

IGFBP-3 RIA-CT

Radioimmunoassay mit beschichteten Röhrchen
zur quantitativen Bestimmung von

**Insulin-Like Growth Factor
Bindungsprotein-3**

Produkt-Nr.: IGF-R11

100 Röhrchen



DE/CA40/00809/6

Für In-vitro-Diagnostik!



Gesellschaft für Forschung und Herstellung von Diagnostika GmbH

Aspenhastr. 25 • D-72770 Reutlingen / Germany

Telefon: + 49 - (0) 7121 51484-0 • Fax: + 49 - (0) 7121 51484-10

E-Mail: contact@mediagnost.de • <http://www.mediagnost.de>

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	2
EIGENSCHAFTEN	3
EINLEITUNG	3
EINSATZMÖGLICHKEITEN	7
SICHERHEITSHINWEISE	8
Allgemein	8
Radioaktivität	9
METHODIK	11
Assay-Eigenschaften und Validierung	11
Klinische Validierung	12
Proben: Art, Gewinnung und Lagerung	12
MATERIALIEN	13
Inhalt der Testpackung	13
Zusätzlich benötigte Reagenzien und Geräte	14
VORBEREITUNG DER REAGENZIEN	14
Probenvorbereitung	15
TESTDURCHFÜHRUNG	16
AUSWERTUNG	18
Erstellung der Standardkurve	18
Bestimmung der Probenkonzentration	20
Konzentration der Kontrolle	20
NORMALWERTE	20
EINSCHRÄNKUNGEN	21
LITERATUR	24
KURZANLEITUNG	28

EIGENSCHAFTEN

- ◆ Quantitativer Nachweis von IGFBP-3 zur Diagnostik von Wachstumsstörungen
- ◆ Messung des wachstumshormon (WH)-abhängigen Bindungsproteins
- ◆ Stabile Serumwerte durch fehlende zirkadiane Schwankungen
- ◆ IGFBP-3 spiegelt die Gesamt-WH-Sekretion über mehrere Tage wieder
- ◆ Bereits eine Einzelmessung ermöglicht eine Aussage über das Vorliegen von WH-Mangel oder -Überschuss
- ◆ Der IGF-I Messung überlegene Nachweismethode für die Diagnose von WH-Mangel bei Kleinkindern
- ◆ Nur kleine Probenvolumina nötig, daher ideal für die Pädiatrie
- ◆ Einfache Handhabung:
 - Separation durch spezifische Beschichtung der Röhren
 - keine zeitaufwendige Zentrifugation nötig
 - sichereres Abarbeiten durch gefärbte Lösungen

EINLEITUNG

Insulin-like growth factors (IGF)-I und -II sind im Blutkreislauf an spezielle Bindungsproteine (IGFBPs) gebunden. Bisher wurden sechs verschiedene Bindungsproteine anhand ihrer Aminosäuresequenz identifiziert und als IGFBP-1, IGFBP-2, ..., IGFBP-6 klassifiziert (1). Mittlerweile wurde die Entdeckung eines neuen IGFBP-7 publiziert (2). Im Blut überwiegt IGFBP-3, das hauptsächlich zur Regulierung der IGF-I und -II Konzentrationen dient. Im Gegensatz zu den anderen Bindungsproteinen hat IGFBP-3 die einzigartige Eigenschaft, neben IGF-I bzw. -II noch eine säurelabile Untereinheit (acid-IGFBP-3 RIA-CT

labile subunit, ALS) zu binden (3-5). IGFBP-3 liegt fast vollständig in Form dieses hochmolekularen ternären Komplexes vor, es finden sich aber auch geringe Mengen freies IGFBP-3 im Blut (6,7).

Die Entwicklung spezifischer Radioimmunoassays, die IGFBP-3 auch im ternären Komplexverband erkennen, ermöglichte neue Einsichten in die Regulation dieses Proteins (6-9). Demnach erwies sich IGFBP-3 als nützlicher Parameter bei der Diagnose von Wachstumsstörungen (7,8).

Außer dem Wachstumshormon gibt es noch andere Faktoren, die die IGFBP-3-Konzentration beeinflussen: Alter und sexuelles Entwicklungsstadium, Ernährung, Hypothyreose, Diabetes mellitus, Leber- und Nierenfunktion. IGFBP-3 Werte sind erniedrigt bei Unterernährung (allerdings nicht in dem Maße wie IGF-I), bei Hypothyreose, Diabetes mellitus und Lebererkrankungen (6-8). Bei Vorliegen einer chronischen Niereninsuffizienz sind die Werte jedoch erhöht (6,10,11). 24-Stunden-Messungen zeigen konstante zirkadiane Konzentrationen (12,13). Für klinische Belange ist der wichtigste regulierende Faktor das Wachstumshormon. IGFBP-3-Einzelmessungen korrelieren positiv mit dem Logarithmus der spontanen Gesamt-WH-Sekretion (8,14). Bei Patienten mit WH-Mangel sind auch die IGFBP-3 Werte erniedrigt. Nach Zugabe von WH über mehrere Tage steigen die IGFBP-3 Konzentrationen langsam in den normalen Bereich (7,8). Die langsame Reaktion auf WH-Konzentrationsänderungen und konstante zirkadiane Werte während täglicher WH-Gabe (13) lassen die Vermutung zu, dass IGFBP-3 den WH-Sekretionsstatus über mehrere Tage widerspiegelt.

Bislang wurde vor allem die IGF-I Bestimmung mittels RIA für die Diagnose von WH-Mangel bzw. -überschuss herangezogen. Bei dieser Methode gibt es allerdings einige Einschränkungen:

1. Bei Kleinkindern ist die IGF-I Konzentration sehr gering und erschwert so eine genaue quantitative Messung bei subnormalen Werten.
2. Eine erhebliche Anzahl von kleinwüchsigen Kindern besitzt trotz normaler WH-Sekretion subnormale IGF-I Werte. Dadurch wird die Spezifität und Genauigkeit des IGF-I Tests zur Diagnose von WH-Mangel eingeschränkt.

Die großen Vorteile der IGFBP-3 Messung verglichen mit der IGF-I Messung sind:

1. Vor der Messung ist kein Extraktionsschritt notwendig. Diese Vereinfachung der Testdurchführung erhöht automatisch die Genauigkeit.
2. Die Normalwerte bei Kleinkindern sind relativ hoch, so dass die Messung subnormaler Werte verlässlicher wird.
3. Patienten mit WH-Mangel besitzen subnormale IGFBP-3 Werte. Andererseits besitzen die meisten kleinwüchsigen Kinder mit normaler WH-Sekretion auch IGFBP-3 Werte im Normalbereich (Abb. 1). Beide Gruppen sind durch die Messung der IGFBP-3 Konzentration also leicht zu unterscheiden. Eine einzige Messung reicht für eine präzise Diagnose auf WH-Mangel völlig aus (7,18). Bei kleinwüchsigen Kindern steigen die IGFBP-3 Werte während kontinuierlicher WH-Behandlung stetig bis in den Normalbereich an und bleiben bei fortgesetzter Therapie auch konstant (Abb. 2). Daher ist die IGFBP-3 Messung im Serum auch geeignet WH-Therapien zu überwachen. Bei anderen Patienten mit ausgeprägtem Minderwuchs aber normaler WH-Sekretion, z. B. Turner-Syndrom oder Silver-Russell-Syndrom, sind die IGFBP-3 Serumwerte ebenfalls normal (8).

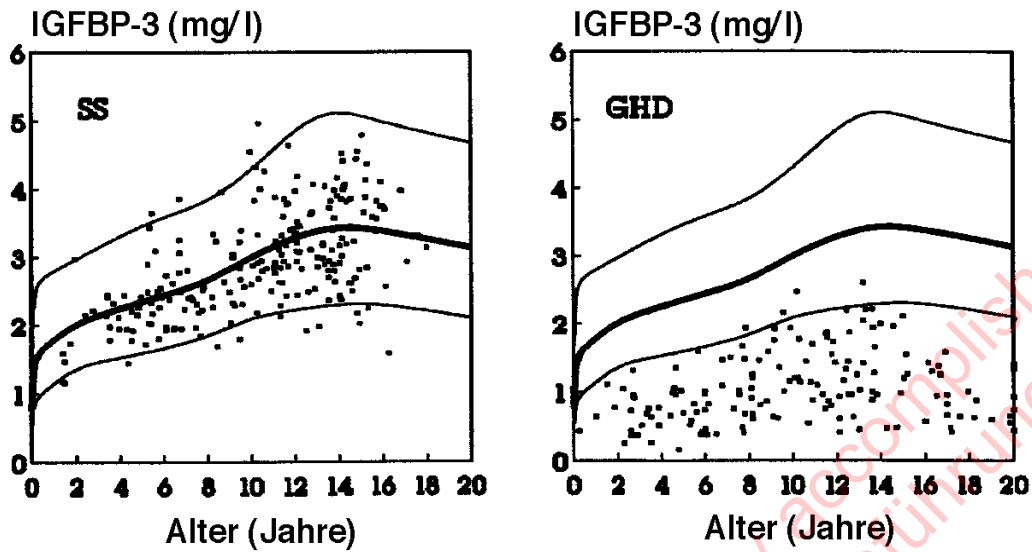


Abb. 1: IGFBP-3 Serumwerte bei kleinwüchsigen Patienten ohne WH-Mangel: angeborene Wachstums- und Entwicklungsverzögerung, vererbte Kleinwüchsigkeit, intra-uterine Wachstumsverzögerung (SS: short stature) sowie bei idiopathischem oder organischem WH-Mangel (GHD: growth hormone deficiency). Der Normalbereich ist durch die 5., 50. und 95. Perzentile definiert.

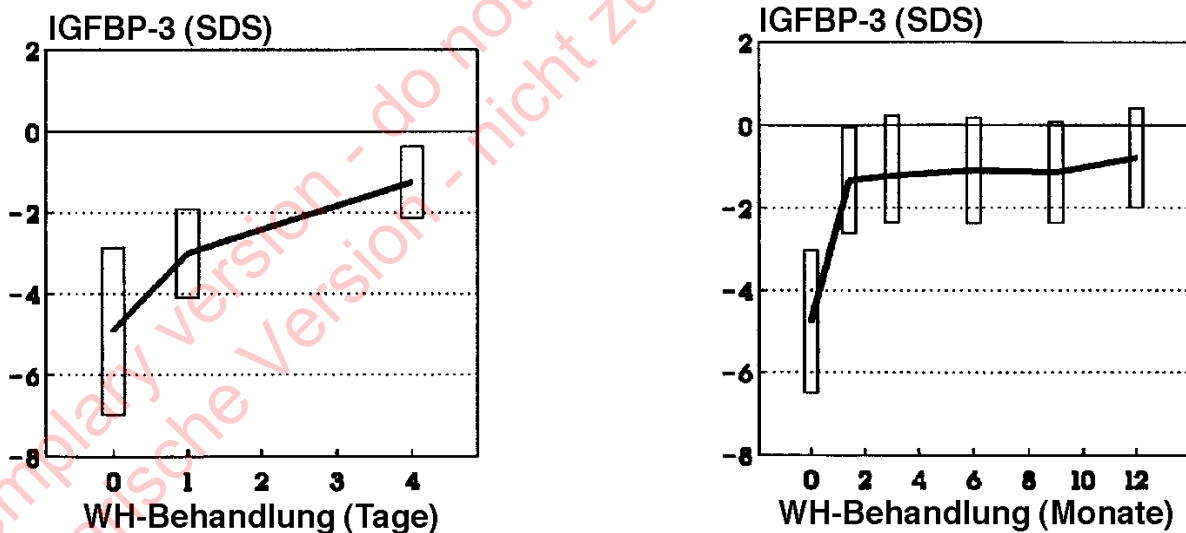


Abb.2: IGFBP-3 Serumwerte bei Kindern mit WH-Mangel vor und während der Behandlung mit WH. Aufgrund der Altersabhängigkeit wurden die Werte über die Standardabweichungen (SDS: standard deviation score) gemittelt angegeben.

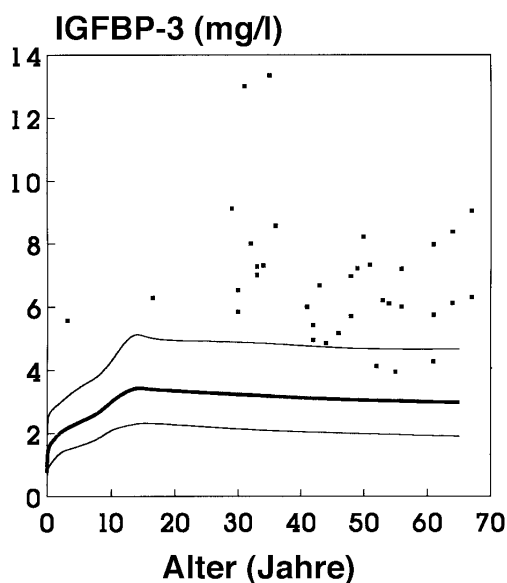


Abb. 3:IGFBP-3 Serumwerte bei Akromegalie. Der Normal-Bereich ist durch die 5., 50. und 95. Perzentile definiert.

Bei normalwüchsigen Kindern und Jugendlichen oder bei Patienten mit Sotos-Syndrom sind die IGFBP-3 Werte normal oder leicht erhöht. Im Gegensatz dazu sind die Werte bei Kindern mit Gigantismus oder Erwachsenen mit Akromegalie stark erhöht (Abb. 3) (6,15) und normalisieren sich nach erfolgreicher Behandlung. Daher ist die IGFBP-3 Messung auch hier ein nützlicher Parameter zur Diagnose von WH-Überschuss und Überwachung des Behandlungserfolgs (19). Bei frühreifen Kindern sind die IGFBP-3 Werte deutlich erhöht, während sie sich bei Patientinnen mit verfrühter Thelarche im oberen Normalbereich bewegen (15).

EINSATZMÖGLICHKEITEN

Dieser Radioimmunoassay-Kit ist für die wissenschaftliche und diagnostische Bestimmung von IGFBP-3 in humanem Serum oder Plasma, bzw. anderen humanen Körperflüssigkeiten (z.B. Follikelflüssigkeit, Samenflüssigkeit) geeignet. Sein diagnostischer Wert für den Nachweis von WH-Mangel basiert

auf der hohen Sensivität und Spezifität der IGFBP-3-Messung im Serum für diese Diagnose. WH-Überschuss kann mit diesem Test ebenfalls nachgewiesen werden, da die IGFBP-3-Werte in diesem Fall gleichfalls erhöht sind. Aufgrund der konstanten zirkadianen Werte reicht eine einzige IGFBP-3-Messung aus, um auf WH-Mangel oder -überschuss zu testen. IGFBP-3-Messungen können auch zur Überprüfung des Behandlungserfolgs bei vorliegendem WH-Mangel oder -überschuss herangezogen werden.

SICHERHEITSHINWEISE

Allgemein

Sämtliche Reagenzien dürfen ausschließlich für in-vitro-Zwecke verwendet werden!

Der Assay ist strikt nach dem Testprotokoll durchzuführen. Der Erwerb, Besitz und die Verwendung des Kits unterliegen den Bestimmungen der nationalen Aufsichtsbehörden. □

Reagenzien mit unterschiedlichen Lot-Nummern sollten nicht vermischt werden.

Die Reagenzien enthalten als Konservierungsmittel Na-Azid, allerdings sehr verdünnt (0,02%). Na-Azid ist sehr giftig, es gelten R-Sätze 28, 32, 50/53 und S-Sätze 28, 45, 60, 61.

Erste-Hilfe Maßnahmen:

Nach Hautkontakt: Nach Berührung mit der Haut während mindestens 15 Minuten mit genügend Wasser abwaschen. Kontaminierte Kleidung und Schuhe wechseln. Arzt rufen.

Nach Augenkontakt: Nach Berührung mit den Augen während mindestens 15 Minuten mit genügend Wasser spülen.

Ausreichende Spülung durch Spreizung der Augenlider sicherstellen. Arzt rufen.

Nach Verschlucken Mund mit Wasser ausspülen, vorausgesetzt die Person ist bei Bewusstsein. Sofort einen Arzt zuziehen.

Beim Umgang mit radioaktivem und potentiell infektiösem Material müssen folgende Richtlinien befolgt werden:

- Das Material sollte in speziell ausgewiesenen Bereichen gelagert und verwendet werden.
- Essen, Trinken und Rauchen ist in diesem Bereich verboten!
- Niemals mit dem Mund pipettieren!
- Direkter Kontakt mit diesem Material muß vermieden werden! Deshalb Laborkleidung und Einmalhandschuhe tragen.
- Verschüttete Reagenzien müssen sofort aufgewischt und kontaminierte Flächen und Geräte mit einem geeigneten Detergenz gereinigt werden.
- Unbenutzte radioaktive Materialien und radioaktiver Abfall müssen entsprechend den Empfehlungen der nationalen Aufsichtsbehörden gelagert werden.

Radioaktivität

Vor der Bestellung oder dem Gebrauch radioaktiver Produkte ist es notwendig, die Einhaltung der nationalen Bestimmungen oder Gesetze die deren Anwendung regeln, sicherzustellen. Örtliche Vorschriften der jeweiligen Einrichtung, die Umgang und Verhalten im Radioaktiv-Arbeitsbereich regeln, müssen befolgt werden. Die hier gegebenen Ratschläge ersetzen nicht die lokalen Regeln, Anweisungen oder Ausbildungen der

jeweiligen Einrichtung, ebenso wenig die Anordnungen des zuständigen Strahlenschutzbeauftragten. Es ist wichtig, die Richtlinien der guten Laborpraxis zu erfüllen, daneben gilt es die Besonderheiten im Umgang mit dem Radionuklid Jod-125 zu beachten.

Jod-125 hat eine Halbwertszeit $T_{1/2}$ von 60 Tagen und emittiert 35,5 keV Gamma-Strahlung, 27 – 32 keV Röntgen-Strahlung und keine Beta-Strahlung. Effektive Abschirmung ist durch Blei möglich, die Halbwertschichtdicke beträgt 0,02 mm Blei, Reduktion auf 10% ist durch 0,2 mm zu bewerkstelligen. Zur Reduzierung der Strahlendosis sollte die Zeit des Umgangs mit Radioaktivität minimiert werden (Arbeitsschritte vorplanen), sowie die Entfernung zur Strahlenquelle maximiert werden (Verdopplung der Entfernung reduziert die Strahlendosis auf ein Viertel).

Unsachgemäßes Öffnen oder Mischen von Gefäßen oder Pipettieren von Lösungen kann zur Bildung von Aerosolen, also Freisetzung von Radioaktivität in Tröpfchenform, führen und muss vermieden werden.

Der pH-Wert von Lösungen, die Jod enthalten, sollte nicht im sauren Bereich sein, da dies zur Freisetzung von flüchtigem elementarem Jod führen kann.

Einige Jod-Verbindungen können durch Gummihandschuhe diffundieren, deshalb sollten zwei Paar oder Polyethylen- und Gummihandschuhe getragen werden.

Zur Reinigung von kontaminierten Flächen oder Gegenständen sollte, um das Jod-125 chemisch zu stabilisieren, alkalische Natriumthiosulfatlösung und Papier oder Zellstoff verwendet werden.

METHODIK

Assay-Eigenschaften und Validierung

Der Radioimmunoassay für IGFBP-3 benützt ein spezifisches, hochaffines, polyklonales Antiserum für dieses Protein. Es erkennt quantitativ den kompletten ternären Komplex und wird auch von erhöhten IGF-I bzw. -II Werten nicht beeinflusst. Verwandte Moleküle wie z. B. IGFBP-1 oder IGFBP-2 zeigen keine Kreuzreaktionen im Test (Abb. 4), der Antikörper ist spezifisch für Primaten-IGFBP-3. Die Sensitivität des Assays beträgt 0,5 ng/ml. Halbmaximale Verdrängung tritt bei 5 ng/ml auf.

Die Intraassay-Variation liegt unter 7,5%, die Interassay-Variation übersteigt nicht 9,0%.

Der Tracer wird durch direkte Radiojodierung von aufgereinigtem IGFBP-3 hergestellt. Die Standards beziehen sich auf ein stabiles IGFBP-3-Derivat mit einem Molekulargewicht von 30,5 kDa (bestimmt mittels SDS-PAGE).

Die hohe Sensitivität des Assays erlaubt IGFBP-3 -Messungen in kleinen Probenvolumina, deren Größe eher durch die Pipettiergenauigkeit als durch die IGFBP-3-Menge begrenzt wird. Serum- oder Plasmaproben müssen vor der Messung verdünnt werden. Ein Extraktionsschritt wie bei konventionellen IGF-I- und IGF-II-Assays ist nicht erforderlich.

□

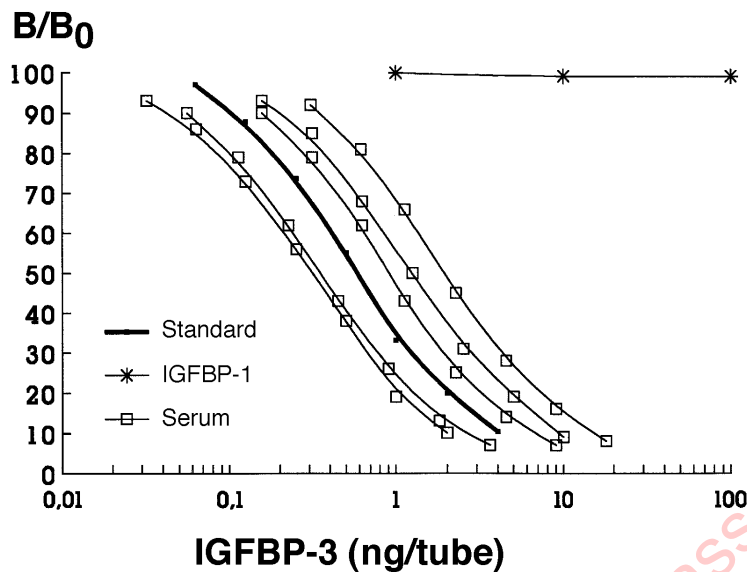


Abb. 4: Repräsentative Verdrängungskurven

Klinische Validierung

Die klinische Validierung erfolgte durch Bestimmung der IGFBP-3-Spiegel bei einer großen Zahl gesunder Kinder und Erwachsener, minderwüchsiger Kinder ohne Wachstumshormonmangel, Mädchen mit Ullrich-Turner-Syndrom, Kindern mit Silver-Russell-Syndrom, Patienten mit WH-Mangel, Kindern mit familiärem Hochwuchs, Sotos-Syndrom, Patienten mit Akromegalie und Kindern mit Pubertas praecox oder verfrühter Thelarche (Tab. 1; Abb. 1, 2, 3, 5 und 6).

Proben: Art, Gewinnung und Lagerung

Serum und Plasma ergeben vergleichbare Werte, weder zugesetztes Citrat noch Heparin oder EDTA beeinflussen die Messergebnisse im Vergleich zum Serum. Blutproben können zu beliebiger Tageszeit abgenommen werden. Vollblut sollte

innerhalb 2 Stunden verarbeitet und bis zur Messung bei -20°C aufbewahrt werden. IGFBP-3-Werte werden normalerweise durch unachtsame Probenbehandlung und -lagerung kaum beeinflusst. Unverdünnt bleiben sie über mehrere Tage sowohl in normalen als auch diversen klinischen Situationen selbst bei erhöhter Temperatur stabil. Die Stabilität der verdünnten Proben ist jedoch stark herabgesetzt (s. Kapitel Probenvorbereitung für nötige Vorsichtsmaßnahmen). Unverdünnte Proben sollten bei -20°C in Plastiksraubgefäßen aufbewahrt werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen sollte vermieden werden, obwohl sich zeigen ließ, dass IGFBP-3-Spiegel in normalen Seren auch nach 10 Frier-/Tauzyklen stabil blieben. Tiefgefrorene Proben sind über Jahre stabil.

Erforderliches Probenvolumen: 10 µl Serum oder Plasma.

MATERIALIEN

Inhalt der Testpackung

Die im Kit gelieferten Reagenzien und beschichteten Röhrchen sind ausreichend für 100 Bestimmungen einschließlich der Standardkurve.

2xDB Verdünnungspuffer-Konzentrat

(1 Fläschchen, 125 ml, 2fach-Konzentrat, blau gefärbt)

R Fang-Antikörper: anti-Kaninchen-IgG, biotinyliert

(1 Fläschchen, 5,5 ml, lyophilisiert)

S Spezifischer Antikörper (Kaninchen-anti-hIGFBP-3)

(1 Fläschchen, 5,5 ml, lyophilisiert, blau gefärbt)

C Tracer: ¹²⁵I-IGFBP-3; < 1,5 µCi oder < 55 kBq

(1 Fläschchen, 11 ml, lyophilisiert, rot gefärbt)

F - J Standards (Konzentrationen auf den Etiketten in ng/ml)
(5 x je 1 Röhrchen á 500 µl, lyophilisiert)

M+N Kontrollen (Konzentrationen auf den Etiketten in mg/l)
(2 Röhrchen, á 100 µl, Human-Serum, lyophilisiert)

T Röhrchen
(100 Stück, beschichtet mit Streptavidin)

Zusätzlich benötigte Reagenzien und Geräte

1) Pipetten: 10 ml, 500 µl, 250 µl, 100 µl, 10 µl;

Multipipetten: 50 µl, 100 µl, 500 µl, 1 ml

2) Schüttler empfohlen

3) Gammazähler

VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

Nach Erhalt sollte der Test-Kit bei **2 - 8°C** (rekonstituierte Reagenzien bei **-20°C**) bis zum Verfallsdatum gelagert werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen ist zu vermeiden. Bei sachgemäßer Handhabung ist die Haltbarkeit der Reagenzien nach Öffnung nicht beeinträchtigt. Eventuelle Salzurückstände auf den Röhrchen (T) sind produktionsbedingt unvermeidbar - die Funktion ist nicht beeinträchtigt.

2xDB vor Gebrauch auf 250 ml mit **A. dest.** auffüllen

(→Testpuffer DB)

R in **5,5 ml Testpuffer (DB)** rekonstituieren

S in **5,5 ml Testpuffer (DB)** rekonstituieren

C in **11 ml Testpuffer (DB)** rekonstituieren.

F-J Jedes Röhrchen in **500 µl Testpuffer (DB)** rekonstituieren

M+N In je **100 µl Testpuffer (DB)** rekonstituieren. Die Verdünnungen der Kontrolle sollten entsprechend der Probenverdünnungen durchgeführt werden (z.B. 1 : 300).

Es sollte sichergestellt sein, dass die lyophilisierten Materialien vollständig rekonstituiert sind. Hierfür empfiehlt es sich, diese nach Zugabe der entsprechenden Puffer eine halbe Stunde bei Raumtemperatur stehen zu lassen und sie anschließend kräftig mit einem Vortex-Mixer zu mischen. Dies gilt vor allem für die **Kontrollen M und N!**

Probenvorbereitung

Serum- oder Plasmaproben sollten entsprechend der zu erwartenden Werte mit **Testpuffer (DB)** 1:100 - 400 verdünnt werden. Normalerweise ist eine Verdünnung von 1:300 ausreichend.

WICHTIG: Da IGFBP-3 in verdünnten Lösungen relativ instabil ist, bitte nur gekühlten, möglichst eiskalten, **Testpuffer (DB)** verwenden. Die Probe nach Zugabe in **Testpuffer (DB)** sofort gut mischen. Die Zeit zwischen Probenverdünnung und Inkubation des Assays bitte möglichst kurz halten, d.h. verdünnte Proben schnellstens weiter bearbeiten.

Beispiel: 10 µl Serum oder Plasma mit 3 ml **Testpuffer (DB)** mischen (1:301).

Die Verdünnungen der **Kontrollen (M) und (N)** sollten in gleicher Weise wie die der Proben erfolgen.

TESTDURCHFÜHRUNG

Die Proben (Standards und Patientenproben) sollten stets als Doppelbestimmung durchgeführt werden. Um optimale Ergebnisse zu erhalten, ist auf genaues Pipettieren und strikte Befolgung des Testprotokolls zu achten.

Schema des Testprotokolls

Nr.	Röhrchen	F-N Proben	R	S	C
1,2	TC	---	---	---	100
3,4	NSB	DB: 150	50	---	100
5,6	Bo	DB: 100	50	50	100
7-16	Standards	F-J: 100	50	50	100
17,18	hohe Kontrolle	M: 100	50	50	100
19,20	niedrige Kontrolle	N: 100	50	50	100
21,22	Probe 1	100	50	50	100
23,24	Probe 2	100	50	50	100
etc.					

(Alle volumina in μl).

1) Beschriftung der Röhrchen:

- 1, 2 Gesamtaktivität (**total counts, TC**),
- 3, 4 unspezifische Bindung (**non-specific binding, NSB**),
- 5, 6 **Testpuffer (DB) (Nullstandard, B₀)**,
- 7 - 16 **Standards (F – J)** als Doppelwerte,
- 17, 18 **Hohe Kontrolle (M)**,
- 19, 20 **Niedrige Kontrolle (N)**,
- ab 21 **Proben** als Doppelwerte

2) Zugabe von **150 μl Testpuffer (DB)** zu Röhrchen 3 und 4.

3) Zugabe von **100 µl Testpuffer (DB)** zu Rörchen 5 und 6
(Nullstandard, B₀).

4) Zugabe von je **100 µl der Standards (F – J)**:

7, 8 Standard F

9, 10 Standard G

11, 12 Standard H; usw. bis 16

5) Zugabe von **100 µl** verdünnter hoher **Kontrolle (M)** zu Rörchen 17 und 18.

6) Zugabe von **100 µl** verdünnter niedriger **Kontrolle (N)** zu Rörchen 19 und 20.

7) Zugabe von **100 µl** verdünnter **Probe** zu Rörchen 21 und 22, etc.

8) Zugabe von **50 µl Fang-Antikörper (R)** ab Rörchen 3.

9) Zugabe von **50 µl Spez. Antikörper (S)** ab Rörchen 5.
-Alle Lösungen sind **stärker blau** gefärbt!-

10) Zugabe von **100 µl Tracer (C)** zu allen Rörchen.

Rörchen 1 und 2 (**Gesamtaktivität**) markieren, mit Stopfen verschließen oder bis zum Schritt 15) beiseite stellen.

-Alle Lösungen sind **violett** gefärbt!-

11) Inkubationsbedingungen:

über Nacht (mind. 15 Stunden) bei **Raumtemperatur** auf einem Schüttler mit **350 Upm.**

Ohne Schüttler müssen die Proben mit dem Vortexer gut gemischt werden. Dann kann ebenfalls über Nacht bei Raumtemperatur (mit etwas geringerer Bindung) oder für **2 Tage** (bzw. über das Wochenende) bei **2-8°C** inkubiert werden.

- 12) Flüssigkeit ab Röhren 3 dekantieren oder vollständig absaugen, dabei darf die Beschichtung der Röhren nicht beschädigt werden.
- 13) Waschen durch Zugabe von je **500 µl Testpuffer (DB)**.
- 14) Flüssigkeit vollständig dekantieren oder absaugen, siehe Punkt 12.
- 15) Die Aktivität **aller** Röhren im Gamma-Counter für **1 (bis 3) min** zählen.

Alternatives Pipettierschema für die Arbeitsschritte 8 und 9

Die rekonstituierten Reagenzien S (Spez. Antikörper) und R (Fang-Antikörper) extern (1:1) mischen, davon 100 µl ab Röhren 3 zugeben.

Bei dieser Variante ist eine Bestimmung der unspezifischen Bindung NSB nicht mehr möglich, bitte den Wegfall der NSB bei Pipettierschema und Auswertung berücksichtigen!

AUSWERTUNG

Erstellung der Standardkurve

Die bereitgestellten Standards enthalten folgende IGFBP-3-Konzentrationen:

Standard	F	G	H	I	J
ng/ml	1	3	9	27	81

- 1) Ermittlung des Mittelwerts (MW) der Doppelbestimmungen (entspricht der Bindung B).
- 2) Ermittlung des Mittelwerts (MW) der Röhren 3 und 4 (unspezifische Bindung NSB). Dieser Wert wird von den Mittelwerten der übrigen Bestimmungen abgezogen (entspricht den korrigierten B-Werten).
- 3) Der so korrigierte Mittelwert des Nullstandards (DB), (Röhren 5 und 6) ergibt B_0 .
- 4) Berechnung der Prozentverhältnisse ($\%B/B_0$):
$$\%B/B_0 = B/B_0 \times 100\%$$
- 5) Auftragen von $\%B/B_0$ gegen die Konzentrationen der Standards in halb-logarithmischem oder logit-log Maßstab auf Papier oder per Computerauswertung.
- 6) Qualitätskontrolle 1, Berechnung der unspezifischen Bindung in %:
$$\%NSB/TC = NSB / \text{Gesamtaktivität } TC \times 100\% =$$

$$(MW \text{ Röhren } 3 + 4 / MW \text{ Röhren } 1 + 2) \times 100\%$$

Soll: $\%NSB/TC < 8\%$

Qualitätskontrolle 2, Berechnung des Nullstandards in %:
$$\%B_0/TC = B_0 / \text{Gesamtaktivität } TC \times 100\% =$$

$$(MW \text{ Röhren } 5 + 6 - MW \text{ Röhren } 3 + 4) / MW$$

$$\text{Röhren } 1 + 2 \times 100\%$$

Soll: $\%B_0/TC > 25\%$

Bestimmung der Probenkonzentration

Die Konzentrationswerte (Abszisse), die einem bestimmten % B/B₀ - Wert der Probe entsprechen, werden wie im folgenden Beispiel abgelesen:

mittlere cpm der NSB-Röhrchen: 328 cpm
mittlere cpm des Nullstandards (B₀): 5494 cpm
mittlere cpm der Probe: 2472 cpm

$$\begin{aligned}\%B/B_0 &= (\text{cpm Probe} - \text{NSB}) / (\text{cpm } B_0 - \text{NSB}) \times 100 \% \\ &= (2472 - 328) / (5494 - 328) \times 100 \% \\ &= 0,415 \times 100 \% \\ &= 41,5 \%\end{aligned}$$

Für einen 41,5%-Wert auf der y-Achse (Ordinate) ergibt sich 16,15 ng/ml auf der x-Achse (Abszisse). Dieser Konzentrationswert, der graphisch oder mit Hilfe eines Computerprogramms ermittelt wurde, wird mit dem Verdünnungsfaktor (z.B. 301) multipliziert.

Beispiel : 16,15 ng/ml x 301 = 4861 ng/ml = 4,86 mg/l.

Konzentrationen der Kontrollen

Die aus der Standardkurve ermittelten Werte für die **Kontrollen M** und **N** sollten innerhalb der etikettierten Bereichen liegen

NORMALWERTE

Die IGFBP-3-Spiegel sind bei Kindern stark altersabhängig. Bei Erwachsenen ist dieses Phänomen weniger ausgeprägt. Die Normalbereiche der verschiedenen Altersgruppen, die log-normal verteilt sind, sind in Tab. 1 durch Perzentilen angegeben. In Abb.5 und 6 sind diese Werte graphisch dargestellt. Es wird empfohlen für jedes Labor eigene Normalbereiche aufzustellen.

EINSCHRÄNKUNGEN

IGFBP-3-Spiegel hängen in erster Linie von der Wachstumshormonsekretion ab. Aber auch eine Reihe anderer Faktoren beeinflusst die IGFBP-3 Plasmakonzentration und sie müssen deshalb zur korrekten Interpretation in die Betrachtung mit einbezogen werden. IGFBP-3 Spiegel nehmen während des Fastens (mehr als 1 Tag), bei Malnutrition, Malabsorption, Kachexie, eingeschränkter Leberfunktion, Hypothyreose und Diabetes mellitus ab. Zudem können sie bei chronisch-entzündlichen und malignen Erkrankungen erniedrigt sein. Erhöhte Werte treten bei eingeschränkter Nierenfunktion und vorzeitiger Pubertät auf. In klinischen Situationen, die mit Hyperprolaktinämie einhergehen oder bei Patienten mit Craniopharyngeom können gelegentlich trotz bestehenden Wachstumshormonmangels normale IGFBP-3-Werte auftreten.

In einigen physiologischen (z.B. Schwangerschaft) oder pathologischen Situationen kann IGFBP-3 durch spezifische Proteasen zu niedermolekularen Fragmenten abgebaut werden (16,17), die sich zwar auf das IGFBP-3-Muster im Western-blot auswirken, das Ergebnis des RIAs aber kaum beeinflussen.

Tab. 1: IGFBP-3 Serumkonzentrationen gesunder Probanden in Abhängigkeit vom Alter. Zwischen dem 7. und 17. Lebensjahr wurden die Daten nach Geschlecht getrennt ausgewertet, weil bei den Mädchen der Anstieg der Serumkonzentrationen während der Pubertät meistens 2 Jahre früher erfolgt.

Altersgruppe	Perzentilen														
	0.1	1	5	10	20	30	40	50	60	70	80	90	95	99	
0-1 Woche	0.25	0.33	0.42	0.48	0.57	0.64	0.70	0.77	0.85	0.93	1.05	1.23	1.41	1.81	
1-4 Woche	0.49	0.62	0.77	0.86	0.99	1.10	1.19	1.29	1.40	1.52	1.68	1.93	2.16	2.68	
1-3 Monate	0.55	0.70	0.87	0.98	1.13	1.25	1.36	1.48	1.61	1.75	1.94	2.23	2.52	3.14	
3-6 Monate	0.64	0.80	0.98	1.10	1.25	1.38	1.49	1.61	1.74	1.88	2.07	2.37	2.65	3.24	
6-12 Monate	0.71	0.88	1.07	1.19	1.35	1.48	1.60	1.72	1.85	2.00	2.19	2.49	2.76	3.36	
1-3 Jahre	1.02	1.21	1.41	1.53	1.69	1.82	1.94	2.05	2.17	2.31	2.48	2.74	2.98	3.47	
3-5 Jahre	1.08	1.30	1.52	1.66	1.84	1.99	2.12	2.25	2.39	2.55	2.75	3.05	3.33	3.91	
5-7 Jahre	1.19	1.42	1.66	1.81	2.01	2.16	2.30	2.44	2.59	2.76	2.97	3.29	3.59	4.2	
7-9 J.	Jungen /	1.25	1.48	1.73	1.88	2.07	2.22	2.36	2.50	2.65	2.81	3.02	3.33	3.61	4.22
	Mädchen	1.36	1.61	1.88	2.04	2.25	2.42	2.57	2.72	2.88	3.06	3.28	3.62	3.94	4.58
9-11 J.	Jungen /	1.47	1.73	1.99	2.15	2.36	2.52	2.66	2.81	2.96	3.14	3.35	3.67	3.97	4.57
	Mädchen	1.56	1.90	2.20	2.38	2.62	2.80	2.96	3.13	3.30	3.50	3.75	4.11	4.45	5.16
11-13 J.	Jungen /	1.58	1.88	2.19	2.38	2.63	2.82	3.00	3.18	3.37	3.58	3.84	4.25	4.62	5.39
	Mädchen	1.62	1.90	2.24	2.46	2.74	2.97	3.17	3.38	3.60	3.85	4.17	4.65	5.10	6.02
13-15 J.	Jungen /	1.62	1.89	2.24	2.46	2.76	2.99	3.20	3.42	3.65	3.91	4.24	4.75	5.22	6.20
	Mädchen	1.69	2.03	2.39	2.61	2.91	3.14	3.35	3.56	3.79	4.04	4.36	4.85	5.30	6.24
15-17 J.	Jungen /	1.70	2.02	2.36	2.57	2.84	3.05	3.25	3.44	3.65	3.88	4.17	4.61	5.01	5.86
	Mädchen	1.62	1.93	2.26	2.46	2.73	2.93	3.12	3.31	3.51	3.74	4.02	4.45	4.85	5.67
17-20 J.	1.58	1.90	2.24	2.45	2.72	2.94	3.13	3.33	3.54	3.78	4.07	4.53	4.95	5.83	
20-30 J.	1.55	1.86	2.20	2.41	2.68	2.90	3.09	3.29	3.50	3.74	4.04	4.50	4.92	5.80	
30-40 J.	1.44	1.75	2.08	2.29	2.56	2.78	2.98	3.18	3.39	3.64	3.95	4.42	4.86	5.78	
40-50 J.	1.38	1.68	2.01	2.21	2.48	2.69	2.88	3.08	3.29	3.53	3.83	4.29	4.72	5.63	
50-60 J.	1.34	1.64	1.96	2.16	2.42	2.63	2.83	3.02	3.23	3.46	3.76	4.22	4.65	5.55	
60-70 J.	1.28	1.58	1.90	2.10	2.37	2.58	2.78	2.98	3.19	3.44	3.75	4.23	4.67	5.62	
70-80 J.	1.20	1.50	1.81	2.00	2.27	2.47	2.67	2.87	3.08	3.32	3.62	4.09	4.52	5.44	
> 80 J.	1.13	1.43	1.73	1.92	2.19	2.39	2.59	2.79	3.00	3.23	3.54	4.00	4.44	5.36	

Die Serumkonzentrationen sind in mg/L angegeben

Mit IGFBP-3-RIA gemessen (Blum et al. 1990)
Die Werte für über 70-Jährige sind extrapoliert.

Serumkonz. nach Alter

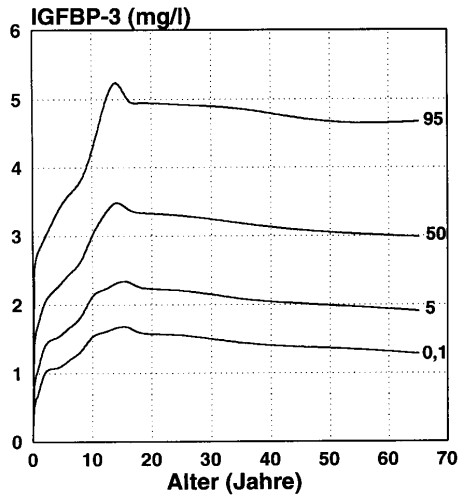


Abb. 5: Altersabhängiger Normalbereich der IGFBP-3-Spiegel (dargestellt als 0,1., 5., 50. und 95. Perzentile)

Kinder und Jugendliche

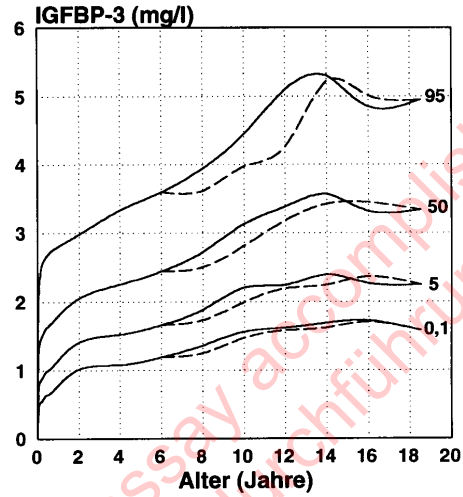


Abb. 6: Normalbereich bei Kindern und Jugendlichen (Mädchen —, Jungen - - -)

Exemplary version - do not use for assay accomplishment!
 Exemplarische Version - nicht zur Assaydurchführung benutzen!

LITERATUR

- 1) Ballard J, Baxter R, Binoux M, Clemmons D, Drop S, Hall K, Hintz R, Rechler M, Rutanen E, Schwander J (1989) On the nomenclature of the IGF binding proteins. Acta Endocrinol (Copenh) 121:751-752
- 2) Wilson EM, Oh Y, Rosenfeld RG (1997) Generation and characterization of an IGFBP-7 antibody: Identification of 31 kD IGFBP-7 in human biological fluids and Hs578T human breast cancer conditioned media. J Clin Endocrinol Metab Vol 82, 4:1301-1303
- 3) Baxter RC (1988) Characterization of the acid-labile subunit of the growth hormone-dependent insulin-like growth factor binding protein complex. J Clin Endocrinol Metab 67:265-272
- 4) Baxter RC, Martin JL (1989) Structure of the Mr 140,000 growth hormone dependent insulin-like growth factor binding protein complex: determination by reconstitution and affinity-labeling. Proc Natl Acad Sci USA 86:6898-6902
- 5) Holman SR, Baxter RC (1996) Insulin-like growth factor-binding protein-3: factors affecting binary and ternary complex formation. Growth Regulation 6: 42-47.
- 6) Baxter RC, Martin J (1986): Radioimmunoassay of growth hormone-dependent insulin-like growth factor binding protein in human plasma. J Clin Invest 78:1504-1512
- 7) Blum WF, Ranke MB, Kietzmann K, Gauggel E, Zeissel HJ, Bierich JR (1990) A specific radioimmunoassay for the growth hormone (GH)-dependent somatomedin-binding protein: its use for diagnosis of GH deficiency. J Clin Endocrinol Metab 70:1292-1298
- 8) Blum WF, Ranke MB (1990) Use of insulin-like growth factor binding protein 3 for the evaluation of growth disorders. Horm Res 34 (Suppl):31-37

- 9) Blum WF (1993) Insulin-like growth factor-binding protein 3: Entwicklung eines Radioimmunoassays und Untersuchungen zur klinischen Bedeutung. Habilitationsschrift, Tübingen.
- 10) Lee PDK, Hintz RL, Sperry JB, Baxter RC, Powell DR (1989) IGF-binding proteins in growth-retarded children with chronic renal failure. *Pediatr Res* 26:308-315
- 11) Blum WF, Ranke MB, Kietzmann K, Tönshoff B, Mehls O (1989) Excess of-IGF-binding proteins in chronic renal failure: evidence for relative GH resistance and inhibition of somatomedin activity. In: Drop SLS, Hintz RL (eds) *Insulin-like Growth Factor Binding Proteins*. Excerpta Medica, Amsterdam, pp 93-101
- 12) Baxter RC, Cowell CT (1987) Diurnal rhythm of growth hormone-independent binding protein for insulin-like growth factors in human plasma. *J Clin Endocrinol Metab* 65:432-440
- 13) Jorgensen JOL, Blum WF, Moller N, Ranke MB, Christiansen JS (1990) Circadian patterns of serum insulin-like growth factor (IGF)-II and IGF-binding protein 3 in growth hormone deficient patients and age- and sex-matched normal subjects. *Acta Endocrinol (Copenh.)* 123:257-262
- 14) Blum WF, Albertsson-Wikland K, Rosberg S, Jorgensen JOL, Ranke MB (1990) Insulin-like growth factor binding protein 3 (IGFBP-3) reflects spontaneous growth hormone (GH) secretion. *Horm Res* 33 (Suppl 3): 3(Abstract)
- 15) Blum WF, Ranke MB (1990) Insulin-like growth factor-binding proteins (IGFBPs) with special reference to IGFBP-3. *Acta Paediatr Scand (Suppl)* 367:55-62
- 16) Giudice LC, Farrell EM, Pham H, Lamson G, Rosenfeld RG (1990) Insulin-like growth factor binding proteins in maternal serum throughout gestation and in the puerperium: effects of a pregnancy-associated serum protease activity. *J Clin Endocrinol Metab* 71:806-816

- 17) Hossenlopp P, Segovia B, Lassarre C, Roghani M, Bredon M, Binoux M (1990) Evidence of enzymatic degradation of insulin-like growth factor-binding proteins in the 150k complex during pregnancy. J Clin Endocrinol Metab 71:797-805
- 18) Ranke MB, Schweizer R, Elmlinger MW, Weber K, Binder G, Schwarze CP, Wollmann HA (2000) Significance of Basal IGF-I, IGFBP-3 and IGFBP-2 Measurements in the diagnostics of short stature in children. Horm Res 2000;54:60-68
- 19) Ranke MB, Schweizer R, Elmlinger MW, Weber K, Binder G, Schwarze CP, Wollmann HA (2001) Relevance of IGF-I, IGFBP-3, and IGFBP-2 Measurements during GH treatment of GH-deficient and non-GH-deficient children and adolescents. Horm Res 2001;54:115-124

Exemplary version - do not use for assay accomplishment!
Exemplarische Version - nicht zur Assaydurchführung benutzen!

KURZANLEITUNG

Reagenzpräparation	Rekonstitution	Verdünnung
Verdünnungspuffer (2xDB)		Vor Verwendung 1:2 mit A.dest.
Fang-Antikörper (R)	in 5.5 ml Testpuffer (DB)	
Spezifischer Antikörper (S)	in 5.5 ml Testpuffer (DB)	
Tracer : ¹²⁵ I-IGFBP-3	In 11 ml Testpuffer (DB)	
Standards (F-J)	in 500 µl Testpuffer (DB)	
Kontrollen (M+N)	in 100 µl Testpuffer (DB)	1:300 mit DB
Probe mit kaltem (2-8°C) Verdünnungspuffer (DB) z.B. 1:300 verdünnen, sofort mischen + schnell verarbeiten.		

Testdurchführung in Doppelbestimmung

Zugabe von Reagenz [µl]					
Nr. der Röhrrchen	Inhalt der Röhrrchen	DB F-N Proben	R	S	C
1,2	Gesamtaktivität	–	–	–	100
3,4	NSB	150 DB	50	–	100
5,6	B ₀	100 DB	50	50	100
7-16	Standards	100 F-J	50	50	100
17,18	hohe Kontrolle	100 M	50	50	100
19,20	niedrige Kontrolle	100 N	50	50	100
21,22	Probe 1	100	50	50	100
23,24 (etc.)	Probe 2 (etc.)	100	50	50	100
Nach Zugabe				Färbung bläulicher	Färbung violett
Nr.:1,2 bis zum Zählen der Aktivität beiseite stellen					
Inkubation , über Nacht (mind. 15 Stunden), bei RT, 350 upm					
Flüssigkeit vollständig dekantieren oder absaugen, dabei die Beschichtung der Röhrrchen nicht beschädigen.					
Waschen durch Zugabe von je 500 µl Testpuffer DB					
Flüssigkeit vollständig dekantieren oder absaugen (s.o.)					
Zählen der Aktivität alle Röhrrchen mit einem Gammazähler					