



Instructions for Use

IGFBP-3 IRMA

IVD

CE

REF RIA-4732



96



DRG

DRG Instruments GmbH, Germany
Frauenbergstraße. 18, 35039 Marburg
Phone: +49 (0)6421-1700 0, Fax: +49 (0)6421-1700 50
Website: www.drg-diagnostics.de
E-mail: drg@drg-diagnostics.de



DRG

DRG International, Inc., USA
841 Mountain Ave., Springfield, NJ 07081
Phone: (973) 564-7555, Fax: (973) 564-7556
Website: www.drg-international.com
E-mail: corp@drg-international.com

Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit.
Verwenden Sie nur die jeweils gültige, im Testkit enthaltene, Gebrauchsanweisung.
Si prega di usare la versione valida delle istruzioni per l'uso a disposizione con il kit.
Por favor, se usa solo la versión válida de la metodico técnico incluido aquí en el kit.
Utilisez seulement la version valide des Instructions d'utilisation fournies avec le kit.

Table of Contents / Inhaltsverzeichnis

1	INTENDED USE.....	2
2	CLINICAL BACKGROUND	2
3	PRINCIPLES OF THE METHOD	2
4	REAGENTS PROVIDED.....	3
5	SUPPLIES NOT PROVIDED	3
6	REAGENT PREPARATION	3
7	STORAGE AND EXPIRATION DATING OF REAGENTS	3
8	SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION.....	4
9	PROCEDURE	4
10	CALCULATION OF RESULTS.....	4
11	TYPICAL DATA.....	5
12	PERFORMANCE AND LIMITATIONS	5
13	LIMITATIONS.....	6
14	INTERNAL QUALITY CONTROL.....	6
15	REFERENCE INTERVALS	6
16	PRECAUTIONS AND WARNINGS	8
17	SUMMARY OF THE PROTOCOL.....	8
1	VERWENDUNGSZWECK.....	9
2	KLINISCHER HINTERGRUND	9
3	GRUNDSÄTZLICHES ZUR DURCHFÜHRUNG	9
4	MITGELIEFERTE REAGENZIEN.....	10
5	ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL	10
6	REAGENT PREPARATION	10
7	AUFBEWAHRUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN	10
8	PROBENSAMMLUNG UND -VORBEREITUNG	11
9	DURCHFÜHRUNG	11
10	BERECHNUNG DER ERGEBNISSE	11
11	TYPISCHE WERTE	12
12	LEISTUNGSMERKMALE UND GRENZEN DER METHODIK	12
13	ANWENDUNGSGRENZEN	13
14	INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE	13
15	REFERENZ INTERVALLE	14
16	VORSICHTSMASSNAHMEN UND WARNUNGEN.....	14
17	ZUSAMMENFASSUNG DES PROTOKOLLS.....	15
18	BIBLIOGRAPHY / LITERATUR.....	16
SYMBOLS USED.....		18

1 INTENDED USE

Immunoradiometric assay kit for the in vitro quantitative determination of the Insulin-like Growth Factor Binding Protein-3 (IGFBP-3) in serum.

2 CLINICAL BACKGROUND

The insulin-like growth factor (IGF) system is the primary regulator of normal body growth and regeneration, affecting cell proliferation, differentiation and apoptosis. In addition, the IGF-system appears to modify insulin sensitivity and long-term glucose metabolism. Finally, numerous epidemiological, experimental and clinical data indicate that the IGF-system is also involved in the development of several common cancers as well as frequent diseases such as atherosclerosis and type 2 diabetes mellitus.

The IGF-system consists of a family of closely related peptides, which includes the two primary growth promoting peptides, IGF-I and IGF-II, 6 specific high-affinity IGF-binding proteins (IGFBP-1 to -6), and a large non-IGF-binding glycoprotein, the "acid labile subunit" (ALS).

IGFBP-3 is the most abundant IGF-binding protein, accounting for as much as 75% or more of the circulating IGF-binding capacity in healthy subjects. IGFBP-3 shares functional properties with IGFBP-5 in that both peptides are able to form high molecular weight ternary complexes of ~150 kilo Dalton with ALS and either IGF-I or -II. However, IGFBP-5 circulates in much lower concentrations than IGFBP-3, and in healthy subjects the ternary complexes carry as much as 90% of IGFBP-3 but only about 50% of IGFBP-5.

Originally, the IGFBPs were thought to serve as IGF-carrier proteins, stabilizing plasma IGF levels and controlling the egress of IGF from the circulation to the extra-vascular compartment. Furthermore, it was assumed that IGFBP-complexed IGF was biologically more or less inactive, being deprived its ability to interact with the IGF-I receptor. However, it soon became apparent that in some experimental settings the IGFBPs stimulated rather than inhibited IGF-I mediated actions, and accordingly, the IGFBPs are now often referred to as *modulators* of IGF-I bioactivity. In addition, the majority of the IGFBPs, and in particular IGFBP-3, exerts IGF-I and IGF-II receptor independent effects, possibly involving interactions with specific receptors located at the cell surface and intracellular. For example, IGFBP-3 is nowadays considered to serve as an anti-cancer molecule, apparently protecting against several common cancers, and effects of IGFBP-3 on insulin signaling in cultured adipocytes have also been suggested.

The turnover of the ternary complexes is very slow, and the plasma concentration of IGFBP-3 remains stable throughout the day, being unaffected by short-term nutritional changes. Thus, the level of IGFBP-3 may be determined by one single measurement. GH is the primary regulator of IGFBP-3 as well as of IGF-I and ALS and therefore, all three peptides increase during the pubertal growth spurt, where after levels gradually decline with increasing age. In children, IGFBP-3 has been shown to correlate with the 24-h integrated GH secretion and in particular in children IGFBP-3 may be helpful in the diagnosis of GH deficiency.

3 PRINCIPLES OF THE METHOD

The IGFBP-3 IRMA is an immunoradiometric assay based on coated-tube. Mab1, the capture antibody, is attached to the lower and inner surface of the plastic tube. Calibrators or samples added to the tubes will at first show low affinity for Mab1. Addition of Mab2, the signal antibody labelled with ^{125}I , will complete the system and trigger the immunological reaction. After washing, the remaining radioactivity bound to the tube reflects the antigen concentration.

4 REAGENTS PROVIDED

	Reagents	96 Test Kit	Reconstitution
TUBES	Tubes coated with anti IGFBP-3(monoclonal antibody)	2 x 48	Ready for use
Ab ¹²⁵I J	Anti-IGFBP-3- ¹²⁵ I (monoclonal antibody) in Tris Maleate buffer with bovine serum, azide (<0.1%) and inert red dye	1 vial 5.5 mL 700 kBq	Ready for use
CAL N	Calibrators 1-5 in Tris HCL buffer with bovine serum albumin and thymol. See exact value on vial labels. Calibrators are prediluted	5 vials lyophilised	Add 1.0 mL distilled water
DIL SPE	Dilution buffer: Tris HCl buffer with bovine albumin and azide (<0.1%)	1 vial 100 mL	Ready for use
WASH SOLN CONC	Wash solution (TRIS-HCl)	1 vial 10 mL	Dilute 70 x with distilled water (use a magnetic stirrer).
CONTROL N	Controls - N = 1 or 2 in Tris HCl buffer with human plasma and thymol Controls are prediluted	2 vials lyophilised	Add 1.0 mL distilled water

Note: use the dilution buffer as zero calibrator.

5 SUPPLIES NOT PROVIDED

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

1. Distilled water
2. Pipettes for delivery of: 10 µL, 50 µL, 100 µL and 1 mL (the use of accurate pipettes with disposable plastic tips is recommended)
3. Plastic tubes for dilution of samples
4. Vortex mixer
5. Tube shaker (400 rpm)
6. Magnetic stirrer
7. 5 mL automatic syringe (Cornwall type) for washing
8. Aspiration system (optional)
9. Any gamma counter capable of measuring ¹²⁵I may be used (minimal yield 70%).

6 REAGENT PREPARATION

A. Calibrators:

Reconstitute the calibrators with 1.0 mL distilled water.

B. Controls:

Reconstitute the controls with 1.0 mL distilled water.

C. Working Wash solution:

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

7 STORAGE AND EXPIRATION DATING OF REAGENTS

- Before opening or reconstitution, all kits components are stable until the expiry date, indicated on the label, if kept at 2 °C to 8 °C.
- The calibrators and controls are very unstable, use them immediately after reconstitution, freeze immediately in aliquots and keep them at -20 °C for maximum 3 months.
- Avoid subsequent freeze-thaw cycles.
- Freshly prepared Working Wash solution should be used on the same day.
- After its first use, tracer is stable until expiry date, if kept in the original well-closed vial at 2 °C to 8 °C.
- Alterations in physical appearance of kit reagents may indicate instability or deterioration.

8 SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Serum samples must be kept at 2 °C to 8 °C.

If the test is not run within 24 h., storage at -20 °C is recommended.

Avoid subsequent freeze-thaw cycles.

9 PROCEDURE

9.1 Handling notes

- Do not use the kit or components beyond expiry date.
- Do not mix materials from different kit lots.
- Bring all the reagents to room temperature prior to use.
- Thoroughly mix all reagents and samples by gentle agitation or swirling.
- Use a clean disposable pipette tip for addition of each different reagent and sample in order to avoid cross-contamination. High precision pipettes or automated pipetting equipment will improve the precision.
- Respect the incubation times.
- Prepare a calibration curve for each run, do not use data from previous runs.

9.2 Procedure

1. Label one plain plastic tube for each sample.
2. Dispense 1 mL of Dilution Buffer into each tube.
3. Add 10 µL of sample into these tubes.
4. Label coated tubes in duplicate for each calibrator, sample and control.
For the determination of total counts, label 2 normal tubes.
5. Briefly vortex calibrators, controls and pre-diluted samples and dispense 100 µL of each into the respective tubes (use the dilution buffer as zero calibrator).
6. Dispense 50 µL of ¹²⁵Iodine labelled anti IGFBP-3 into each tube, including the uncoated tubes for total counts.
7. Incubate for 120 minutes at room temperature on a tube shaker (400 rpm).
8. Aspirate (or decant) the content of each tube (except total counts). Be sure that the plastic tip of the aspirator reaches the bottom of the coated tube in order to remove all the liquid.
9. Wash tubes with 2 mL Working Wash solution (except total counts) and aspirate (or decant).
Avoid foaming during the addition of the Working Wash solution.
10. Wash tubes again with 2 mL Wash solution (except total counts) and aspirate (or decant).
11. Let the tubes stand upright for two minutes and aspirate the remaining drop of liquid.
12. Count tubes in a gamma counter for 60 seconds.

10 CALCULATION OF RESULTS

1. Calculate the mean of duplicate determinations.
2. On semi logarithmic or linear graph paper plot the c.p.m. (ordinate) for each calibrator against the corresponding concentration of IGFBP-3 (abscissa) and draw a calibration curve through the calibrator points, reject the obvious outliers.
3. Read the concentration for each control and sample by interpolation on the calibration curve.
4. Computer assisted data reduction will simplify these calculations. If automatic result processing is to be used, a 4-parameter logistic function curve fitting is recommended

11 TYPICAL DATA

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

IGFBP-3-IRMA		cpm	B/T (%)
Total count		29 8318	100
Calibrator	0 ng/mL	17	0.01
	380 ng/mL	1 494	0.50
	1 057 ng/mL	5 608	1.88
	2 520 ng/mL	17 131	5.74
	5 589 ng/mL	54 713	18.34
	13 395 ng/mL	185 344	62.13

The calibrators are standardized against the NIBSC/WHO recombinant IGFBP-3, reference reagent coded 93/560.

12 PERFORMANCE AND LIMITATIONS

12.1 Detection limit

Twelve zero calibrators were assayed along with a set of the other calibrators. The detection limit, defined as the apparent concentration of the average count at zero binding plus two standard deviations, was 17.3 ng/mL.

12.2 Specificity

Some potentially interfering hormones have been tested in this assay. At concentrations up to 10 µg/mL, none of the following hormones showed significant interference:

- rhIGF-BP1
- rhIGF-BP2
- rhIGF-BP4
- rhIGF-BP5
- rhIGF-BP6
- rhIGF-I
- rhIGF-II

12.3 Precision

INTRA-ASSAY PRECISION				INTER-ASSAY PRECISION			
Serum	N	$\langle X \rangle \pm SD$ (ng/mL)	CV (%)	Serum	N	$\langle X \rangle \pm SD$ (ng/mL)	CV (%)
A	20	543 ± 22	4.0	A	10	1056 ± 34	3.2
B	20	2637 ± 71	2.7	B	10	4539 ± 255	5.6

SD: Standard Deviation; CV: Coefficient of variation

12.4 Accuracy

DILUTION TEST

Sample	Dilution	Theoretical Concent. (ng/mL)	Measured Concent. (ng/mL)
A	1/1	-	3004.8
	1/2	1502.4	1524.6
	1/4	751.2	765.9
	1/8	375.6	375.8
	1/16	187.8	175.3

Samples were diluted with Dilution Buffer.

RECOVERY TEST

Added IGFBP-3 (ng/mL)	Recovered IGFBP-3 (ng/mL)	Recovery (%)
2000	2094	104.7
1000	1123	112.3
500	491	98.2
250	273	109.3
125	139	111.0

12.5 Time delay between last calibrator and sample dispensing

As shown hereafter, assay results remain accurate even when a sample is dispensed 30 minutes after the calibrator has been added to the coated tubes.

TIME DELAY				
	0'	10'	20'	30'
S 1 (ng/mL)	1207	1204	1263	1274
S 2 (ng/mL)	4671	4986	4899	5054

13 LIMITATIONS

- Specimens from patients who have received preparations of mouse monoclonal antibodies for diagnosis or therapy may contain human anti-mouse antibodies (HAMA). Such specimens may show either falsely elevated or depressed values when tested with assay kits which employ mouse monoclonal antibodies.
- Heterophilic antibodies in human serum can react with reagent immunoglobulins, interfering with in vitro immunoassays.

Patients routinely exposed to animals or animal serum products can be prone to this interference and anomalous values may be observed in case of the presence of heterophilic antibodies. Carefully evaluate the results of patients suspected of having these antibodies.

If results are not consistent with other clinical observations, additional information should be required before diagnosis.

14 INTERNAL QUALITY CONTROL

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

15 REFERENCE INTERVALS

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

Normal subjects

Age Group	MALES (ng/mL)			FEMALES (ng/mL)		
	Mean	Range	N	Mean	Range	N
6 years	3771	2825 – 5178	9	3877	3400 – 4554	6
7 years	3718	2846 – 4462	20	3958	3102 – 4812	23
8 years	3852	3195 – 4978	38	3963	3156 – 4839	20
9 years	3833	3018 – 4837	29	4008	3334 – 4544	22
10 years	3865	2935 – 4524	28	4095	3257 – 5158	32
11 years	3991	3152 – 4635	28	4109	3144 – 5031	30
12 years	4203	3423 – 5153	28	4481	3643 – 4987	21
13 years	4488	2936 – 5586	34	4668	3771 – 5249	38
14 years	4381	3349 – 5220	39	4382	3585 – 5157	54
15 years	4212	3266 – 5262	31	4346	3551 – 5175	57
16 years	4343	3417 – 5662	45	4331	3475 – 5055	69
17 years	4287	3305 – 5319	19	4316	3459 – 5424	39
18 years	4604	3830 – 5583	17	4463	3518 – 5190	28
19 years	4321	3647 – 4907	17	4501	3842 – 5149	18
20 years	4224	3714 – 4871	12	4327	3686 – 4949	6
21 – 25 years	4633	3228 – 6207	27	5111	3732 – 6254	25
26 – 30 years	4656	3081 – 5881	26	4326	3038 – 5266	24
31 – 40 years	4392	3030 – 6101	47	4508	3609 – 5637	47
> 40 years	4354	2589 – 5312	18	4327	3313 – 5247	20

Remark : the range is based on 2.5 % and 97.5 % percentiles.

16 PRECAUTIONS AND WARNINGS

Safety

For *in vitro* diagnostic use only.

This kit contains ^{125}I (half-life: 60 days), emitting ionizing X (28 keV) and γ (35.5 keV) radiations.

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

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

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

The human blood components included in this kit have been tested by European approved and/or FDA approved methods and found negative for HbsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 and 2. No known method can offer complete assurance that human blood derivatives will not transmit hepatitis, AIDS or other infections. Therefore, handling of reagents, serum or plasma specimens should be in accordance with the local safety procedures. All animal products and derivatives have been collected from healthy animals. Bovine components originate from countries where BSE has not been reported. Nevertheless, components containing animal substances should be treated as potentially infectious.

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

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

17 SUMMARY OF THE PROTOCOL

	TOTAL COUNTS (μL)	CALIBRATORS CONTROLS (μL)	SAMPLE(S) (μL)
DILUTION SAMPLE(S)			
Dilution Buffer	-	-	1000
Sample	-	-	10
Shaking	Vortex		
INCUBATION			
Calibrators (0 to 5), controls	-	100	-
Diluted Samples	-	-	100
Tracer	50	50	50
Incubation	120 minutes at room temperature with shaking at 400 rpm		
Separation	-	Aspirate (or decant) 2 mL	
Working Wash solution		Aspirate (or decant) 2 mL	
Separation		Aspirate (or decant)	
Working Wash solution			
Separation			
Counting	Count tubes for 60 seconds		

1 VERWENDUNGSZWECK

Radioimmunoassay Kit zur quantitativen in-vitro Bestimmung des Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor-bindenden Proteins (IGFBP-3) im Serum .

2 KLINISCHER HINTERGRUND

Der insulinähnliche Wachstumsfaktor (IGF) ist der primäre Regulator des normalen Körperwachstums und der Regeneration und beeinflusst die Proliferation, die Ausdifferenzierung und die Apoptose der Zellen. Darüber hinaus scheint das IGF-System die Insulinsensitivität und langfristig den Glukosemetabolismus zu modifizieren. Letztendlich deuten viele epidemiologische, experimentelle und klinische Daten darauf hin, dass das IGF-System sowohl an der Entwicklung von verschiedenen Krebserkrankungen ,als auch an häufigen Erkrankungen wie Atherosklerose und Diabetes Mellitus Typ 2 beteiligt zu sein scheint.

Das IGF-System besteht aus einer Familie von nahe verwandten Peptiden, die die zwei wichtigsten wachstumsfördernden Peptide IGF-I und IGF-II, sowie 6 spezifische hochaffine IGF-bindende Proteine (IGFBP- bis -6) und ein großes nicht-IGF-bindendes Glykoprotein, die „Säure labile Untereinheit“(ALS) umfasst.

IGFBP-3 ist das IGF-bindende Protein mit der höchsten Bindungsrate, d.h. es repräsentiert ca. 75% oder mehr der zirkulierenden IGF-Bindungskapazität von Gesunden. IGFBP-3 teilt sich funktionelle Eigenschaften mit IGFBP-5, beide sind in der Lage hochmolekulare Dreifachkomplexe von ~150 kD mit ALS und entweder IGF-I oder -II zu bilden. Wie auch immer, IGFBP-5 zirkuliert in viel geringeren Konzentrationen als IGFBP-3. Bei Gesunden enthalten die Dreifachkomplexe IGFBP-3 zu ungefähr 90% und IGFBP-5 nur zu 50%.

Ursprünglich dachte man, dass IGFBP als IGF-Trägerprotein fungiert, welches die Plasmaspiegel von IGF stabilisiert und den Ausgang des IGF aus der Zirkulation zum extravaskulären Sektor kontrolliert. Weiterhin wurde angenommen, dass an IGFBP gebundenes IGF biologisch mehr oder weniger inaktiv sei, weil seine Fähigkeit mit dem IGF-Rezeptor zu interagieren unterdrückt sei. Wie auch immer, stellte sich in einigen Experimenten schnell heraus, dass IGFBP die IGF-I gesteuerten Reaktionen eher stimulierte, als unterdrückte und so werden die IGFBPs nun oft als *Modulatoren* der IGF-I Bioaktivität bezeichnet. Zusätzlich gebraucht die Mehrheit der IGFBPs und im Besonderen IGFBP-3, IGF-1 und IGF-1 rezeptorunabhängige Effekte, möglicherweise unter Einbeziehung von Interaktionen mit spezifischen Rezeptoren, die sich auf der Zelloberfläche und intrazellulär befinden. Zum Beispiel wird IGFBP-3 neuerdings als ein Antikrebs Molekül eingeschätzt, das offensichtlich gegen verschiedene gängige Krebsarten schützt. Effekte von IGFBP-3 auf Insulinsignale in kultivierten Adipozyten sind vermutet worden.

Der Turnover der Dreifachkomplexe ist sehr langsam und die Plasmakonzentration von IGFBP-3 bleibt über den Tag stabil, nicht beeinflusst durch kurzfristige Wechsel in der Ernährung. Dadurch kann der IGFBP-3 Spiegel durch eine einzige Messung bestimmt werden. GH ist der primäre Regulator von IGFBP-3 und von IGF-I und ALS .Daher steigen alle drei Peptidwerte während des pubertären Wachstumsschubs an, worauf sie mit steigendem Alter graduell abnehmen. Bei Kindern wurde gezeigt, dass IGFBP-3 mit der 24 Stunden Sekretion von GH korreliert und IGFBP-3 besonders bei der Diagnose von GH-Mangel bei Kindern hilfreich sein kann.

3 GRUNDSÄTZLICHES ZUR DURCHFÜHRUNG

Das IGFBP-3 IRMA ist ein radiometrischer Immunoassay, der auf beschichteten Röhrchen basiert. Mab1, ist als Fängerantikörper an den inneren unteren Bereich des Plastikröhrchens gebunden. Dem Röhrchen zugegebene Kalibratoren oder Proben zeigen zuerst geringe Affinität zu Mab1. Durch Zugabe von Mab2, dem mit ¹²⁵I markierten Signal-Antikörper, wird das System vervollständigt und löst die immunologische Reaktion aus. Nach dem Waschen stellt die im Röhrchen verbliebene Radioaktivität die Antigenkonzentration dar.

4 MITGELIEFERTE REAGENZIEN

	Reagenzien	96 Test Kit	Rekonstitution
TUBES	Röhrchen beschichtet mit anti-IGFBP-3 (monoklonaler Antikörper)	2 x 48	gebrauchsfertig
Ab ¹²⁵J	Anti-IGFBP-3- ¹²⁵ I (monoklonaler Antikörper) in Tris-Maleat-Puffer mit Rinderserum, Natriumazid (<0,1%) und inerter roter Farbe	1 Gefäß 5,5 mL 700 kBq	gebrauchsfertig
CAL N	Kalibratoren 1-5 in Tris-HCl Puffer mit Rinderalbumin und Thymol. Entnehmen Sie die exakten Werte den Flaschenetiketten. Die Kalibratoren sind vorverdünnt.	5 Gefäße lyophilisiert	1.0 mL dest. Wasser zugeben
DIL SPE	Verdünnungspuffer: Tris-HCl-Puffer mit Rinderalbumin und Natriumazid (<0,1%)	1 Gefäße 100 mL	gebrauchsfertig
WASH SOLN CONC	Waschlösung (TRIS-HCl)	1 Gefäß 10 mL	70 x mit dest. Wasser verdünnen (Magnetruhrer benutzen).
CONTROL N	Kontrollen - N = 1 or 2 in Tris-HCl Puffer mit Humanplasma und Thymol Die Kontrollen sind vorverdünnt	2 Gefäße lyophilisiert	1.0 mL dest. Wasser zugeben

Bemerkung: Benutzen Sie den Verdünnungspuffer als Nullkalibrator.

5 ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL

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

1. Dest. Wasser
2. Pipetten: 10 µL, 50 µL, 100 µL and 1 mL (Verwendung von Präzisionspipetten mit Wegwerf-Plastikspitzen wird empfohlen)
3. Plastikröhrchen zur Probenverdünnung
4. 5 mL automatische Spritze (Cornwall Typ) zum Waschen
5. Absaugsystem (optional)
6. Vortex Mixer
7. Schüttler für Röhrchen (400rpm)
8. Magnetruhrer
9. Jegl. Gamma-Counter, der ¹²⁵I messen kann, kann verwendet werden. (minimal Yield 70%)

6 REAGENT PREPARATION

A. Kalibratoren:

Rekonstituieren Sie die Kalibratoren mit 1,0 mL dest. Wasser.

B. Kontrollen:

Rekonstituieren Sie die Kontrollen mit 1,0 mL dest. Wasser.

C. Waschlösung:

Bereiten Sie ein angemessenes Volumen Waschlösung aus einem Anteil Waschlösung (70x) mit 69 Anteilen destilliertem Wasser zu. Verwenden Sie einen Magnetruhrer zum gleichmäßigen Durchmischen. Verwerfen Sie die nicht benutzte Waschlösung am Ende des Tages.

7 AUFBEWAHRUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Vor dem Öffnen oder Rekonstitution sind die Reagenzien des Kits bis zum Ablaufdatum (Angaben auf Etikett) bei Lagerung bei 2 °C bis 8 °C stabil.
- Die Kalibratoren und Proben sind sehr instabil. Benutzung sofort nach der Rekonstitution oder sofort in Aliquots bei -20 °C für bis zu 3 Monate einfrieren. Vermeiden Sie wiederholtes Einfrieren und Auftauen.
- Frisch zubereitete Waschlösung sollte am selben Tag benutzt werden.
- Nach der ersten Benutzung ist der Tracer bei Aufbewahrung im Originalgefäß und bei 2 °C bis 8 °C bis zum Ablaufdatum stabil.
- Veränderungen im Aussehen der Kitkomponenten können ein Anzeichen für Instabilität oder Zerfall sein.

8 PROBENSAMMLUNG UND -VORBEREITUNG

Serumproben müssen bei 2 °C - 8 °C aufbewahrt werden.

Falls der Test nicht innerhalb von 24 h durchgeführt wird, ist die Aufbewahrung bei -20 °C erforderlich.

Vermeiden Sie wiederholtes Einfrieren und Auftauen.

9 DURCHFÜHRUNG

9.1 Bemerkungen zur Durchführung

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

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

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

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

9.2 Durchführung

1. Kennzeichnen Sie ein leeres Plastikröhrchen pro Probe.
2. Dispensieren Sie 1 mL Verdünnungspuffer in jedes Röhrchen.
3. Geben Sie 10 µL Probe in die Röhrchen.
4. Beschriften Sie je 2 beschichtete Röhrchen für jeden Kalibrator, jede Probe und Kontrolle.
Zur Bestimmung der Gesamtaktivität, beschriften Sie 2 normale Röhrchen.
5. Vortexen Sie die Kalibratoren, vorverdünnten Proben und Kontrollen kurz und geben Sie jeweils 100 µL in ihre Röhrchen. (Benutzen Sie den Verdünnungspuffer als Nullkalibrator)
6. Geben Sie 50 µL des mit ¹²⁵Jod markierten Anti-IGFBP-3 in jedes Röhrchen, einschließlich der unbeschichteten Röhrchen für die Gesamtaktivität.
7. Inkubieren Sie 120 Minuten bei Raumtemperatur unter ständigem Schütteln (400 rpm).
8. Saugen Sie den Inhalt jedes Röhrchens ab (oder dekantieren Sie) (außer Gesamtaktivität). Vergewissern Sie sich, dass die Plastikspitze des Absaugers den Boden des beschichteten Röhrchens erreicht, um die gesamte Flüssigkeit zu entfernen.
9. Waschen Sie die Röhrchen mit 2 mL Waschlösung (außer Gesamtaktivität) und saugen Sie ab (oder dekantieren Sie). Vermeiden Sie Schaumbildung bei Zugabe der Waschlösung.
10. Waschen Sie die Röhrchen noch einmal mit 2 mL Waschlösung (außer Gesamtaktivität) und saugen Sie ab (oder dekantieren Sie).
11. Lassen Sie nach dem letzten Waschen die Röhrchen 2 Minuten aufrecht stehen und saugen Sie den verbleibenden Flüssigkeitstropfen ab.
12. Werten Sie die Röhrchen in einem Gamma-Counter 60 Sekunden aus.

10 BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

1. Berechnen Sie den Durchschnitt aus den Doppelbestimmungen.
2. Tragen Sie auf semilogarithmischem oder linearem Millimeterpapier den c.p.m. (Ordinate) für jeden Standard gegen die entsprechende Konzentration IGFBP-3 (Abszisse) und zeichnen Sie eine Standardkurve durch die Standardpunkte, schließen Sie offensichtliche „Ausreißer“ aus.
3. Berechnen Sie die Konzentration für jede Kontrolle und Probe durch Interpolation aus der Standardkurve.
4. Computergestützte Methoden können ebenfalls zur Erstellung der Kalibrationskurve verwendet werden. Falls die Ergebnisberechnung mit dem Computer durchgeführt wird, empfehlen wir die Berechnung mit einer “4 Parameter”-Kurvenfunktion.

11 TYPISCHE WERTE

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

IGFBP-3-IRMA		cpm	B/T (%)
Gesamtaktivität		298318	100
Kalibrator	0 ng/mL	17	0,01
	380 ng/mL	1 494	0,50
	1 057 ng/mL	5 608	1,88
	2 520 ng/mL	17 131	5,74
	5 589 ng/mL	54 713	18,34
	13 395 ng/mL	185 344	62,13

Die Kalibratoren sind gegen das rekombinante IGFBP-3 Referenzreagenz der NIBSC/WHO mit der Bezeichnung 93/560 standardisiert.

12 LEISTUNGSMERKMALE UND GRENZEN DER METHODIK

12.1 Nachweisgrenze

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

Die Nachweisgrenze, definiert als die scheinbare Konzentration bei zwei Standardabweichungen über dem gemessenen Durchschnittswerts bei Nullbindung, entsprach 17,3 ng/mL.

12.2 Spezifität

Einige potentiell störenden Hormone wurden mit diesem Assay getestet. Bei Konzentrationen von bis zu 10 µg/mL zeigten keine der nachfolgend angegebenen Hormone signifikante Interferenzen:

- rhIGF-BP1
- rhIGF-BP2
- rhIGF-BP4
- rhIGF-BP5
- rhIGF-BP6
- rhIGF-I
- rhIGF-II

12.3 Präzision

INTRA-ASSAY PRÄZISION				INTER-ASSAY PRÄZISION			
Serum	N	$\text{} \pm \text{SD}$ (ng/mL)	CV (%)	Serum	N	$\text{} \pm \text{SD}$ (ng/mL)	CV (%)
A	20	543 ± 22	4,0	A	10	1056 ± 34	3,2
B	20	2637 ± 71	2,7	B	10	4539 ± 255	5,6

SD : Standardabweichung; CV: Variationskoeffizient

12.4 Genauigkeit

VERDÜNNUNGSTEST

Probe	Verdünn.	Theoret. Konzent. (ng/mL)	Gemess. Konzent. (ng/mL)
A	1/1	-	3004,8
	1/2	1502,4	1524,6
	1/4	751,2	765,9
	1/8	375,6	375,8
	1/16	187,8	175,3

Die Proben werden mit Verdünnungspuffer verdünnt.

WIEDERFINDUNGSTEST

Zugeg. IGFBP-3 (ng/mL)	Wiedergef. IGFBP-3 (ng/mL)	Wiedergefunden (%)
2000	2094	104,7
1000	1123	112,3
500	491	98,2
250	273	109,3
125	139	111,0

12.5 Zeitfenster zwischen der Zugabe des letzten Kalibrators und der Probenverteilung

Wie nachfolgend beschrieben, sind die Ergebnisse noch genau, selbst wenn die Probe erst 30 Minuten nach Zugabe des Kalibrators in das beschichtete Röhrchen gegeben wird.

ZEITVERZÖGERUNG				
	0'	10'	20'	30'
S 1 (ng/mL)	1207	1204	1263	1274
S 2 (ng/mL)	4671	4986	4899	5054

13 ANWENDUNGSGRENZEN

- Proben von Patienten, die Zubereitungen von monoklonalen Maus-Antikörpern zur Diagnose oder Therapie erhalten haben, können humane Anti-Maus Antikörper (HAMA) enthalten. Solche Proben können entweder falsch erhöhte oder zu niedrige Werte ergeben, wenn sie mit Testsystemen getestet werden, die monoklonale Maus Antikörper enthalten.
- Heterophile Antikörper im humanen Serum können mit Immunglobulinen der Reagenzien reagieren und somit in vitro Immunoassays interferieren.

Patienten, die routinemäßigen Umgang mit Tieren oder Tierseren haben, können zu dieser Interferenz neigen und so können anormale Werte in Gegenwart von heterophilen Antikörpern beobachtet werden. Ergebnisse von Patienten, bei denen diese Antikörper vermutet werden, müssen sorgfältig evaluiert werden.

Wenn die Ergebnisse nicht mit anderen klinischen Beobachtungen übereinstimmen, sollten weitere Informationen vor der Diagnosestellung ermittelt werden.

14 INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE

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

15 REFERENZ INTERVALLE

Diese Werte sind nur Richtwerte; jedes Labor muss seinen eigenen Normalwertbereich ermitteln.

Gesunde Personen

Altersgruppe	MÄNNER (ng/mL)			FRAUEN (ng/mL)		
	Mittelwert	Bereich	N	Mittelwert	Bereich	N
6 Jahre	3771	2825 – 5178	9	3877	3400 – 4554	6
7 Jahre	3718	2846 – 4462	20	3958	3102 – 4812	23
8 Jahre	3852	3195 – 4978	38	3963	3156 – 4839	20
9 Jahre	3833	3018 – 4837	29	4008	3334 – 4544	22
10 Jahre	3865	2935 – 4524	28	4095	3257 – 5158	32
11 Jahre	3991	3152 – 4635	28	4109	3144 – 5031	30
12 Jahre	4203	3423 – 5153	28	4481	3643 – 4987	21
13 Jahre	4488	2936 – 5586	34	4668	3771 – 5249	38
14 Jahre	4381	3349 – 5220	39	4382	3585 – 5157	54
15 Jahre	4212	3266 – 5262	31	4346	3551 – 5175	57
16 Jahre	4343	3417 – 5662	45	4331	3475 – 5055	69
17 Jahre	4287	3305 – 5319	19	4316	3459 – 5424	39
18 Jahre	4604	3830 – 5583	17	4463	3518 – 5190	28
19 Jahre	4321	3647 – 4907	17	4501	3842 – 5149	18
20 Jahre	4224	3714 – 4871	12	4327	3686 – 4949	6
21 – 25 Jahre	4633	3228 – 6207	27	5111	3732 – 6254	25
26 – 30 Jahre	4656	3081 – 5881	26	4326	3038 – 5266	24
31 – 40 Jahre	4392	3030 – 6101	47	4508	3609 – 5637	47
> 40 Jahre	4354	2589 – 5312	18	4327	3313 – 5247	20

Bemerkung : Bereich auf Basis der 2,5% und 97,5% Perzentile

16 VORSICHTSMASSNAHMEN UND WARNUNGEN

Sicherheit

Nur für diagnostische Zwecke.

Dieser Kit enthält ¹²⁵I (Halbwertzeit: 60 Tagen), das ionisierende X (28 keV) und γ (35,5 keV) Strahlungen emittiert.

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

Der Umgang mit radioaktiven Substanzen sollte fern von Durchgangsverkehr in einem speziell ausgewiesenen Bereich stattfinden. Ein Logbuch für Protokolle und Aufbewahrung muss im Labor sein. Die Laborausrüstung und die Glasbehälter, die mit radioaktiven Substanzen kontaminiert werden können, müssen ausgesondert werden, um Kreuzkontaminationen mit unterschiedlichen Radioisotopen zu verhindern. Verschüttete radioaktive Substanzen müssen sofort den Sicherheitsbestimmungen entsprechend entfernt werden. Radioaktive Abfälle müssen entsprechend den lokalen Bestimmungen und Richtlinien der für das Labor zuständigen Behörden gelagert werden. Das Einhalten der Sicherheitsbestimmungen für den Umgang mit radioaktiven Substanzen gewährleistet ausreichenden Schutz.

Die menschlichen Blutkomponenten in diesem Kit wurden mit europäischen und in USA erprobten FDA-Methoden getestet, sie waren negativ für HBsAG, anti-HCV und anti-HIV 1 und 2. Keine bekannte Methode kann jedoch vollkommene Sicherheit liefern, dass menschliche Blutbestandteile nicht Hepatitis, AIDS oder andere Infektionen übertragen. Deshalb sollte der Umgang mit Reagenzien, Serum oder Plasmaproben in Übereinstimmung mit den Sicherheitsbestimmungen erfolgen.

Alle tierischen Produkte und deren Derivate wurden von gesunden Tieren gesammelt. Komponenten von Rindern stammen aus Ländern in denen BSE nicht nachgewiesen wurde.

Trotzdem sollten Komponenten, die tierische Substanzen enthalten, als potenziell infektiös betrachtet werden.

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

Bitte rauchen, trinken, essen Sie nicht in Ihrem Arbeitsbereich, und verwenden Sie keine Kosmetika. Pipettieren Sie nicht mit dem Mund. Verwenden Sie Schutzkleidung und Wegwerfhandschuhe.

17 ZUSAMMENFASSUNG DES PROTOKOLLS

	GESAMTAKTIVITÄT (μL)	KALIBRATOREN KONTROLLEN (μL)	Proben, (μL)
<u>Verdünnte Probe(n)</u> Verdünnungspuffer Probe	- -	- -	1000 10
Schütteln	Vortex		
<u>Inkubation</u> Kalibratoren (0 bis 5), Kontrollen verdünnte Proben,	- -	100 -	- 100
Tracer	50	50	50
Inkubation	120 Minuten bei Raumtemperatur unter ständigem Schütteln (400 rpm)		
Trennung Waschlösung Trennung Waschlösung Trennung	-	absaugen (oder dekantieren) 2,0 mL absaugen (oder dekantieren) 2,0 mL absaugen (oder dekantieren)	
Gamma Counter	60 Sekunden messen		

18 BIBLIOGRAPHY / LITERATUR

1. LEROITH D., BONDY C., YAKAR S., LIU JL., BUTLER A.
The somatomedin hypothesis : 2001.
Endocr Rev 2001; 22:53-74.
2. POLLAK MN., SCHERNHAMMER ES., HANKINSON SE.
Insulin-like growth factors and neoplasia.
Nat Rev Cancer 2004; 4:505-518.
3. YUEN K., FRYSTYK J., UMPLEBY M., FRYKLUND L., DUNGER D.
Changes in free rather than total insulin-like growth factor-I enhance insulin sensitivity and suppress endogenous peak growth hormone (GH) release following short-term low dose GH administration in young healthy adults.
J Clin Endocrinol Metab 2004; 89:3956-3964.
4. KHANDWALA HM., McCUTCHEON IE., FLYVBJERG A., FRIEND KE.
The effects of insulin-like growth factors on tumorigenesis and neoplastic growth.
Endocr Rev 2000; 21:215-244.
5. RENEHAN AG., ZWAHLEN M., MINDER PC., O'DWYSER ST., SHALET PS., EGGER PM.
Insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF binding protein-3, and cancer risk : systematic review and meta-regression analysis.
The Lancet 2004; 363:1346-1353.
6. JUUL A., SCHEIKE T., DAVIDSEN M., GYLLENborg J., JORGENSEN T.
Low serum insulin-like growth factor I is associated with increased risk of ischemic heart disease : a population-based case-control study.
Circulation 2002; 106:939-944.
7. SANDHU MS., HEALD AH., GIBSON JM., CRUICKSHANK JK., DUNGER DB., WAREHAM NJ.
Circulating concentrations of insulin-like growth factor-I and development of glucose intolerance : a prospective observational study.
The Lancet 2002; 359:1740-1745.
8. VAESSEN N., HEUTINK P., JANSSEN JA., WITTEMAN JC., TESTERS L., HOFMAN A., LAMBERTS SW., OOSTRA BA., POLS HA., VAN DUIJN CM.
A polymorphism in the gene for IGF-I : functional properties and risk for type 2 diabetes and myocardial infarction.
Diabetes 2001; 50:637-642.
9. JUUL A.
Serum levels of insulin-like growth factor-I and its binding proteins in health and disease.
Growth Horm IGF Res 2003; 13:113-170
10. FIRTH SM., BAXTER RC.
Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins
Endocr Rev 2002; 23:824-854.
11. BAXTER RC., MEKA S., FIRTH SM.
Molecular distribution of IGF binding protein-5 in human serum.
J Clin Endocrinol Metab 2002; 87:271-276.
12. RICORT JM.
Insulin-like growth factor binding protein (IGFBP) signaling.
Growth Horm IGF Res 2004; 14:277-286.
13. JONES JI., CLEMMONS DR.
Insulin-like growth factors and their binding proteins : biological actions.
Endocr Rev 1995; 16:3-34.
14. ALI O., COHEN P., LEE KW.
Epidemiology and biology of insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) as an anti-cancer molecule.
Horm Metab Res 2003; 35:726-733.
15. CHAN SS., TWIGG SM., FIRTH SM., BAXTER RC.
Insulin-like growth factor binding protein-3 leads to insulin resistance in adipocytes.
J Clin Endocrinol Metab 2005; 90:6588-6595.
16. JUUL A., MAIN K., BLUM WF., LINDHOLM J., RANKE MB., SKAKKEBAEK NE.
The ration between serum levels of insulin-like growth factor (IGF)-I and the IGF binding proteins (IGFBP-1, 2 and 3) decreases with age in healthy adults and is increased in acromegalic patients.
Clin Endocrinol (Oxf) 1994; 41:85-93.

17. BLUM WF., ALBERTSSON-WIKLAND K., ROSBERG S., RANKE MB.
Serum levels of insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF binding protein 3 reflect spontaneous growth hormone secretion.
J Clin Endocrinol Metab 1994; 76:1610-1616.
18. FRYSTYK J., IVARSEN P., SKJAERBAEK C., FLYVBJERG A., PEDERSEN EB., ORSKOV H.
Serum-free insulin-like growth factor I correlates with clearance in patients with chronic renal failure.
Kidney Int 1999; 56:2076-2084.
19. FRYSTYK J.
In Endocrinology and Metabolism – Clinics of North America 2005 : Endocrinology of aging, Chapter XI : **Aging somatotropic axis mechanisms and implications of IGFBP adaptation.**

SYMBOLS USED

Symbol	English	Deutsch	Italiano	Español	Français
	European Conformity	CE-Konformitäts-kennzeichnung	Conformità europea	Conformidad europea	Conformité normes européennes
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consultare le istruzioni per l'uso	Consulte las instrucciones de uso	Consulter les instructions d'utilisation
	In vitro diagnostic medical device	In-vitro-Diagnostikum	Dispositivo medico-diagnóstico in vitro	Producto sanitario para diagnóstico In vitro	Dispositif médical de diagnostic in vitro
	Catalogue number	Katalognummer	Numero di Catalogo	Número de catálogo	Référence de catalogue
	Batch code	Chargenbezeichnung	Codice del lotto	Código de lote	Numéro de lot
	Contains sufficient for <n> tests	Ausreichend für <n> Prüfungen	Contenuto sufficiente per "n" saggi	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenu suffisant pour "n" tests
	Temperature limit	Temperaturgrenzwerte	Temperatura di conservazione	Temperatura de conservación	Température de conservation
	Use-by date	Verwendbar bis	Utilizzare prima del	Establa hasta	Utiliser jusque
	Manufacturer	Hersteller	Fabbricante	Fabricante	Fabricant
	Distributor *	Vertriebspartner *	Distributore	Distribuidor	Distributeur
	Date of manufacture	Herstellungsdatum	Data di produzione	Fecha de fabricación	Date de production
	Biological risks	Biologische Risiken	Rischi biologici	Riesgos biológicos	Risques biologiques
	Caution	Achtung	Attenzione	Precaución	Attention
	Unique device Identifier	eindeutige Produktidentifizierung			
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Solo a scopo di ricerca	Sólo para uso en investigación	Seulement dans le cadre de recherches
<i>Content</i>	Content	Inhalt	Contenuto	Contenido	Contenu
<i>Volume/No.</i>	Volume / No.	Volumen/Anzahl	Volume/Quantità	Volumen/Número	Volume/Quantité