

Exemplary version, do not use to perform assays

# IGF-I – RIA-CT

Radioimmunoassay mit beschichteten Röhrchen zur quantitativen Bestimmung von

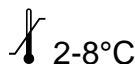
## Insulin-like Growth Factor-I

(IGFBP blockiert)

Deutsch

Europäische Union / European Union  
für In-vitro-Diagnostik / For In Vitro Diagnostic Use

All other countries: For Research Use Only.




REF **R22**

DE/CA40/00809/33



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](mailto:contact@mediagnost.de) • <http://www.mediagnost.de>

**EN/ DE/ FR/ IT/ ES/ PT/ NL/ DK/ SE/ PL/ HU/ SK/ CZ/ BG/ EE/ GR/ RO/ SL/ FI**

**Symbols/ Symbole /Symboles/ Simboli/ Símbolos/ Símbolos/ Symbolen/ Symboler/ Symboler/ Symbole/ Szimbólumok/ Symboly/ Symboly/ Символы/ Sümbolid/ Σύμβολα/ Simboluri/ Simboli/ Symbolit**

**DIN EN ISO 15223-1**



Expiry date/ Verfallsdatum/ Date de péremption/ Data di scadenza/ Fecha de caducidad/ Data de validade/ Uiterste gebruiksdatum/ Udløbsdato/ Bäst före-datum/ Termin ważności/ Lejárati idő/ Čas expirácie/ Doba expirace/ Срок на годност/ Αεγυμίσκυυρᾱεῖν/ Ημερομηνία λήξης/ Data de expirare/ Rok uporabe/ Viimeinen käyttöpäivä



Consider instructions for use/ Bitte Gebrauchsanweisung beachten/ Consultez la notice d'utilisation/ Consultare le istruzioni per l'uso/ Consulte las instrucciones de uso/ Respeitar as instruções de utilização/ A.u.b de gebruiksaanwijzing volgen/ Se brugsanvisningen/ Läs anvisningarna före användning/ Proszę przeczytać instrukcję obsługi/ Vegye figyelembe a használati utasításban foglaltakat/ Postupujte podľa pokynov na použitie/ Dodržujte návod k použití/ Моля, спазвайте инструкцията за употреба/ Palun järgige kasutusjuhendit/ Λάβετε υπόψη σας τις οδηγίες χρήσης/ Vă rugăm să respectați instrucțiunile de utilizare/ Upoštečajte navodila za uporabo/ Lue käyttöohje huolellisesti!



In vitro Diagnostic Medical Device (for in vitro diagnostic use)/ In-vitro-Diagnostikum (zur In-vitro-Diagnostik)/ Dispositif médical de diagnostic in vitro (Pour usage diagnostique in vitro)/ Dispositivo medico per diagnostica in vitro (per uso diagnostico in vitro)/ Dispositivo médico de diagnóstico in vitro (para uso diagnóstico in vitro)/ Dispositivo Médico para Diagnóstico in vitro (Para Utilização de Diagnóstico in vitro)/ Medisch hulpmiddel voor diagnostiek in vitro (voor diagnostisch gebruik in vitro)/ Medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik (Udelukkende til in vitro diagnostisk anvendelse)/ Medicinteknisk produkt avsedd för in vitro-diagnostik (för in vitro-diagnostiskt bruk)/ Wyrób medyczny do diagnostyki in vitro/ In vitro orvosdiagnosztikai termék (in vitro diagnosztikai használatához)/ In vitro diagnostický zdravotnícký materiál (určené na diagnostiku „in vitro“)/ In vitro diagnostický zdravotnícký materiál (určeno pro diagnostiku „in vitro“)/ Медицинско устройство за ин-витро диагностика (за ин-витро диагностика)/ in vitro diagnostikaseade (in vitro diagnostika tegemiseks)/ In vitro διαγνωστικό (για διάγνωση in vitro)/ Dispozitiv de diagnosticare in vitro (pentru diagnosticarea in-vitro)/ In vitro diagnostika (o in vitro diagnostiki)/ in vitro-diagnostiikkakäyttö



Lot-Batch Number/ Charge-Chargennummer/ Lot-Code du lot/ Lotto-Numero di lotto/ Lote-Código de lote/ Lote-Código do Lote/Lot-Partijnummer/ Lot-Batchcode/ Partisatskod/ Numer serii/ Tétel-sarzs szám/ Číslo šarže/ Číslo šarže/ Партиден номер/Partii number/ Παρτίδα-αριθμός παρτίδας/ Lot-numär lot/ Številka serije/ erä



Manufactured by/ Hergestellt von/ Fabriqué par/ Prodotto da/Fabricado por/ Fabricado por/ Vervaardigd doo/Fabrikation af /Tillverkad av/ Wyprodukowane przez/ Gyártotta / Vyrobéné/ Vyrobeno v/ Производител/ Τοοτjα/ Κατασκευάζεται από/ Produs de/ Proizvajalec/ Valmistaja



Catalogue Number/ Bestellnummer/ Numéro de référence/Numero di riferimento/ Número de referencia/ Número de Referência/ Referentienummer/ Referencenummer /Beställningsnummer/ Numer katalogowy/ Rendelési szám/Katalógóvé číslo/ Objednacé číslo/Καταλογος αριθμός/Tellimisnumber/ Αρ. παραγγελίας/Numär comandă/ Številka naročila/ viite tai tilausnumero



Store at between/ Lagerung bei zwischen/ Conserver à entre/ Conservare a tra/ Conservar a temp. Entre/ Armazenaar entre/ Bewaar bij tussen/ Opbevares mellem/ Förvaras vid/ Przechowywać w/ Tárolási tartomány/ Skladujte v rozsahu / Skladujte v rozmezí/ Температурно ограничение/ Säilittada temperatuuridel/ Φύλαξη σε θερμοκρασία/ Depozitare între/ Skladiščenje med/ Säilytys x-y Celsiusasteen lämpötilassa



Contains sufficient for x tests/ Inhalt ausreichend für x Tests/ Contient suffisant pour x tests/ Contenuto sufficiente per x test/ Contenido suficiente para x pruebas/ Conteúdo suficiente para x testes/ Bevat voldoende voor x bepalingen/ Indeholder tilstrækkeligt til x prøver/ Innehållet räcker till x analyser/ Zawartość na x testów/ Tartalma x teszt elvégzésére elegendő/ Obsahuje materiál pre x testov/ Obsah dostačuje pro x testů/ Съдържание достатъчно за x тестове/ Sisust jätkub x katse jaoks/ Το περιεχόμενο επαρκεί για x δοκιμές/ Conținut suficient pentru x teste/ Vsebina zadostuje za x preizkusov/ Sisältö riittää x testille



Radioactive/ radioaktiv/ Radioactif/ Radioattivo/ radioactivo/ radioactief/ radioaktiv/ radioaktiv/ radioaktywny /radioaktív/ rádioaktívne/ radioaktívni/ радиоактивно/ radioaktiivne/ Ραδιενεργό/radioactive/ radioaktivno/ radioaktiivinen



Keep away from sunlight/ Nicht dem Sonnenlicht aussetzen/ Conserver à l'abri de la lumière/ Conservare al riparo della luce solare/ No exponer a la luz solar/ Proteger da luz solar/ Niet aan zonlicht blootstellen/ Må ikke udsættes for sollys/ Utsätt inte för solljus/ Nie wystawiać na słońce/ Napfénytől távol tartandó/ Nevystavovat' sinečnému svetlu/ Nevystavovat sluwnečnúmu svétlu/ Да се предпазва от слънчева светлина/ Kaitsta otsese päikesekiirguse eest/ Κρατήστε το μακριά από την ηλιακή ακτινοβολία/ Τίμητέ τη de parte de lumina soarelui/ Ne izpostavljajte sončni svetlobi/ suojaa auringonvalolta

**T**

Streptavidin-coated Tubes/ Streptavidin-beschichtete Röhrchen/ tubes revêtus de streptavidine/ Provette rivestite di streptavidina/ Tubos recubiertos con estreptavidina/ Tubos revestidos com Streptavidina/ buisjes met streptavidin gecoat/ Streptavidin-coatede rør/ streptavidinbelagda rör/ Rurki z powłoką streptawidynowym/ Streptavidin-bevonatú csővecskék/ Rúrky s vrstvou streptavidínu/ Trubičky s vrstvou streptavidínu/ Натоварени със стрептавидин епруветки/ Streptavidiiniga kaetud torukeseid/ Σωληνίσκοι επικαλυμμένοι με στρεπταβιδίνη/ Eprubete acoperite Streptavidin/ Cevčice, prekrite s streptavidinom/ Streptavidiinilla pinnoitetut putket

**A**

Buffer/ Puffer/ Tampon / Tampone/ Tampón/ Tampão/ Buffer/ Buffer / buffer / Bufor / / puffer/ pufor /pufr/ Буфер/ puhver/ Ρυθμιστικό/ Tampon/ Puffer/ Puskuri

**DB**

Dilution Buffer/ Verdünnungspuffer/ Tampon de dilution/ Tampone di diluizione/ Tampón de dilución/ / Tampão de diluição/ Verdunningsbuffer/ Fortyndingsbuffer/ Utspädningsbuffert/ Bufor rozcieńczający/ / Hígító puffer/ Riediaci pufor/ Ředící pufr/ Буфер за разреждане/ Lahjenduspuhver/ Ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης/ Tampon de diluare/ Puffer za redčenje/ Laimennuspuskuri

## Exemplary version, do not use to perform assays

<b>C</b>	Tracer/ Tracer/ Traceur/ Tracciatore/ Trazador/ Marcador/ tracer/ Tracer/ spårämne/ Indikator/ Nyomjelző/ Indikátor/ Indikátor/ Трейсер/ Kandur/ Ιχνηθέτης/ Indicator/ Sledilna snov/ indikaattori
<b>R</b>	Capture Antibody/ Fang-Antikörper/ Anticorps de capture/ Anticorpo di cattura/ Anticuerpos de captura/ Anticorpo de captura/ vanger-antilichaam/ Fæstet antistof/ fångande antikropp/ Przechwytywanie antycial/ Elfogó antitest/ Zachytenie protilátky/ Zachycení protilátky/ Захващащо антицяло/ Naarde-antikehad/ Ακίνητοποιημένο αντίσωμα/ Captură anticorpi/ Lovilina protitelesa/ sekundäärinen vasta-aine
<b>S</b>	Specific Antibody/ spezifischer Antikörper/ Anticorps spécifique/ Anticorpo specific/ Anticuerpos específicos/ Anticorpo específico/ specifieke antilichaam/ Specifisk antistof/ specifik antikropp/ Określone antyciala/ specifikus antitest/ Špecifická protilátka/ Špecifická protilátka/ Специфично антицяло/ eriomased antikehad/ Ειδικό αντίσωμα/ anticorpi specifici/ Specifična protitelesa/ spesifinen vasta-aine
<b>F-J</b>	Calibrator X/ Kalibrator X/ calibreur X/ calibratore X/ calibrador X/ calibrador X/ kalibrator X/ kalibrator X/ kalibrator X/ kalibrator X/ kalibrátor X/ kalibrátor X/ kalibrátor X/ kalibrátor X/ калибратор X/ kalibraator X/ Βαθμονομητής X/ calibrator X/ kalibrator X/ kalibraattori X
<b>M-N</b>	Control X/ Kontrolle X/ Contrôle X/ controllo X/ control X/ Controle X/ controle X/ Kontrol X/ Kontroll X/ kontrolne X/ Ellenőrző X/ Kontrolné X/ Kontrolní X/ Контролен X/ Kontroll X/ ελέγχου X/ control X/ Kontrolni X/ Kontrolli X
<b>Rec. in</b>	Reconstitute in/ Rekonstituieren in/ Reconstituer dans/ Ricostituire nel/ Reconstituir en/ Reconstituir em/ reconstituieren in/ Rekonstituér i/ rekonstituera/ Rekonstytuować w/ Helyreállítás/ Znovu pripravit' za/ Znovu připravit za/ Разтваряне в/ Moodustada uuesti/ Ανασυστήστε σε/ Reconstituire în/ Predelava v/ rekonstituoi

## Inhaltsverzeichnis

<b>EIGENSCHAFTEN</b>	<b>4</b>
<b>WISSENSCHAFTLICHER HINTERGRUND</b>	<b>4</b>
<b>Klinische Bedeutung</b>	<b>6</b>
<b>TESTPRINZIP</b>	<b>7</b>
<b>Einsatzmöglichkeiten</b>	<b>8</b>
<b>SICHERHEITSHINWEISE</b>	<b>9</b>
<b>Allgemein</b>	<b>9</b>
<b>Radioaktivität</b>	<b>10</b>
<b>ASSAY-EIGENSCHAFTEN UND VALIDIERUNG</b>	<b>11</b>
<b>Klinische Validierung</b>	<b>12</b>
<b>Proben: Eignung, Vorbereitung und Lagerung</b>	<b>12</b>
<b>MATERIALIEN</b>	<b>13</b>
<b>Inhalt der Testpackung</b>	<b>13</b>
<b>Zusätzlich benötigte Reagenzien und Geräte</b>	<b>13</b>
<b>VORBEREITUNG DER REAGENZIEN</b>	<b>13</b>
<b>PROBENVORBEREITUNG</b>	<b>14</b>
<b>TESTDURCHFÜHRUNG</b>	<b>14</b>
<b>AUSWERTUNG</b>	<b>17</b>
<b>Erstellung der Kalibrationskurve</b>	<b>17</b>
<b>Bestimmung der Probenkonzentration</b>	<b>18</b>
<b>Konzentration der Kontrolle</b>	<b>19</b>
<b>NORMALWERTE</b>	<b>19</b>
<b>EINSCHRÄNKUNGEN</b>	<b>20</b>
<b>Assay Eigenschaften und Validierung</b>	<b>23</b>
<b>LITERATUR</b>	<b>25</b>
<b>Kurzanleitung</b>	<b>28</b>

**Vor Gebrauch ist die gesamte Packungsbeilage zu lesen!**

## EIGENSCHAFTEN

- ◆ Hohe Spezifität für IGF-I
- ◆ Korrekte Messung von IGF-I in nicht-extrahierten Proben
- ◆ Vermeidung der Interferenz mit IGF-Bindungsproteinen durch einen hohen Überschuss an IGF-II
- ◆ Keine Probenvorbereitungen wie physikalische Abtrennung des IGF-I von seinen Bindungsproteinen erforderlich
- ◆ Einfache Handhabung:
  - gebrauchsfertige Kalibratorlösungen
  - Separation durch spezifische Beschichtung der Röhren, keine Zentrifugation nötig
- ◆ Sichereres Abarbeiten durch gefärbte Lösungen
- ◆ 100% Wiederfindung von IGF-I führt zu richtigen Absolutwerten
- ◆ Kleine Probenvolumina machen den Test ideal für junge Patienten

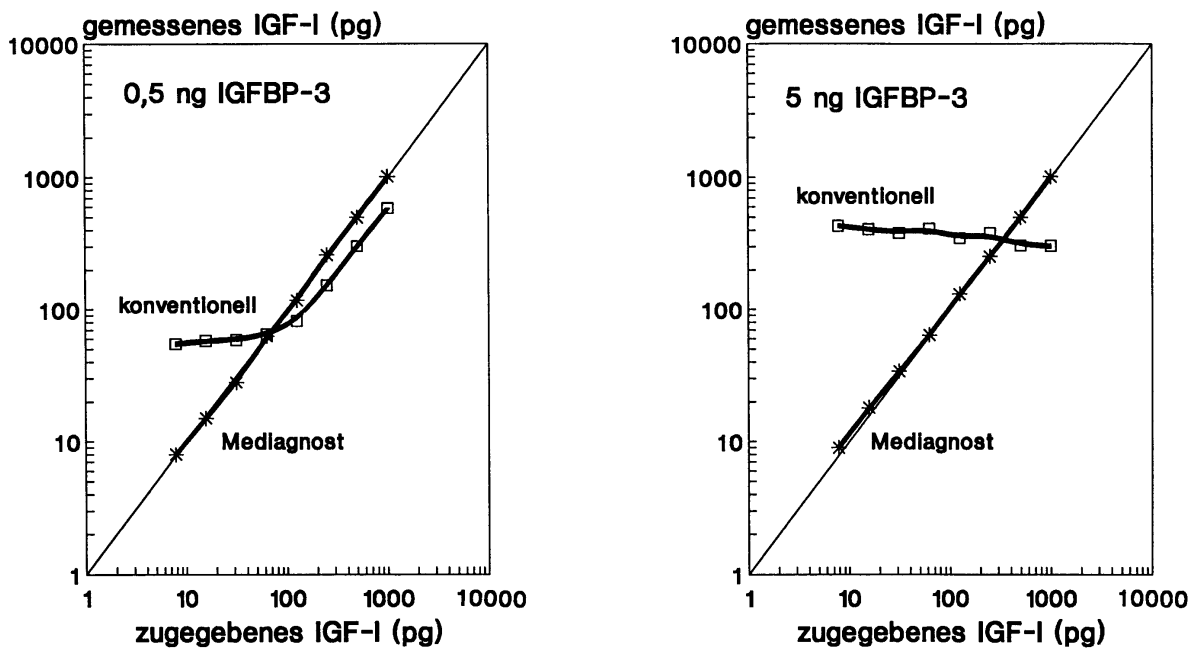
## WISSENSCHAFTLICHER HINTERGRUND

Insulin-like growth factors (IGF)-I und -II spielen eine Schlüsselrolle bei der Regulation von Proliferation, Differenzierung und spezifischer Funktionen vieler Zelltypen (1-3). IGF-I ist identisch mit Somatomedin C (Sm-C) (4) und hat ein Molekulargewicht von 7649 Dalton (5). Seine wichtigsten Regulatoren sind das Wachstumshormon (WH) und die Ernährung, wenn auch seine Synthese in spezifischen Geweben durch eine Vielzahl tropischer Hormone und anderer Peptid-Wachstumsfaktoren beeinflusst wird.

Im Gegensatz zu vielen anderen Peptidhormonen sind IGFs mit hoher Affinität an spezifische Bindungsproteine (IGFBP) gebunden. Sieben Klassen von Bindungsproteinen sind derzeit bekannt (7,8,22). Sie binden entweder IGF-I und IGF-II mit ähnlicher Affinität oder weisen eine Präferenz für IGF-II auf (9,10).

Ein Hauptproblem bei der Messung von IGF-I resultiert aus der Interferenz mit IGFBPs im Assay. Die direkte Bestimmung in unbehandelten Serumproben (11) führt zu falschen Ergebnissen, weil auf Grund der extrem langsamen Dissoziation des IGF-I/IGFBP-3-Komplexes während der Assay-Inkubationszeit nur ein Teil des IGF-I der Messung zur Verfügung steht. In Abhängigkeit vom Verhältnis von IGF-I zu IGFBPs in der Probe kommt es zu folgenden Interferenzen:

- bei niedrigen IGF-I-Konzentrationen erfolgt IGFBP-Komplexierung vorwiegend mit IGF-I-Tracer, was beim kompetitiven RIA zu falsch hohen Werten führt: Überschätzung niedriger IGF-I-Spiegel
- bei hohen IGF-I Konzentrationen wird vorwiegend unmarkiertes IGF-I aus der Probe von den IGFBPs komplexiert und damit der Messung entzogen: Unterschätzung hoher IGF-I Spiegel (Abb. 1).



**Abb. 1:** Interferenz von IGFBP bei IGF-I-Messungen. Bekannte IGF-I-Konzentrationen wurden in Gegenwart von 0,5 ng (links) bzw. 5 ng (rechts) hIGFBP-3 mit einem konventionellen RIA (□) oder dem IGFBP-blockierten RIA (\*) gemessen.

Deshalb wurden verschiedene Verfahren entwickelt, um vor der eigentlichen Messung IGF-I von seinen Bindungsproteinen abzutrennen: (a) Ausschlusschromatographie unter sauren Bedingungen, (b) Festphasenextraktion und (c) Säure-Alkohol-Extraktion (2,12,13). Diese Methoden sind jedoch entweder umständlich und zeitaufwendig oder führen zu unvollständiger und vor allem nicht reproduzierbarer Wiederfindung. Die an der weitesten verbreiteten Methode ist die Säure-Alkohol-Extraktion (13,14). Infolge von Co-Präzipitation ergibt sie jedoch nur eine Ausbeute von 70 - 80 % des gebundenen IGF-I. Die gemessenen Absolutwerte nach einem solchen Extraktionsschritt sind deshalb falsch niedrig (15). Die Extraktionsprozedur führt zu einer Vorverdünnung der Proben und dadurch zu einer verminderten Sensitivität des Assays. Zudem wird durch die Extraktion IGFBP nur unzureichend entfernt.

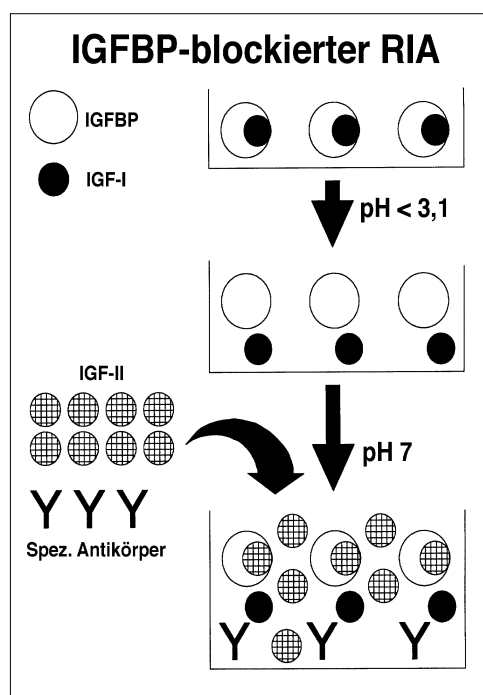
Die im Extrakt verbleibenden IGFBPs können den Assay immer noch stören. Abgesehen von Serum oder Plasma ist die Säure-Alkohol-Extraktion in anderen Proben (z.B. Zellkulturmedien) völlig ineffektiv. Gerade hier ist die IGF-I-Bestimmung besonders schwierig, da diese Proben häufig einen hohen Überschuss an IGFBPs enthalten.

Um diese Schwierigkeiten zu umgehen, wurde ein einfacher Assay entwickelt, der vor der eigentlichen Messung keine besondere Probenvorbereitung erfordert, abgesehen von einer Ansäuerung oder Verdünnung in einem speziell zusammengesetzten Puffersystem.

### **Klinische Bedeutung**

Abgesehen von WH beeinflussen eine Anzahl von Faktoren den Serum-IGF-I-Spiegel. Erniedrigte Werte werden bei Malnutrition/Malabsorption, Hypothyreose, Lebererkrankungen, unbehandeltem Diabetes mellitus, chronisch-entzündlichen Erkrankungen (1,6), malignen Erkrankungen oder Polytrauma gefunden. Hohe Spiegel lassen sich bei Pubertas praecox oder Adipositas finden. Entscheidend für die korrekte Interpretation von IGF-I-Bestimmungen ist die Berücksichtigung der Altersabhängigkeit der IGF-I-Spiegel. Es ist sicher unangebracht, für alle Altersgruppen einen allgemeinen Normalbereich festzulegen, dies gilt speziell bei Kindern und Jugendlichen (altersabhängige Normalwerte siehe Tab. 2 und Abb. 3-6).

Auf Grund seiner WH-Abhängigkeit sind Bestimmungen von Serum-IGF-I für die Diagnostik von Wachstumsstörungen von großem Nutzen, speziell im Hinblick auf WH-Mangel oder Akromegalie (6, 16-19, 23,24). Der wichtigste Vorteil der IGF-I-Bestimmung im Vergleich zur WH-Bestimmung ist seine stabile zirkadiane Konzentration, d.h. eine Einzelmessung ist ausreichend informativ. IGF-I -Bestimmungen sollten deshalb in der Labordiagnostik an erster Stelle stehen. Eindeutig normale Spiegel schließen eine Störung der WH-IGF-I-Achse aus. Niedrige Spiegel, d.h. Spiegel nahe oder unter der altersbezogenen 5. Perzentile machen weitere diagnostische Schritte notwendig. Subnormale IGF-I-Spiegel können ein Anzeichen für eine eingeschränkte WH-Sekretion sein, falls andere Ursachen für niedriges Serum-IGF-I wie Mangelernährung oder eine beeinträchtigte Leberfunktion ausgeschlossen sind. Für die Unterscheidung von gesunden minderwüchsigen Kindern ohne WH-Mangel von Kindern mit "klassischem" WH-Mangel erwies sich die 0,1. Perzentile als günstige Trenngrenze. Dies gilt speziell ab einem Alter von 8 Jahren. Es muss jedoch angemerkt werden, dass kleinwüchsige Kinder ohne WH-Mangel mit ihren Werten sehr wohl zwischen der 0,1. und 5. Perzentile liegen können (19). Im Gegensatz dazu ist die Akromegalie durch pathologisch erhöhte IGF-I-Spiegel gekennzeichnet, die offensichtlich den Schweregrad der Erkrankung besser reflektieren als WH-Messungen (17,18,20).



## TESTPRINZIP

Um IGF-I von den IGF-BSPs zu dissoziieren, müssen die Proben in einem sauren Puffer verdünnt werden (Abb. 2). Die verdünnten Proben werden dann in die Streptavidin-beschichteten Teströhrchen pipettiert. Das IGF-I-Antiserum ist in einem Puffer verdünnt, der einen Überschuss an IGF-II enthält und der in der Lage ist, die sauren Proben zu neutralisieren. Nachdem die IGF-I-Antikörperlösung die Probe neutralisiert hat, besetzt das in hohem

**Abb 2.:** Prinzip des IGF-BSP-blockierten IGF-I-RIA

Überschuss vorhandene IGF-II die IGF-Bindungsstellen der Bindungsproteine. Dies erlaubt die problemlose Messung des nun freien IGF-I. Bei diesem Verfahren werden also nicht die IGFBP-Moleküle per se entfernt, sondern lediglich deren Funktion und damit ihre Interferenz im Assay neutralisiert. Wegen der extrem niedrigen Kreuzreaktivität des IGF-I-Antiserums mit IGF-II stört der hohe Überschuss an IGF-II die Interaktion des ersten Antikörpers mit IGF-I oder IGF-I-Tracer nicht. Im weiteren Verlauf wird dieser erste Immunkomplex (Antigen - spez. Antikörper) zur Trennung von gebundenem und freiem Tracer unter Verwendung des Fang-Antikörpers an die Streptavidin-beschichteten Röhrchen gebunden. Dadurch entfallen zeitaufwendige Zentrifugationen und Abtrennungen. Die Färbung der Lösungen ermöglicht Ihnen bei der Abarbeitung des Testes den jeweiligen Arbeitsschritt für jedes einzelne Röhrchen zu erkennen. Dadurch wird eine Kontrolle des Pipettierschemas erleichtert. Die Kalibratoren, der Verdünnungspuffer und der Ansäuerungspuffer (und damit auch die verdünnten Proben) sind durch Zusatz eines pH-Indikatorfarbstoffes grün gefärbt.

Nach Zugabe der ungefärbten IGF-I-Antikörperlösung wechselt die Farbe durch die Neutralisation zu blau. Im letzten Schritt wird durch Zugabe der rot gefärbten Tracerlösung der gesamte Ansatz violett.

### **Einsatzmöglichkeiten**

Dieser Radioimmunoassay-Kit ist für die wissenschaftliche und diagnostische Messung von IGF-I in humanem Serum oder Plasma geeignet.

Auf Grund der guten Kreuzreaktion des spezifischen Antikörpers mit IGF-I von anderen Säugetierspezies kann der RIA-Kit auch als heterologer Assay zur Messung von IGF-I in Primaten, Rind, Schwein, Schaf, Ratte, Katze, Huhn, Meerschweinchen, Ziege, Maus, Pferd, Esel und Hund verwendet werden.



## **SICHERHEITSHINWEISE**

### **Allgemein**

Sämtliche Reagenzien dürfen ausschließlich für in-vitro-Zwecke verwendet werden! Nur zum Gebrauch durch Fachpersonal

Der Erwerb, Besitz, die Verwendung und Entsorgung des Kits unterliegen den Bestimmungen der nationalen Aufsichtsbehörden.

Der Assay ist strikt nach dem Testprotokoll durchzuführen.

Reagenzien mit unterschiedlichen Lot-Nummern sollten nicht vermischt werden.

Die Reagenzien enthalten als Konservierungsmittel Na-Azid, allerdings sehr verdünnt (0,02%). Sicherheitsdatenblatt auf Anfrage erhältlich.

Bitte verwenden Sie keine abgelaufenen, offensichtlich beschädigten, mikrobiell kontaminierten oder ausgelaufenen Reagenzien.

**VORSICHT:** Dieser Kit enthält Material humanen und/oder tierischen Ursprungs. Das humane Material, das für die Präparation dieses Produktes verwendet wird, ist auf die Präsenz von Antikörpern gegen Humanes Immundefizienz-Virus (HIV I und II), gegen Hepatitis B-Oberflächenantigen und gegen Hepatitis C Virus geprüft und für negativ befunden worden. Da kein Test das Vorhandensein von infektiösen Erregern völlig ausschließen kann, sollten die Reagenzien wie potentiell infektiöses Material gehandhabt werden.

### **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: 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!  
Niemand 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 Detergens gereinigt werden.  
Unbenutzte radioaktive Materialien und radioaktiver Abfall müssen entsprechend den Empfehlungen der nationalen Aufsichts-behörden 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 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.

### **Warnhinweis**

Biotin-Konzentrationen von >375 ng/mL in R22 zeigten signifikante Interferenzen mit dem Assay-System und führten zu falsch hohen Werten. Daher können Proben von Patienten mit hochdosierter Biotintherapie (>10 mg/Tag) für die IGF-I Messung mit diesem Test nicht verwendet werden.

### **ASSAY-EIGENSCHAFTEN UND VALIDIERUNG**

Der Radioimmunoassay für IGF-I benützt ein spezifisches, hochaffines, polyklonales Antiserum für dieses Protein. Seine Kreuzreaktivität mit IGF-II liegt unter 0,05 %. Die Empfindlichkeit des Assays liegt bei ca. 0,1 ng/mL. Der Tracer wird durch Radiojodierung von rekombinantem hIGF-I hergestellt. Die Kalibratoren beziehen sich auf rekombinantes hIGF-I, das frei von methIGF-I oder IGF-I-Varianten mit fehlverknüpften Disulfid-Brücken ist, d.h. dieses rekombinante IGF-I ist identisch mit der wichtigsten authentischen IGF-I-Form im Blut. Halbmaximale Verdrängung wird bei ca. 3 ng/mL erreicht. Der Inter-Assay-Variationskoeffizient bei 50 % B/B<sub>0</sub> ist 7,4.

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

Der Mediagnost IGF-I RIA CT wurde mit der internationalen **WHO NIBSC 02/254** Standard-Präparation kalibriert (25-26).

## **Klinische Validierung**

Die klinische Validierung erfolgte durch Bestimmung der IGF-I-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.

## **Proben: Eignung, Vorbereitung und Lagerung**

Die Stabilität von IGFBP-gebundenem IGF-I macht die Probenvorbereitung einfach. Serum und Heparin/EDTA Plasma ergeben vergleichbare Werte. In Citrat-Plasma Proben sind die IGF-I Werte wegen der relativ hohen Menge an Antikoagulanzen entsprechend reduziert. Blutproben können zu beliebiger Tageszeit abgenommen werden. Vollblut sollte innerhalb einiger Stunden verarbeitet und bis zur Messung bei -20 °C aufbewahrt werden. IGF-I-Werte werden normalerweise durch unachtsame Probenbehandlung und -lagerung nicht beeinflusst. Sie bleiben über mehrere Tage sowohl in normalen als auch diversen klinischen Situationen selbst bei erhöhter Temperatur (37 °C) stabil. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen sollte vermieden werden, obwohl sich zeigen ließ, dass IGF-I-Spiegel in normalen Seren auch nach 10 Frier-/Tauzyklen stabil blieben. Tiefgefrorene Proben sind über Jahre stabil. Die Proben können auch ohne die Gefahr eines Aktivitätsverlustes gefriergetrocknet werden. Erforderliches Probenvolumen: 10 µL Serum oder Plasma.

## **Warnhinweis**

Biotin-Konzentrationen von > 375 ng/mL in R22 zeigten signifikante Interferenzen mit dem Assay-System und führten zu falsch hohen Werten. Daher können Proben von Patienten mit hochdosierter Biotintherapie (>10 mg/Tag) für die IGF-I Messung mit diesem Test nicht verwendet werden.

## MATERIALIEN

### Inhalt der Testpackung

Die im Kit gelieferten Reagenzien sind ausreichend für 100 Röhrchen einschließlich der Kalibrationskurve.

- DB** Verdünnungspuffer  
(1 Fläschchen, 125 mL, gebrauchsfertig, gefärbt)
- A** Testpuffer  
(2 Fläschchen, 1 x 60 mL + 1 x 30 mL, gebrauchsfertig)
- R** Fang-Antikörper: anti-Kaninchen-IgG, biotinyliert  
(1 Fläschchen, 5,5 mL, lyophilisiert)
- S** Spezifischer Antikörper (Kaninchen-anti-hIGF-I) mit rekombinantem hIGF-II (1 Fläschchen, 5,5 mL, lyophilisiert)
- C** Tracer:  $^{125}\text{I}$ -IGF-I;  $< 1,5 \mu\text{Ci}$  oder  $< 55 \text{ kBq}$   
(1 Fläschchen, 11 mL, lyophilisiert, rot gefärbt)
- F - J** Kalibratoren (Konzentrationen auf den Etiketten in ng/mL)  
(5 Röhrchen, je 750  $\mu\text{L}$ , gebrauchsfertig, gefärbt)
- M+N** Kontrollen (Konzentrationen auf dem Zertifikat in ng/mL)  
(2 Röhrchen, je 100  $\mu\text{L}$ , Human-Serum, lyophilisiert)
- T** Röhrchen  
(100 Stück, beschichtet mit Streptavidin)

### Zusätzlich benötigte Reagenzien und Geräte

- 1) Pipetten: 10 mL, 500  $\mu\text{L}$ , 250  $\mu\text{L}$ , 100  $\mu\text{L}$ , 10  $\mu\text{L}$ ;  
Multipipetten: 25  $\mu\text{L}$ , 100  $\mu\text{L}$ , 250  $\mu\text{L}$
- 2) Schüttler
- 3) Vorrichtung zum Absaugen von Flüssigkeiten  
(z.B. mit Anschluss an eine Wasserstrahlpumpe)
- 4) 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 entspricht die Haltbarkeit der geöffneten Reagenzien der Tracer C Haltbarkeit.

**R** In **5,5 ml** Testpuffer (**A**) rekonstituieren

**S** In **5,5 ml** Testpuffer (**A**) rekonstituieren

**C** In **11 ml** Testpuffer (**A**) rekonstituieren.

**M+ N** In je **100 µL A. dest.** rekonstituieren. Die Verdünnungen der Kontrollen sollten entsprechend der Probenverdünnung durchgeführt werden (z.B. 1:26).

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+N!**

## PROBENVORBEREITUNG

Serum- oder Plasmaproben müssen normalerweise mit **Verdünnungspuffer (DB)** verdünnt werden. Diese Verdünnung mit **Verdünnungspuffer (DB)** sorgt gleichzeitig für die notwendige Ansäuerung der Probe auf einen pH von  $\leq 3$ .

Für die Routineanwendung empfehlen wir eine Verdünnung von 1:26.

Beispiel: **10 µL Serum** werden zu **250 µL Verdünnungspuffer (DB)** gegeben (Verdünnungsfaktor 26).

Die **Verdünnungen** der **Kontrollen M+N** mit **Verdünnungspuffer (DB)** sollten entsprechend der üblichen Verdünnung von Serum- oder Plasmaproben erfolgen, z.B. 1:26.

Falls Proben mit erwartungsgemäß extrem geringem IGF-I Gehalt bestimmt werden sollen, nicht Serum oder Plasmaproben (z.B. Urin, Speichel etc.), kann aufgrund der höheren Sensitivität des Testes der Mediagnost RIA R20 geeigneter sein.

## TESTDURCHFÜHRUNG

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

## Pipettier-Schema:

Nr.	Röhrchen	DB F-N Proben	S	R	C
1,2	TC	---	---	---	100
3,4	B <sub>0</sub>	<b>DB: 100</b>	50	50	100
5-14	Kalibratoren	<b>F-J: 100</b>	50	50	100
15,16	Hohe Kontrolle	<b>M: 100</b>	50	50	100
17,18	Niedrige Kontrolle	<b>N: 100</b>	50	50	100
19,20	Probe 1	100	50	50	100
21,22	Probe 2	100	50	50	100
etc.					
<b>Farbe:</b>		<b>Grün</b>	Nach Zugabe: <b>Blau</b>		Nach Zugabe <b>Violett</b>

(Alle Volumina in µL)

### 1) Beschriftung der Röhrchen:

- 1, 2 Gesamtaktivität (**total counts, TC**),
- 3, 4 Verdünnungspuffer **DB** (Nullkalibrator, **B<sub>0</sub>**),
- 5 – 14 Kalibratoren **F** bis **J** als Doppelwerte,
- 15, 16 Hohe Kontrolle **M**
- 17, 18 Niedrige Kontrolle **N**
- ab 19 **Proben** als Doppelwerte

- 2) Zugabe von **100 µL** Verdünnungspuffer **DB** zu Röhrchen 3 und 4.
- 3) Zugabe von je **100 µL** der Reagenzien **F - J (Kalibratoren)**:
  - 5, 6 Kalibrator **F**
  - 7, 8 Kalibrator **G**; usw. bis 14
- 4) Zugabe von **100 µL** verdünntem Reagenz **M (Hohe Kontrolle)** zu Röhrchen 15 und 16.

5) Zugabe von **100 µL** verdünntem Reagenz **N (Niedrige Kontrolle)** zu Röhrrchen 17 und 18.

6) Zugabe von **100 µL** verdünnter (oder nur angesäuerter) **Probe** zu Röhrrchen 19 und 20, etc.

-Alle Lösungen sind **grün** gefärbt! -

7) Zugabe von **50 µL** Reagenz **S (Spez. Antikörper)** ab Röhrrchen 3.

-Alle Lösungen sind **blau** gefärbt! -

8) Zugabe von **50 µL** Reagenz **R (Fang-Antikörper)** ab Röhrrchen 3.

9) Zugabe von **100 µL** Reagenz **C (Tracer)** zu allen Röhrrchen.

Röhrrchen 1 und 2 (Gesamtaktivität) mit Stopfen verschließen und **bis zum Schritt 14) beiseitestellen.**

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

10) Die restlichen Röhrrchen **mindestens 4 Stunden** bei **Raumtemperatur (RT)** auf einem Schüttler bei **350 upm** inkubieren.

#### **Alternative Inkubationsmöglichkeiten:**

A) Über Nacht: (>15h), 350 upm, RT

A) Über Nacht: (>15h), ohne Schütteln, 2-8°C

(hier muss der Inhalt der Röhrrchen durch einmaliges Schütteln oder Vortexen initial gemischt werden).

B) Verlängerte Inkubation: Z.B. über das Wochenende (z.B 60 h) ist mit Version B) möglich.

11) Flüssigkeit vollständig dekatieren oder absaugen, dabei darf die Beschichtung der Röhrrchen nicht beschädigt werden.

12) Zugabe von je **500 µL Testpuffer A.**



- 13) Flüssigkeit vollständig dekantieren oder absaugen, siehe Punkt 11.
- 14) Aktivität aller Rörchen im Gamma-Counter zählen.

### Alternatives Pipettierschema für die Arbeitsschritte 7 und 8

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

### AUSWERTUNG

#### Erstellung der Kalibrationskurve

Die bereitgestellten Kalibratoren enthalten folgende IGF-I-Konzentrationen:

Kalibrator	F	G	H	I	J
ng/mL	0,37	1,11	3,33	10	30

- 1) Ermittlung des Mittelwerts der Doppelbestimmungen (entspricht der Bindung B).
- 2) Der Mittelwert des Verdünnungspuffers (DB, Rörchen 3 und 4) ergibt  $B_0$ .
- 3) Berechnung der Prozentverhältnisse (%B/ $B_0$ ):  
 $\%B/B_0 = B/B_0 \times 100\%$ .
- 4) Auftragen von %B/ $B_0$  gegen die Konzentrationen der Kalibratoren in halb-logarithmischem oder logit-log Maßstab auf Papier oder per Computerauswertung.
- 5) Qualitätskontrolle, Berechnung des Nullkalibrators in %:  
 $B_0 / \text{Gesamtaktivität TC} \times 100\%$   
 $= (\text{Mittelwert Rörchen 3} + 4 / \text{Mittelwert Rörchen 1} + 2) \times 100\%$   
Soll:  $\%B_0/TC > 25\%$

## Bestimmung der Probenkonzentration

Die Konzentrationswerte (Abszisse), die einem bestimmten % B/B<sub>0</sub> - Wert der Probe entsprechen, werden wie im folgenden Beispiel abgelesen:

mittlere cpm des Nullkalibrators (B<sub>0</sub>): 9005 cpm

mittlere cpm der Probe: 3812 cpm

$$\begin{aligned}\%B/B_0 &= (\text{cpm Probe}) / (\text{cpm } B_0) \times 100 \% \\ &= (3812) / (9005) \times 100 \% \\ &= 0,423 \times 100 \% \\ &= 42,3 \%\end{aligned}$$

Für einen 42,3 %-Wert auf der y-Achse (Ordinate) ergibt sich 5,92 ng/mL auf der x-Achse (Abszisse). Dieser Konzentrationswert, der graphisch oder mit Hilfe eines Computerprogramms ermittelt wurde, wird mit dem Verdünnungsfaktor (z.B: 26) multipliziert.

Beispiel: 5,92 x 26 = 154 ng/mL.

Sollte es vorgezogen werden, die Ergebnisse in nmol/l auszudrücken, so müssen die Werte in ng/mL durch 7,649 dividiert werden, um nmol/l zu erhalten.

Beispiel: 154 ng/mL: 7,649 = 20 nmol/l

## Konzentration der Kontrolle

Die aus der Kalibrationskurve ermittelten Werte für die **Kontrollen M** und **N** sollten innerhalb der auf dem Zertifikat angegebenen Bereiche liegen.

## NORMALWERTE

Die IGF-I-Spiegel sind bei Kindern stark altersabhängig. Bei Erwachsenen bis zu einem Alter von etwa 60 Jahren ist dieses Phänomen weniger ausgeprägt. Die Normalbereiche der verschiedenen Altersgruppen, die log-normal verteilt sind, sind in Tabelle 2 durch Perzentile angegeben. Zwischen 8 und 19 Jahren sind die Werte für Jungen und Mädchen getrennt aufgeführt, da der Pubertätsgipfel üblicherweise bei Mädchen 2 Jahre früher auftritt. Graphische Darstellungen werden in Abbildung 3, 4 und 5 gezeigt. Ein Hauptproblem für die Interpretation von IGF-I-Werten ergibt sich aus der Tatsache, dass Minderwuchs oft auf eine Entwicklungsverzögerung zurückzuführen ist, seltener auf eine metabolische oder endokrine Erkrankung (konstitutionelle Entwicklungsverzögerung). Der scharfe Anstieg der IGF-I-Spiegel während der Pubertät führt deshalb gelegentlich zu falsch subnormalen Werten, wenn die gemessenen IGF-I-Konzentrationen des Patienten auf das chronologische und nicht auf das biologische Alter bezogen werden. Es empfiehlt sich, in einem solchen Fall das Pubertätsstadium in die Betrachtung mit einzubeziehen (Tabelle 1 und Abb. 6), um ein angemessenes Bild von der Situation zu erhalten.

**Tabelle 1:** Normalbereich der Serum-IGF-I-Spiegel in verschiedenen Pubertätsstadien nach Tanner. Da zwischen Mädchen und Jungen keine Unterschiede bestanden, wurden jeweils beide Geschlechter zusammengefasst. Lediglich Kinder und Jugendliche zwischen 7 und 17 Jahren wurden betrachtet.

<b>Perzentile</b>				
<b>Pubertäts- stadium</b>	<b>0,1.</b>	<b>5.</b>	<b>50.</b>	<b>95.</b>
<b>1</b>	61	105	186	330
<b>2</b>	85	156	298	568
<b>3</b>	113	196	352	631
<b>4</b>	171	268	431	693
<b>5</b>	165	263	431	706

## **EINSCHRÄNKUNGEN**

IGF-I-Spiegel hängen in erster Linie von der Wachstumshormonsekretion ab. Erniedrigte Werte beweisen jedoch keinesfalls einen Wachstumshormonmangel, da eine Reihe anderer Faktoren die Plasma-Konzentration von IGF-I ebenfalls beeinflussen und deshalb zur korrekten Interpretation in die Betrachtung mit einbezogen werden müssen. IGF-I-Spiegel nehmen während des Fastens (mehr als 1 Tag), als Ergebnis chronischer Malnutrition, Malabsorption und Kachexie, bei eingeschränkter Leberfunktion, bei Hypothyreose und unbehandeltem Diabetes mellitus ab. Zudem können sie bei systemisch-entzündlichen Erkrankungen und malignen Erkrankungen erniedrigt sein.

IGF-I-Spiegel sind erhöht bei vorzeitiger Pubertät. In klinischen Situationen, die mit Hyperprolaktinämie einhergehen oder bei Patienten mit Craniopharyngeom können gelegentlich trotz bestehenden Wachstumshormonmangels normale Werte auftreten. Während der späten Schwangerschaft sind die IGF-I-Werte mäßig erhöht.

**Tab.2:** IGF-I Serumkonzentrationen gesunder Probanden in Abhängigkeit vom Alter. zwischen dem 8. und 19. 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	Perzentile													
	0,1	1	5	10	20	30	40	50	60	70	80	90	95	99
0-2 J.	13	20	28	34	43	50	58	66	75	87	102	128	156	220
2-4 J.	20	29	40	48	59	68	77	87	98	111	129	159	189	260
4-6 J.	26	36	50	59	73	85	96	108	122	138	160	196	233	320
6-7 J.	34	46	62	72	87	99	111	124	138	155	176	212	248	332
7-8 J.	45	60	78	90	107	121	134	148	163	181	205	243	281	364
8-9 J. Jungen	54	71	90	102	119	133	146	160	175	192	214	250	284	362
8-9 J. Mädchen	55	75	99	115	137	156	174	193	214	239	271	324	376	496
9-10 J. Jungen	63	82	102	115	133	148	162	176	191	209	232	269	304	379
9-10 J. Mädchen	68	89	114	130	152	170	187	205	224	247	276	323	369	469
10-11 J. Jungen	77	96	117	130	148	162	176	189	203	220	241	274	305	370
10-11 J. Mädchen	81	106	134	153	178	199	219	239	261	287	321	374	426	539
11-12 J. Jungen	85	106	129	144	163	179	194	209	225	244	267	304	339	413
11-12 J. Mädchen	91	123	160	185	220	248	276	305	337	374	424	503	581	758
12-13 J. Jungen	88	112	141	159	184	204	223	243	264	289	321	371	419	525
12-13 J. Mädchen	116	155	201	231	274	309	342	377	415	460	519	614	707	914
13-14 J. Jungen	111	143	179	203	235	261	286	311	339	371	412	477	540	677
13-14 J. Mädchen	163	207	256	287	329	364	395	428	463	504	556	637	716	884
14-15 J. Jungen	140	182	229	260	303	337	370	404	441	484	539	625	691	896
14-15 J. Mädchen	193	236	284	314	353	385	414	443	474	510	556	628	713	832
15-16 J. Jungen	176	221	269	299	340	372	402	433	466	504	552	626	697	849
15-16 J. Mädchen	187	231	279	309	350	382	412	442	474	512	559	632	700	845
16-17 J. Jungen	178	221	267	296	335	366	395	424	455	491	537	607	673	814
16-17 J. Mädchen	183	225	270	298	336	366	394	422	452	486	530	597	660	792
17-18 J. Jungen	173	207	243	265	294	317	337	358	380	405	436	484	527	618
17-18 J. Mädchen	176	210	246	268	297	320	341	362	384	409	441	488	533	624
18-19 J. Jungen	167	201	235	256	285	307	327	347	368	393	423	469	512	600
18-19 J. Mädchen	167	199	233	254	281	302	322	341	362	385	414	458	499	583
19-20 J.	158	189	220	240	265	285	304	322	341	363	391	433	471	550
20-30 J.	72	92	115	130	150	167	182	198	215	235	261	302	340	425
30-40 J.	68	87	109	123	142	158	173	188	204	223	248	287	324	404
40-50 J.	64	82	103	116	135	150	164	178	194	212	235	272	310	385
50-60 J.	60	77	97	110	127	142	155	169	184	201	224	260	292	369
60-70 J.	55	72	91	103	120	134	147	161	176	193	215	251	282	362
70-80 J.	25	35	47	55	67	78	88	98	110	124	142	173	207	276
>80 J.	21	30	40	47	58	67	76	85	95	108	125	153	184	245

Die Serumkonzentrationen sind in ng/mL angegeben. Ohne Extraktion mit IGF-BP-blockiertem IGF-I RIA gemessen (Blum und Breier 1994, 27).

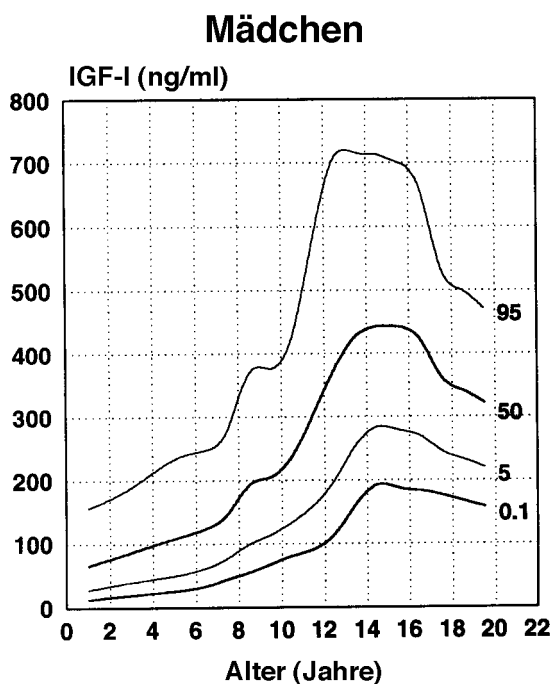


Abb. 3: Altersabhängiger Normalbereich der IGF-I Spiegel bei Mädchen

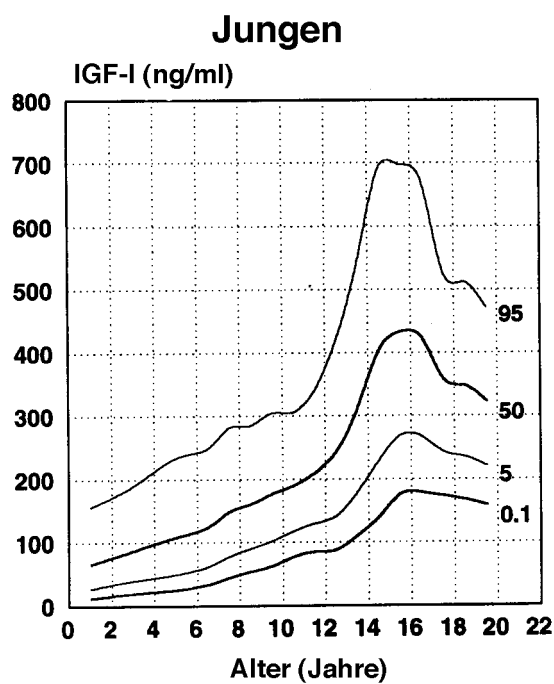


Abb. 4: Altersabhängiger Normalbereich der IGF-I Spiegel bei Jungen

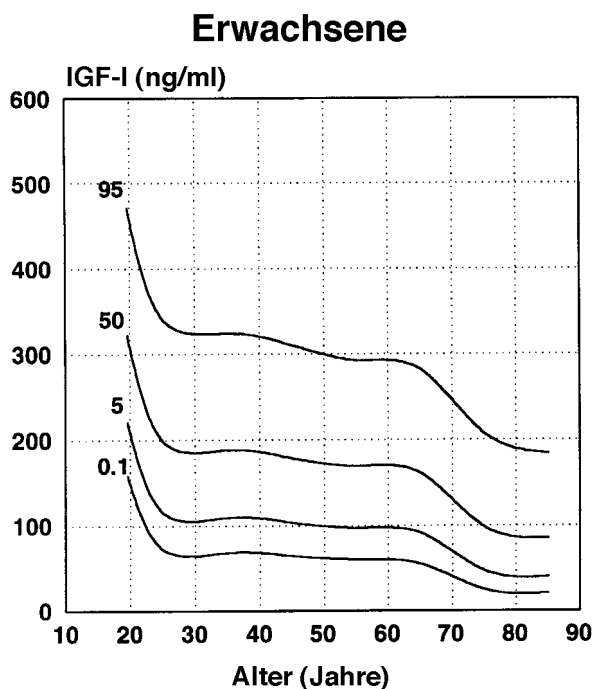


Abb.5: Altersabhängiger Normalbereich der IGF-I Spiegel bei Erwachsenen.

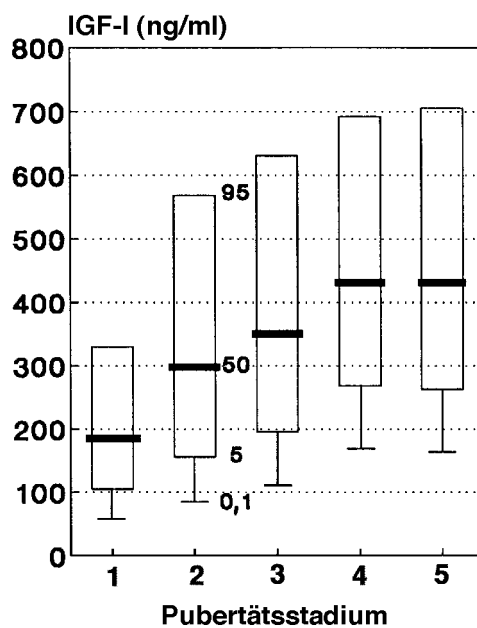


Abb.6: IGF-I Spiegel von gesunden Kindern und Jugendlichen (7-17 Jahre) in verschiedenen Pubertätsstadien (beide Geschlechter zusammen).

## Assay Eigenschaften und Validierung

### Sensitivität

Die analytische Sensitivität des RIA IGF-I R22 beträgt 0,107 ng/mL (zweifacher Standardabweichung des Null-Kalibrators in 15facher Bestimmung).

### Spezifität

Die folgenden Materialien sind auf Kreuzreaktivität ausgewertet worden. Lösungen [200 ng/mL] jeder Substanz sind in diesem Radioimmunoassay analysiert worden.

	IGF-II	Insulin	Proinsulin
Reaktivität [%]	0,021	0,061	0,024

### Reproduzierbarkeit

#### Intra-Assay-Varianz

	Anzahl der Bestimmungen	Mittelwert (ng/mL)	Standardabweichung (ng/mL)	VK (%)
Probe 1	8	179,6	4,5	2,5
Probe 2	8	55,8	2,6	4,6
Probe 3	8	140	4,7	3,4

#### Inter-Assay-Varianz

	Anzahl der Bestimmungen	Mittelwert (ng/mL)	Standardabweichung (ng/mL)	VK (%)
Probe 1	18	186,1	8,31	4,5
Probe 2	18	54,8	2,71	4,9
Probe 3	18	137,9	8,61	6,2

### Linearität

Verdünnung	Probe 1 (rekalkuliert, ng/mL)	Verdünnung:	Probe 2 (rekalkuliert, ng/mL)
1:20	175,9	1:20	126,4
1:23	175,6	1:22	130,2
1:26	172,8	1:26	137,6
1:30	183,6	1:30	133,8
1:35	186,0	1:35	143,6
1:40	188,2	1:40	136,0
MV / 1SA	180,9 / 6,04	MV / 1SA	134,6/ 5,99

MV = Mittelwert, SA = Standardabweichung

### Wiederfindung

Die **Wiederfindung** vom rekombinanten IGF-I betrug in einer Puffermatrix 100%. In verschiedenen humanen Seren war die Wiederfindung im Mittel 102,5% der theoretisch erwarteten Menge.

100 ng/mL IGF-I zugesezt	Serum 1	Serum 2
Wiederfindung [%]	105,9%	98,2%



## LITERATUR

- 1) Baxter RC. 1986 The somatomedins: insulin-like growth factors. *Adv Clin Chem.*25:49-115
- 2) Daughaday WH, Rotwein P. 1989 Insulin-like growth factors I and II. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum, and tissue concentrations. *Endocr Rev.* 10:68-91
- 3) Spencer EM (Ed.) 1991 *Modern Concepts of Insulin-Like Growth Factors.* New York: Elsevier.
- 4) Klapper DG, Svoboda ME, Van Wyk JJ. 1983 Sequence analysis of somatomedin-C: confirmation of identity with insulin-like growth factor-I. *Endocrinology.* 112:2215-2217.
- 5) Rinderknecht E, Humbel RE. 1978 The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin. *J Biol Chem.* 253:2769-2276.
- 6) Clemmons DR, Van Wyk JJ. 1984 Factors controlling blood concentration of somatomedin C. *Clin Endocrinol Metab.* 13:113-143.
- 7) Ballard J, Baxter R, Binoux M, et al. 1989 On the nomenclature of the IGF binding proteins. *Acta Endocrinol (Copenh).* 121:751-752.
- 8) Drop SLS. 1992 Report on the nomenclature of the IGF binding proteins. *J. Clin Endocrinol Metab.* 74:1215-1216.
- 9) Martin JL, Baxter RC. 1986 Insulin-like growth factor binding protein from human plasma. Purification and characterization. *J Biol Chem.* 261:8754-8760.
- 10) Binkert C, Landwehr J, Mary JL, Schwander J, Heinrich G. 1989 Cloning, sequence analysis and expression of a cDNA encoding a novel insulin-like growth factor binding protein (IGFBP-2). *EMBO J.* 8:2497-2502.
- 11) Furlanetto RW, Underwood LE, Van Wyk JJ, D'Ercole AJ. 1977 Estimation of somatomedin-C levels in normals and patients with pituitary disease by radioimmunoassay. *J. Clin Invest.* 60:648-657.
- 12) Daughaday WH, Kapadia M, Mariz I. 1987 Serum somatomedin binding proteins: physiologic significance and interference in radioligand assay. *J Lab Clin Med.* 109:355-363.
- 13) Breier BH, Gallaher BW, Gluckman PD. 1991 Radioimmunoassay for insulin-like growth factor-I: solutions to some potential problems and pitfalls. *J Endocrinol.* 128:347-357.

- 14) Daughaday WH, Mariz IK, Blethen SL. 1980 Inhibition of access of bound somatomedin to membrane receptor and immunobinding sites: a comparison of radioreceptor and radioimmunoassay of somatomedin in native and acid-ethanol-extracted serum. *J Clin Endocrinol Metab.* 51:781-788.
- 15) Blum WF, Gallaher B, Ranke MB. 1992 An IGFBP-blocked IGF-I RIA that measures what it pretends to measure: IGF-I. 74th Annual Meeting of the American Endocrine Society. 293.
- 16) Rosenfeld RG, Wilson DM, Lee PDK, Hintz RL. 1986 Insulin-like growth factors I and II in evaluation of growth retardation. *J Pediatr.* 109:428-433.
- 17) Clemmons DR, Van-Wyk JJ, Ridgway EC, Kliman B, Kjellberg RN, Underwood LE. 1979 Evaluation of acromegaly by radioimmunoassay of somatomedin-C.N.Engl *J Med.* 301:1138-1142
- 18) Zapf J, Walter H, Froesch ER. 1981 Radioimmunological determination of insulin-like growth factors I and II in normal subjects and in patients with growth disorders and extrapancreatic tumor hypoglycemia. *J Clin Invest.* 68:1321-1330.
- 19) Blum WF. 1992 Insulin-like growth factors and their binding proteins. In: Ranke MB, ed. *Functional Endocrinologic Diagnostics in Children and Adolescence.* Mannheim: J + J Verlag; 102-117.
- 20) Rieu M, Girard F, Bricaire H, Binoux M. 1982 The importance of insulin-like growth factor (somatomedin) measurements in the diagnosis and surveillance of acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab.* 55:147-153.
- 21) Blum WF, Ranke MB, Bierich JR. 1988 A specific radioimmunoassay for insulin-like growth factor II: the interference of IGF binding proteins can be blocked by excess IGF-I. *Acta Endocrinol (Copenh).* 118:374-380.
- 22) 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
- 23) 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* 54:60-68
- 24) 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* 55:155-124
- 25) Address NIBSC:Blance Lane, South Mimms, Potters Bar, Hertford EN 6 3 QG, Great Britain

- 26)** Burns C, Rigsby P, Moore M, Rafferty B. (2009) The first International Standard for Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1) for immunoassay: Preparation and calibration in an international collaborative study. Growth Hormone & IGF Research (2009)
- 27)** Blum WH, Breier BH (1994) Radioimmunoassays for IGFs and IGFBPs. Growth Regulation 4 (Suppl. 1):11-19

## Kurzanleitung

Reagenzpräparation:	Rekonstitution:	Verdünnung:
Fang-Antikörper (R)	in 5,5 mL Testpuffer (A)	
Spezifischer Antikörper (S)	in 5,5 mL Testpuffer (A)	
Tracer (C)	in 11 mL Testpuffer (A)	
Kontrollen (M)+(N)	in je 100 µL A. dest.	1:26 mit DB
<p>Plasma/Serum Proben mit Verdünnungspuffer (DB) z.B. 1:26 verdünnen.                      Wenn niedrige IGF-I Werte in Proben zu erwarten sind siehe S.14.</p>		

## Testdurchführung in Doppelbestimmung

Zugabe von Reagenz [µL]					
Nr. der Röhrrchen	Inhalt der Röhrrchen	DB F-N Proben	S	R	C
1,2	TC	–	–	–	100
3,4	B <sub>0</sub>	100 DB	50	50	100
5-14	Kalibratoren	100 F-J	50	50	100
15,16	Hohe Kontrolle	100 M	50	50	100
17,18	Niedrige Kontrolle	100 N	50	50	100
19,20	Probe 1	100	50	50	100
21,22 (etc)	Probe 2 (etc)	100	50	50	100
Farbe:		Grün	Nach Zugabe: Blau		Nach Zugabe: Violett

Nr.:1,2 bis zum Zählen der Aktivität beiseite stellen
<p><b>Inkubation, mind. 4 Stunden, bei RT, 350 upm</b></p> <p>(Alternativ: Inkubation über Nacht ohne Schütteln (d.h. mindestens 15 Stunden) bei 2 - 8°C, vorher durchmischen s.S.20)</p>
<p>Flüssigkeit vollständig dekantieren oder absaugen, ohne die Beschichtung der Röhrrchen dabei zu beschädigen.</p>
<p>Waschen durch Zugabe von je 500 µL Testpuffer A</p>
<p>Flüssigkeit vollständig dekantieren oder absaugen (s.o.).</p>
<p><b>Zählen der Aktivität</b> aller Röhrrchen mit einem Gammazähler</p>