti. (Vedi tabella "Interassay Precision".)

Effetto Fine-Seduta: Nessuno fino a circa 180 provette. (Vedi tabella "End-of-Run".)

Specificità: La percentuale di crossreattività è stata calcolata per il glucagone intatto, i frammenti di glucagone ed i composti ad essi relativi su base peso-peso. La tabella mostra che il Glucagone Doppio Anticorpo è altamente specifico per il glucagone. (Vedi tabella "Specificity".)

Bilirubina: La presenza di bilirubina in concentrazioni fino a 200 mg/L non ha nessun effetto sui risultati entro il range di precisione del dosaggio.

Emolisi: La presenza di globuli rossi impaccati in concentrazioni fino a 30 μ L/mL non ha effetto sui risultati entro il range di precisione del dosaggio.

Linearità: I campioni sono stati dosati a varie diluizioni. (Vedi tabella "Linearity".)

Effetto della Conservazione in Provette di Plastica o di Vetro:

per determinare l'effetto provocato dalla conservazione di campioni in provette di plastica e di vetro, il sangue è stato prelevato da 10 volontari in provette EDTA e diluito con aprotinina ad una concentrazione di un grammo di aprotinina per litro (1,0 g/L). Il plasma è stato aliquotato in provette di vetro e di

plastica, che sono state congelate per 5 giorni. Tutti i campioni sono stati quindi dosati con il dosaggio Doppio Anticorpo Glucagone, con i seguenti risultati.

(Plastica) = 0,87 (Vetro) – 6,0 pg/mL
 $r = 0,98$

Valore medio:
57 pg/mL (Plastica)
72 pg/mL (Vetro)

I valori ottenuti da aliquote conservate in provette di plastica erano significativamente inferiori rispetto ai valori ottenuti per le aliquote conservate in provette di vetro. Sulla base di questo studio, si consiglia di conservare i campioni in provette di vetro.

Effetto dell'Aprotinina: per determinare l'effetto dell'aprotinina sulla stabilità dei campioni, sono stati prelevati due set di 12 campioni di plasma EDTA prelevati da 12 volontari. Un set è stato diluito con aprotinina (1,0 g/L). Tutti i campioni sono stati dosati con il dosaggio Doppio Anticorpo Glucagone. Mediante regressione lineare:

(Senza Aprotinina) =
1,07 (Con Aprotinina) + 52 pg/mL
 $r = 0,77$

Valore medio:
111 pg/mL (Senza Aprotinina)
55 pg/mL (Con Aprotinina)

L'analisi mostra che i risultati sono più elevati senza aprotinina, presumibilmente a causa dei frammenti di glucagone che crossreagiscono aumentando la degradazione proteolitica. Ciò conferma la necessità di stabilizzare i campioni aggiungendo aprotinina, come indicato nella sezione Prelievo dei Campioni.

Comparazione di Metodi: Il Dosaggio DPC Doppio Anticorpo Glucagone è stato comparato ad un altro dosaggio disponibile in commercio per il glucagone (Kit A) su 20 campioni. I risultati DPC erano generalmente inferiori ai risultati per il Kit A. Mediante regressione lineare:

(DPC) = 0,015 (Kit A) + 142 pg/mL
 $r = 0,051$

Valore medio:
145 pg/mL (DPC)
251 pg/mL (Kit A)

I due kit differiscono nei loro valori attesi; il valore superiore del range di riferimento per il kit DPC è 130 pg/mL, ma 250 pg/mL per il Kit A.

Le differenze nei range di riferimento sono in realtà un dato comune degli immunodosaggi che utilizzano anticorpi diversi ed analiti eterogenei. Ciò può essere d'aiuto nella spiegazione dei valori più bassi generati con il kit DPC; suggeriscono che il Kit A riconosce i precursori del glucagone e/o i frammenti in maniera maggiore. Questa ipotesi è avallata dalla mancanza di crossreattività del kit DPC verso il preproglucagone 72–108, preproglucagone 72–107, preproglucagone 126–159, il peptide inibitore gastrico, l'ossintomodulina, la secretina e il peptide intestinale vasoattivo (VIP). (Vedi tabella "Method Comparison").

Standardizzazione: Per verificare la standardizzazione del dosaggio Doppio Anticorpo Glucagone, lo Standard Internazionale per il Glucagone numero 69/194 del WHO, è stato diluito a concentrazioni corrispondenti ai livelli del calibratore non zero. Il calibratore zero è stato utilizzato come diluente. Queste diluizioni della preparazione del WHO insieme ad un set di calibratori DPC sono stati processati con il Dosaggio DPC Doppio Anticorpo Glucagone.

I valori di legato percentuale (%B/B₀) nella tabella confermano il parallelismo con la preparazione del WHO. I calibratori della DPC si comportano come diluizioni del materiale di riferimento. (Vedi tabella "Standardization".)

Assistenza Tecnica

All'Estero: Contattare il proprio Distributore Nazionale.

Il Sistema Qualità della Diagnostic Products Corporation è certificato secondo le norme ISO 13485:2003.

Português

Glucagon para Anticorpos Duplos

Utilização: O Glucagon para Anticorpos Duplos ¹²⁵I é um radioimunoensaio concebido para a medição quantitativa do glucagon no plasma da EDTA. Destina-se a diagnóstico *in vitro* como auxiliar de diagnóstico e tratamento de pacientes

com perturbações do metabolismo dos carboidratos, designadamente diabetes mellitus, hipoglicemia e hiperglicemia.

Números de catálogo: **KGND1** (100 tubos de ensaio)



O Kit com 100 tubos contém *Menos que 2 microcuries (74 quilibecquerels) de glucagon ¹²⁵I* radioactivo.

Resumo e explicação do teste

O Glucagon é um polipeptídeo de cadeia única de 29 aminoácidos de comprimento, produzido nas células alfa pancreáticas. Na sua acção, é geralmente, antagonista da insulina, que é secretada pelas células beta pancreáticas. Tal como a insulina, o glucagon participa na regulação dos níveis da glicose circulante; contudo, enquanto que a insulina actua tipicamente para se opor à hiperglicemia, o glucagon faz parte do sistema contrarregulatório – o qual inclui a epinefrina e vários outros factores, normalmente de *Menor* significado – destinado a defender o organismo contra a hipoglicemia.^{6,25,26} Em resposta ao aumento do uso da glicose (tal como durante períodos de exercício físico) ou à depleção causada pela insulina, o glucagon ajuda a restabelecer os níveis circulantes da glicose estimulando a sua produção no fígado.⁶

As determinações dos níveis de glucagon podem, assim, ter relevância para os pacientes com diabetes dependentes de insulina, que estejam a receber ou estejam a ser considerados para receber uma terapia intensiva à base de insulina. Nesse contexto, uma contrarregulação deficiente – caracterizada por uma deficiência *combinada* devida tanto à resposta ao glucagon como à epinefrina em decréscimos da glicose circulante – significaria um maior risco de episódios graves de hipoglicemia provocados pela insulina.^{1,4,5,6,24}

O Glucagon está estruturalmente relacionado com outros peptídeos neurohormonais, designadamente a secretina, o peptídeo intestinal vasoactivo (PIV) e o peptídeo inibidor gástrico (PIG).²² A hormona apresenta uma notável semelhança entre várias espécies, especialmente entre os mamíferos do Velho Mundo.^{7,22} A sequência de aminoácidos do glucagon humano é

idêntica à do glucagon encontrado em vacas, porcos, coelhos, ratos e hamsters (marmotas-da-Alemanha); o glucagon das cobaias, por outro lado, difere em cinco posições. Os glucagons dos perús e das galinhas diferem do glucagon humano apenas numa posição; os glucagons do pato e do jacaré em duas.

O glucagon deriva do preproglucagon, que está presente nas células alfa do pâncreas e também no intestino. Este precursor inclui um peptídeo de sinal de terminal N (resíduos -24 a -1), seguido de glicentina (resíduos 1 a 69) e aquilo a que se tem chamado o principal fragmento do proglucagon (resíduos 72 a 160). Este último inclui dois peptídeos semelhantes ao glucagon, designados GLP-1 e GLP-2. A glicentina, que também é conhecida como o glucagon do intestino e pela sua imunoreactividade semelhante à do glucagon, 1 (GLI-1), inclui o peptídeo pancreático relacionado com a glicentina (*glicentin-related pancreatic peptide*) (GRPP, glicentina-1) seguida do próprio glucagon (resíduos 33 a 61) e um hexapeptídeo. O fragmento de terminal C da glicentina, que contém glucagon e o hexapeptídeo, tem sido referido por várias designações, tal como oxintomodulina, enteroglucagon, GLI-2 e glucagon-37.²²

Enquanto que o intestino secreta principalmente a metade intacta do terminal N do preproglucagon (isto é, a glicentina) juntamente com a oxintomodulina e os fragmentos do terminal C, GLP-1 e GLP-2, o pâncreas secreta principalmente a metade intacta do terminal C (isto é, o chamado fragmento do proglucagon principal) juntamente com os fragmentos do terminal N GRPP, do glucagon e da oxintomodulina.^{2,22} Como a glicentina, que por vezes é referida como proglucagon, não é um produto secretório típico do pâncreas, poderá não ser um intermediário normal na biosíntese do glucagon.² Mesmo assim, o facto de os níveis de glucagon terem a tendência de se manterem normais em seres humanos submetidos a uma pancreatectomia total indica a existência de algum mecanismo para a transformação dos produtos intestinais em glucagon.^{2,26}

Princípio do Processo

O processo de Anticorpo Duplo do Glucagon da DPC é um radioimunoensaio sequencial. Após a pré-incubação da amostra do paciente com o anticorpo anti-glucagon, o glucagon classificado ¹²⁵I concorre com o glucagon contido na amostra para chegar aos sítios do anticorpo. Após a incubação durante um tempo fixo, a separação da fracção ligada e da livre efectua-se através do método de anticorpo duplo, e é acelerada pela solução diluída PEG, seguindo-se a centrifugação. O precipitado que contém a fracção ligada ao anticorpo é então contado, e as concentrações da amostra do paciente são lidas a partir de uma curva de calibração.

Reagentes para Pipetar: 3

Tempo de Incubação: Duas incubações de 24 horas.

Contagens Totais na Marcação com o Iodo: aproximadamente 25 000 cpm,

Separação: A Solução Precipitante pronta-a-usar combina o segundo anticorpo com a solução diluída PEG.

Avisos e Precauções

Para utilização em diagnóstico *in vitro*.

Reagentes: Conservar a 2–8°C num frigorífico destinado para materiais radioactivos. Eliminar de acordo com as leis aplicáveis.

Não utilizar reagentes com prazo de validade expirado.

Alguns componentes fornecidos com este dispositivo podem conter material de origem humana e/ou outros ingredientes potencialmente perigosos que necessitam de determinadas precauções.

Observar as precauções universalmente seguidas e manusear todos os materiais como sendo capazes de transmitir doenças infecciosas. As matérias-primas, obtidas de soro humano, foram testadas, revelando resultados negativos para a sífilis, para os anticorpos do vírus da imunodeficiência humana (HIV) 1 e 2, para o antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg) e para os anticorpos do vírus da hepatite C.

Azida de sódio foi adicionada como conservante; para evitar acumulações de

azidas metálicas explosivas em canalizações de cobre e chumbo, os reagentes devem ser eliminados no esgoto apenas se estiverem diluídos e forem lavados com grandes quantidades de água.

Água: Utilizar água destilada ou desionizada.

Radioatividade

Uma cópia da licença de uso de produtos radioactivos (específica ou genérica) emitida para o cliente norte-americano, deve estar em poder da DPC antes do envio de kits ou componentes contendo material radioactivo. Estes materiais radioactivos podem ser adquiridos por qualquer cliente que possua a necessária licença específica. Com uma licença genérica estes produtos radioactivos só podem ser adquiridos por médicos, médicos veterinários na prática de medicina veterinária, laboratórios clínicos e hospitais e exclusivamente para uso clínico *in vitro* ou testes laboratoriais não envolvendo administração externa ou interna do material radioactivo ou da sua radiação para o ser humano ou outros animais. A sua aquisição, receita, armazenamento uso, transporte e eliminação estão sujeitas aos regulamentos e à licença da Comissão de Regulação Nuclear dos EUA (NRC) ou do Estado com o qual a NRC tenha um acordo relativo ao exercício do controlo regulamentar.

Tratar os materiais radioactivos de acordo com a regulamentação da sua licença, específica ou genérica. De modo a minimizar a exposição à radiação, o utilizador deve seguir as instruções da publicação do Departamento Nacional de Normas sobre a *Utilização segura de materiais radioactivos* (Livro No. 92, publicado em Março de 1964) e publicações seguintes do Estado e Autoridades Federais.

Limpar os derrames prontamente e descontaminar as superfícies afectadas. Evitar os aerossóis. Eliminar os lixos radioactivos de acordo com a regulamentação da licença. Os titulares de licenças genéricas (titulares da licença NRC 483) podem eliminar os lixos sólidos radioactivos como lixo não radioactivo depois de remover os rótulos. Licenças Específicas (Licença NRC 313) devem ter

em conta o Capítulo 10, secção 20, do Código de Regulamentações Federais. Cada Estado deve referir a legislação em vigor aprovada para o seu território. Os titulares de licenças genéricas podem eliminar os lixos radioactivos líquidos do tipo deste produto num esgoto de laboratório. Os titulares de licenças devem remover os rótulos dos frascos vazios de materiais radioactivos antes de os eliminar como resíduos sólidos. Os titulares de licenças específicas podem eliminar pequenas quantidades de lixo radioactivo líquido do tipo utilizado neste produto no esgoto normal do laboratório. Ter em atenção as regulamentações em vigor para o seu laboratório.

Materiais Fornecidos

Antisoro de Glucagon (GND1)

O antisoro de glucagon liofilizado, criado em coelhos, com conservante. Reconstituir acrescentando **10 mL** de água destilada. Misturar por inversão *delicada*. Estável a 2–8°C durante 30 dias após a reconstituição. Cor: azul.
KGND1: 1 frasco

¹²⁵I Glucagon (GND2)

Glucagon humano sintético iodado liofilizado, com conservante. Imediatamente antes do teste, reconstituir acrescentando **10 mL** de água destilada. Misturar por inversão *delicada*. Estável a 2–8°C durante 30 dias após a reconstituição.
KGND1: 1 frasco

Calibrador Zero de Glucagon (GND3)

Calibrador zero liofilizado numa matriz de proteína, com conservante. *Pelo Menos 30 minutos antes de utilizar*, reconstituir cada frasco com **10 mL** de água destilada. Misturar por inversão *delicada*. Estável a 2–8°C durante 30 dias após a reconstituição, ou durante 2 meses (aliquotados) a –20°C.
KGND1: 2 frascos

Calibrador de Glucagon F (GND8)

Calibrador liofilizado contendo glucagon humano sintético numa matriz de proteína, com conservante. *Pelo Menos 30 minutos antes de utilizar*, reconstituir cada frasco com **2,0 mL** de água destilada ou desionizada. Utilizar uma pipeta volumétrica e misturar por inversão

delicada. *Descartar depois de usar.*

KGND1: 3 frascos

O calibrador F tem um valor *específico de lote* de aproximadamente 500 picogramas de glucagon humano sintético por mililitro (pg/ml); equivalente a 144 picomoles por litro (pmol/l). Ver as etiquetas dos frascos para valores exactos em pg/ml. O teste é normalizado em termos da Norma Internacional da Organização Mundial da Saúde Relativa ao Glucagon, número 69/194.

Solução Precipitante (GNRG)

110 mL de Solução Precipitante consistindo da globulina gama de cabra anti-coelho (*goat anti-rabbit gamma globulin*) (GARGG) e glicol de polietileno (*dilute polyethylene glycol*) (PEG) diluído em solução salina, com gentamicina como conservante. A Solução Precipitante é apresentada sob forma líquida, pronta a usar. Remover completamente o invólucro hermético de folha de alumínio e conservar em local refrigerado: Estável a 2–8°C durante 30 dias depois de aberto. Visto que pode formar-se um precipitado fino (mas visível) após a refrigeração, a Solução Precipitante deve ser bem misturada antes de ser utilizada, sem que se deixe formar espuma. Cor: Vermelho.

KGND1: 1 frasco

Controlos de Glucagon (GNCO1, GNCO2)

Dois frascos, etiquetados Controlo de Glucagon 1 e 2, contendo glucagon humano sintético numa matriz de proteína, com conservante. Os controlos são fornecidos liofilizados. *Pelo Menos 30 minutos antes de utilizar*, reconstituir cada frasco com **1,0 mL** de água destilada. Utilizar uma pipeta volumétrica e misturar por inversão delicada. Eliminar *depois de usar*. Consultar o folheto que acompanha a embalagem para ver os valores do glucagon em pg/mL.

KGND1: 3 conjuntos.

Materiais necessários mas não fornecidos

Contador Gama

Centrifugadora – refrigerada e com capacidade para pelo *Menos* 1500xg

Misturador Vortex

Preparação do reagente

Água destilada ou desionizada

Pipetas de medição, 5,0 mL e 10 mL

Pipeta volumétrica: 1,0 mL

Radioimunoensaio

Tubos de *vidro* simples de 12x75 mm – distribuídos pela DPC. Os tubos de ensaio devem ser de vidro de borosilicato de alta qualidade. Devido à tendência do glucagon de ser absorvido em superfícies de plástico, devem ser utilizados tubos de vidro (em vez de tubos de plástico) no ensaio.

Minipipetas – de 50 µL, 100 µL, 200 µL, 500 µL e 1,0 mL. Para as adições de 100 µL é recomendada uma pipeta de repetição fiável. É recomendada uma pipeta tipo seringa com uma precisão de até ±0.05 mL para a adição de 1,0 mL de Solução Precipitante.

Parafilm

Espuma de decantação – disponível na DPC

Papel logarítmico – disponível na DPC (Número de catálogo: ZP797)

Recolha da amostra

O paciente não necessita de estar em jejum. Não são necessárias preparações especiais. Colher o sangue por meio de venipunção²⁷ em tubos de plasma com EDTA *congelados*, anotando a hora da colheita. Os tubos devem ser mantidos mergulhados num banho de gelo a 2–8°C durante todo o processo de colheita e manipulação.

Imediatamente a seguir à colheita, acrescentar 5 000 Unidades de Inativação Kallikrein (*Kallikrein Inactivating Units*) (KIU) por 10 mL de sangue total, sob a forma de Trasylol (500 µL) ou Aprotinin (1 mg). Misturar bem e manter refrigerado até à separação.

Separar o plasma das células por meio de centrifugação numa centrifugadora *refrigerada*. Aspirar o plasma com uma pipeta Pasteur de vidro e, em seguida, transferi-lo para um tubo de vidro e congelá-lo imediatamente. Aliquotar, se necessário.

A lipemia pode interferir no teste.

Recomenda-se o uso de uma ultra

centrífuga para clarear amostras lipémicas.

Amostras hemolisadas podem indicar tratamento incorrecto de uma amostra antes do envio para o laboratório; portanto os resultados devem ser interpretados com cuidado.

Os tubos para colheita sanguínea de diferentes fabricantes, podem originar diferentes valores, dependendo dos materiais e aditivos, incluindo gel ou barreiras físicas, activadores do coágulo e/ou anti coagulantes. Double Antibody Glucagon não foram ainda testados com todas as possíveis variações originadas pelos tipos de tubos.

Volume de Amostra: 200 µL de plasma com EDTA por tubo.

Conservação: *Atenção:* Não utilizar tubos ou pipetas de plástico em nenhuma porção da preparação. Manter as amostras permanentemente refrigeradas e ao abrigo da luz directa. O descongelamento e a recongelção, ou a exposição prolongada à temperatura ambiente (15–28°C), pode resultar em valores de glucagon significativamente *Menores*.

Procedimento do radioimunoensaio

Todos os componentes, excepto a Solução Precipitante devem ser mantidos à temperatura ambiente (15–28°C) antes de serem utilizados.

Atenção: Devido à tendência do glucagon de ser absorvido em superfícies de plástico, devem ser empregues tubos de vidro (em vez de tubos de plástico) no teste. (A utilização de tubos de plástico pode resultar na perda de todo o glucagon detectável).

- 1 Imediatamente antes do teste, diluir o Calibrador de Glucagon F 500 pg/mL no Calibrador de Glucagon Zero, utilizando tubos de ensaio *de vidro* ou frascos *de vidro*, conforme descrito no quadro abaixo. Misturar no Vortex cada diluição.

Acrescentar isto...		A isto...		Obtendo este calibrador		
µL	Calib.	µL	Calib.	pg/mL	pmol/L	
50	Calib. F	950	Zero	B	25	7
100	Calib. F	900	Zero	C	50	14
200	Calib. F	800	Zero	D	100	29
500	Calib. F	500	Zero	E	250	72

- 2 Rotular dezasseis tubos de vidro em duplicado: T (contagem total), **NSB** (Ligação Não Específica) (*nonspecific binding*), A (ligação máxima) e B a F. Rotular outros tubos, também em duplicado, para as amostras de plasma e de controlos.

Calibrador	pg/mL aproximado	pmol/L aproximado
A (MB)	0	0
B	25	7
C	50	14
D	100	29
E	250	72
F	500	144

Nota: Os valores dos calibradores são específicos dos lotes. Ver as etiquetas dos frascos para os valores exactos em pg/mL.

- 3 Pipetar **200 µL** do calibrador zero A nos tubos **NSB** e A, e **200 µL** de cada um dos restantes calibradores, B a F, nos tubos rotulados com a letra correspondente. Pipetar **200 µL** de cada amostra de plasma do paciente e de cada controlo nos tubos preparados.

É boa prática usar uma pipeta de ponta descartável, mudando a ponta entre as amostras de modo a evitar contaminação.

As amostras que se preveja conterem concentrações de glucagon superiores à do calibrador de valor mais elevado (calibrador F, 500 pg/mL) devem ser diluídas no calibrador zero antes do ensaio.

- 4 Adicionar **100 µL** de Antisoro de Glucagon (AZUL) em todos os tubos, excepto nos tubos **NSB** e T. Misturar no Vortex.

É recomendado um conta-gotas de repetição para esta etapa e para a adição do traçador, na etapa 6.

- 5 Cobrir o tabuleiro e incubar durante **24 horas a 2–8°C**.
Cobrir o tabuleiro inteiro com Parafilm ou colocar os tabuleiros em sacos de plástico para evitar a evaporação.
- 6 Adicionar **100 µL** de Glucagon ¹²⁵I (TRANSPARENTE) em todos os tubos. Misturar no Vortex.
Remover os tubos T para a contagem na fase 11. Não necessitam de mais processamento.
- 7 Cobrir o tabuleiro e incubar durante **24 horas a 2–8°C**.
Cobrir o tabuleiro inteiro com Parafilm ou colocar os tabuleiros em sacos de plástico para evitar a evaporação.
- 8 Adicionar **1,0 mL** de Solução Precipitante (VERMELHA) *fria* em todos os tubos. Misturar no Vortex.
Para a adição do reagente de 1,0 mL, pode ser usada uma pipeta de repetição.
- 9 Centrifugar durante **15 minutos a 1500xg**.
- 10 Com um tabuleiro de espuma de decantação, decantar (ou aspirar) o sobrenadante, retendo o precipitado para contagem.
Deixar os tubos invertidos sobre papel absorvente durante 10 minutos. Em seguida, aplicar pancadinhas ligeiras nos tubos e limpar as bordas para remover quaisquer resíduos de gotas.
- 11 Contar cada tubo durante **1 minuto**.

Cálculo dos Resultados

Para obter resultados de concentrações numa representação logit-log da curva de calibração, deve-se em primeiro lugar calcular para cada par de tubos a média de contagens **NSB** por minuto corrigidas:

Contagens reais = (Média CPM) minutos (Média **NSB** CPM)

A seguir, determine a ligação de cada par de tubos como percentagem de ligação máxima (MB), com as contagens **NSB** corrigidas dos tubos A tidas como 100%:

Percentagem de Ligação = (Contagens reais / Contagens **MB** reais) × 100

(O cálculo pode ser simplificado omitindo a correcção para a ligação não específica;

amostras dentro da gama de calibração originam virtualmente os mesmos resultados quando a Percentagem de Ligação é calculada directamente da Média de CPM.).

Utilizando um papel milimétrico logit-log, representar a Percentagem de Ligação no eixo vertical (probabilidade) contra a Concentração no eixo horizontal (logaritmico) para cada um dos calibradores diferentes de zero, e representar uma linha recta em função da trajectória destes pontos. Resultados de amostras desconhecidas podem então ser lidos nessa recta por interpolação.

É boa prática verificar os resultados pela concordância entre as réplicas e construir um gráfico da curva de calibração (mesmo que os cálculos sejam efectuados por computador), para verificação visual da aplicabilidade da transformação usada e como forma de detectar pontos de calibração que se afastem. Também se recomenda guardar estas curvas:

T = Contagens Totais (como contagens por minuto)

%NSB = 100 × (Média Contagens NSB / Contagens Totais)

%MB = 100 × (Contagens reais / Contagens Totais)

E os 20, 50 e 80 por cento "intercep," onde

20% = Concentração a 20 por cento de Ligação, etc.

Notar que outras abordagens, como a implementação de uma logística de 4 parâmetros, também são aceitáveis. Ver Dudley RA, et al. Guidelines for immunoassay data reduction. Clin Chem 1985;31:1264-71.

Exemplo de ciclo: Apenas para ilustração, não para calcular resultados de outro ensaio. Porque os valores dos calibradores são *específicos do lote*, as concentrações listadas na coluna mais à direita podem não corresponder aos valores dos calibradores fornecidos com o dispositivo fornecido na sua encomenda. (Ver tabela "Exemplo de ciclo".)

Controlo de Qualidade

O(s) controlo(s) de Glucagon fornecidos com o kit devem ser utilizados como

material de controlo de qualidade, para monitorizar o desempenho do ensaio.

Os resultados dos pacientes devem apenas ser reportados se os resultados dos controlos para este ensaio estiverem dentro dos critérios de aceitação estabelecidos pelo laboratório.

É boa prática laboratorial registar para cada ensaio o número do lote dos componentes usados, bem como as datas de quando foram primeiro reconstituídos ou abertos. Recomenda-se registar os valores diários em gráfico – como descrito, por exemplo, in Westgard JO, et al. A multi-rule chart for quality control. Clin Chem 1981;27:493-501. Notar que amostras repetidas podem servir como ferramenta adicional para monitorizar a precisão inter-ensaio, e que pares de controlos podem ser colocados ao longo do ensaio para ajudar a verificar a ausência de variação significativa.

Centrifugação: O processo exige centrifugação a 1500×g durante 15 minutos. É desejável, mas não essencial, que seja usada uma centrifugadora de alta velocidade refrigerada. Empregar as fórmulas indicadas abaixo para calcular a aceleração da centrifugadora que estiver a ser usada, a uma determinada velocidade, ou à velocidade (rotações por minuto) necessária para atingir a força g desejada.

$\text{força g} = 28,38 \times (\text{rpm} / 1\,000)^2 \times \text{raio [em polegadas]}$

$\text{rpm} = 187,7 \times \sqrt{(\text{força g} / \text{raio [polegadas]})}$

ou

$\text{força g} = 11,18 \times (\text{rpm} / 1\,000)^2 \times \text{raio [em cm]}$

$\text{rpm} = 299,1 \times \sqrt{(\text{força g} / \text{raio [cm]})}$

Valores de Referência

Foi realizada uma operação de obtenção do intervalo de referência em que as amostras de plasma de 51 laboratórios voluntários foram testadas pelo processo de Glucagon de Anticorpo Duplo. Este estudo resultou numa média de 112 pg/mL (32 pmol/L) e num intervalo – correspondente às 95% observações centrais realizadas – de

59 – 177 pg/mL (17 – 51 pmol/L)

Os laboratórios devem considerar estes resultados *como directrizes apenas*. Cada

laboratório deve estabelecer os seus próprios valores de referência.

Limitações

Ao monitorizar-se um paciente para analisar os níveis de glucagon, devem ser estabelecidos valores de referência (de linha de base) relativos a esse paciente, utilizando o mesmo sistema de teste, visto terem sido observadas diferenças nos valores de glucagon medidos por diferentes ensaios.

Características do Ensaio

Ver em Tabelas e Gráficos os dados representativos do desempenho do kit do processo de Anticorpo Duplo. Os resultados são expressos em pg/mL.

Factor de conversão:

$\text{pg/mL} \times 0,2872 \rightarrow \text{pmol/L}$

Calibração: 25 – 500 pg/mL

(A Norma da OMS é 69/194)

Os valores do calibrador são *específicos do lote*.

Sensibilidade Analítica: 13 pg/mL

(3,7 pmol/L)

Precisão Intra-ensaio (no mesmo ciclo):

As estatísticas foram calculadas para as amostras a partir dos resultados de 20 pares de tubos num único ensaio. (Ver a tabela "Precisão intra-ensaio").

Precisão Inter-ensaio (ciclo a ciclo):

As estatísticas foram calculadas para as amostras a partir dos resultados de 20 pares de tubos em 20 ensaios diferentes. (Consulte a tabela "Precisão intra-ensaio".)

Efeito fim-de-ciclo: Nenhum, até aproximadamente 180 tubos. (Ver a tabela de "Efeito fim de ciclo".)

Especificidade: A percentagem de reactividade cruzada foi calculada para o glucagon intacto, para fragmentos de glucagon e para compostos afins de acordo com o peso de cada um; a tabela mostra que o Glucagon de Anticorpo Duplo é altamente específico para o glucagon. (Ver a tabela "Especificidade").

Bilirrubina: A presença de bilirrubina em concentrações até 200 mg/L não tem efeito em resultados, dentro da precisão do ensaio.

Hemólise: A Presença de eritrocitos em concentrações de até 30 µL/mL não tem efeito no resultado, dentro da precisão do ensaio.

Linearidade: As amostras foram doseadas sob várias diluições. (Ver a tabela "Linearidade").

Efeito da conservação em tubos de plástico e de vidro: Para se determinar o efeito da conservação das amostras dos pacientes em tubos de plástico e de vidro, foi colhido sangue de 10 voluntários em tubos de plasma com EDTA e as amostras foram fortificadas com aprotinina até uma concentração de um grama de aprotinina por litro (1,0 g/L). O plasma foi aliquoteado em tubos de vidro e de plástico, que foram mantidos congelados durante 5 dias. Todas as amostras foram ensaiadas com o processo de Glucagon de Anticorpo Duplo, com os seguintes resultados:

(Plástico) = 0,87 (Vidro) – 6,0 pg/mL
 $r = 0,98$

Médias:
57 pg/mL (Plástico)
72 pg/mL (Vidro)

Os valores obtidos pelas aliquotas conservadas em tubos de plástico apresentaram-se consistentemente mais baixos do que os valores correspondentes das aliquotas conservadas em tubos de vidro. Com base neste estudo, recomenda-se que as amostras dos pacientes sejam conservadas em tubos de vidro.

Efeito da aprotinina: Para determinar o efeito da aprotinina na estabilidade das amostras dos pacientes, foram colhidos dois conjuntos de amostras de plasma com EDTA de 12 voluntários. Um conjunto foi fortificado com aprotinina (1,0 g/L).

Depois, todas as amostras foram ensaiadas pelo processo de Anticorpo Duplo do Glucagon. Regressão linear:

(Sem Aprotinina) =
1,07 (Com Aprotinina) + 52 pg/mL
 $r = 0,77$

Médias:
111 pg/mL (Sem Aprotinina)
55 pg/mL (Com Aprotinina)

A análise mostra que os resultados são superiores na ausência da aprotinina, presumivelmente devido à reação cruzada dos fragmentos de glucagon resultantes da degradação proteolítica.

Isso confirma a necessidade de estabilizar as amostras adicionando aprotinina, conforme referido na secção Recolha da Amostra.

Comparação de Métodos: O método do kit de Glucagon de Anticorpo Duplo da DPC foi comparado a outro ensaio de glucagon (kit A) comercialmente à venda, em que são utilizadas 20 amostras. Os resultados do ensaio da DPC foram na generalidade mais baixos do que os resultados do ensaio do Kit A. Regressão linear:

(DPC) = 0,015 (Kit A) + 142 pg/mL
 $r = 0,051$

Médias:
145 pg/mL (DPC)
251 pg/mL (Kit A)

Do mesmo modo, os dois kits diferem nos seus valores esperados; o limite superior do intervalo de referência relativo ao kit da DPC é de 130 pg/ml, enquanto que o do kit A é de 250 pg/ml.

As diferenças no intervalo de referência são, na realidade, uma característica comum dos imunoensaios que empregam diferentes anticorpos e elementos analíticos heterogêneos. Isso poderá explicar os valores mais baixos gerados pelo kit da DPC; esses valores sugerem que o Kit A reconhece os precursores e/ou os fragmentos do glucagon dentro de uma maior medida. Esta hipótese é corroborada pela demonstrada falta de reactividade cruzada do ensaio da DPC ao preproglucagon 72–108, ao preproglucagon 72–107, ao preproglucagon 126–159, ao peptídeo inibidor gástrico, à oxintomodulina, à secretina e ao peptídeo intestinal vasoactivo (PIV). (Ver o quadro "Comparação de Métodos").

Normalização: Para se verificar a conformidade do processo do Glucagon de Anticorpo Duplo, segundo a Norma Internacional da Organização Mundial da Saúde relativa ao Glucagon, número 69/194, o glucagon foi diluído até concentrações correspondentes a níveis de calibrador diferentes de zero. O calibrador zero da DPC foi usado como diluente. Estas soluções diluídas em conformidade com a preparação da OMS, juntamente com um conjunto de calibradores da DPC, foram processadas

pelo sistema de Glucagon de Anticorpo Duplo da DPC.

A percentagem da fracção ligada (%B/B₀) mostrada na tabela confirma o paralelismo relativo à preparação da OMS. Os calibradores da DPC comportam-se como diluições do material de referência. (Ver a tabela "Normalização").

Assistência Técnica

Por favor contacte o seu Distribuidor Nacional.

O Sistema de Qualidade da Diagnostic Products Corporation está registado sob ISO 13485:2003.



Diagnostic Products Corporation
Corporate Offices
5210 Pacific Concourse Drive
Los Angeles, CA 90045-6900
USA

2005-03-18

PIKGND – 4



 **EC REP** DPC Biermann GmbH
61231 Bad Nauheim
Germany
+49 -6032-994-00