

IGFBP-3 LIA

Liganden-bindender Immunoassay zur
quantitativen Bestimmung von

Funktionalem- Insulin-Like-Growth-Factor-Bindungsprotein-3

Deutsch

Ligand-binding Immunoassay
for Quantitative Determination of

Functional Insulin-Like Growth-Factor Binding Protein-3

English

nur zu Forschungszwecken / for research use only



REF **E04A**




























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>

Symbols / Symbole

according to DIN EN 980 and EDMA recommendations Standard News 6 2001

	Expiry date / Verfallsdatum / Date de péremption / Data di scadenza / Fecha de caducidad / Data de validade / Uiterste gebruiksdatum / Udløbsdato / Utgångsdatum / Termin Wažności / Lejárati idő / Doba expirácie / Doba expirace
	Consider instructions for use / Bitte Gebrauchsanweisung beachten / Consultez la notice d'utilisation / Consultare le istruzioni per l'uso / Consulte las instrucciones de utilización / Consulte as instruções de utilização / Raadpleeg de gebruiksaanwijzing / Se brugsanvisningen / Läs anvisningarna före användning / Proszę przeczytać instrukcję wykonania / Vegyük figyelembe a használati utasításban foglaltakat / Postupujte podľa pokynov na použitie / Postupujte dle návodu k použití
	Lot-Batch Number / Charge-Chargennummer / Lot-Code du lot / Lotto-Numero di lotto / Lote-Código de lote / Lote-Código do lote / Lot-Partijnummer / Lot-Batchkode / Lot-Satskod / Numer serii / Lot-Batch szám / Číslo šarže / Číslo šarže
	Manufactured by / Hergestellt von / Fabriqué par / Prodotto da / Fabricado por / Fabricado por / Vervaardigd door / Fabrikation af / Tillverkad av / Wyprodukowane pr / Gyártotta / Vyrobené / Vyrobeno
	Catalogue Number / Bestellnummer / Numéro de référence / Numero di riferimento / Número de referencia / Número de referência / Referentienummer / Referencenummer / Katalognummer / Numer katalogowy / Katalógusszám / Katalógové číslo / Katalogové číslo
	Store at between / Lagerung bei zwischen / Conserver à entre / Conservare a tra / Conservar a temp. entre / Armazene a entre / Bewaar bij tussen / Opbevares mellem / Förvaras vid / Przechowywać w / Tároljuk ő ő között / Skladujte v rozsahu / Skladujte v rozmezí
	Contains sufficient for x tests / Inhalt ausreichend für x Tests / Contient suffisant pour x tests / Contenido suficiente per x test / Contiene suficiente para x pruebas / Contém 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 / Obsahuje materiál pro x testů
	Keep away from sunlight / Nicht dem Sonnenlicht aussetzen
	Incubation time / Inkubationszeit
	Incubate at / Inkubation bei
	Shaking / schütteln
	Mikrotiter plate/Mikrotiterplatte
	Reconstitute in / Rekonstituieren in
	Sample / Probe
	LK Ligand Conjugate / Ligandkonjugat
	EK Enzyme Conjugate / Enzymkonjugat
	VP/PP Dilute in Buffer X / Verdünnen in Puffer X
	A-E Standard X / Standard X
	KS1/KS2 Control Serum / Kontrollserum
	WP Washing Buffer Concentrate / Waschpufferkonzentrat
	Washing Buffer / Waschpuffer
	S Substrate / Substrat
	SL Stop Solution / Stopplösung
	Cover Plate with sealing tape / Platte abkleben
	Measure plate within 30 min at 450 nm (Referencefilter ≥590nm) / Ausmessung innerhalb von 30 min bei 450 nm (Referenzfilter ≥ 590 nm).

Symbols / Symbole	2
-------------------	---

Packungsbeilage

Deutsch

TECHNISCHE EIGENSCHAFTEN + EINSATZMÖGLICHKEITEN	5
EINFÜHRUNG	5
IGFBP-3-BESTIMMUNGEN	5
Gesamt-IGFBP-3	6
FRAGMENTIERTES IGFBP-3	6
METHODIK	7
Assay Eigenschaften und Validierung	7
KLINISCHE VALIDIERUNG	9
Proben: Eignung, Vorbereitung und Lagerung	9
MATERIALIEN	10
Inhalt der Testpackung	10
Zusätzlich benötigte Materialien	11
TECHNISCHE HINWEISE	11
WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN	13
TESTDURCHFÜHRUNG	14
AUSWERTUNG	15
Berechnung der Standardkurve	15
NORMALWERTE GESAMT-IGFBP-3	15
EINSCHRÄNKUNGEN	15
ERWARTUNGSWERTE VON FUNKTIONALEM-IGFBP-3	15
TECHNICAL PROPERTIES AND APPLICATIONS	17

Package Insert

Englisch

Mediagnost IGFBP-3 LIA E04A	17
INTRODUCTION	17
Assay Characteristics	19
Clinical Validation	21
WARNINGS AND PRECAUTIONS	22
REAGENTS PROVIDED	23
MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED	23
TECHNICAL NOTES	23
SPECIMEN COLLECTION, PREPARATION AND STORAGE	25
ASSAY PROCEDURE	25
QUALITY CONTROL	26
CALCULATION OF RESULTS	27
Establishing the Standard Curve	27
EXPECTED VALUES TOTAL IGFBP-3	27
LIMITATIONS	27
EXPECTED VALUES FUNCTIONAL IGFBP-3	27
REFERENCES	32
KURZANLEITUNG – Funktionaler-IGFBP-3 LIA E04A	34
SUMMARY – Functional IGFBP-3 LIA E04A	35
REF E04A International Test description	36

Nur zum In-vitro-Gebrauch.

Nur zum Gebrauch durch Fachpersonal.

Nur zu Forschungszwecken.

Nicht für humane oder tierische, therapeutische oder diagnostische Zwecke.

Vor Gebrauch ist die gesamte Packungsbeilage zu lesen!

For in vitro use only!

For Research Use Only!

For professional use only!

CAUTION: Not for human or animal therapeutic or diagnostic use.

Read entire protocol before use!

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

PACKUNGSBEILAGE DEUTSCH

KLINISCHE BEDEUTUNG

Dieser ligandbindende Immunoassay ist für Bestimmung von **bioaktivem und funktionalem IGFBP-3 (fIGFBP-3)** geeignet.

In Verbindung mit entsprechenden Messungen in denselben Proben von Gesamt-IGFBP-3 (tIGFBP3; total IGFBP3) mit den Mediagnost Kits E03A, IGF-R10, oder, IGF-R11, kann der Fragmentierungsgrad von IGFBP-3 bestimmt werden.

TECHNISCHE EIGENSCHAFTEN + EINSATZMÖGLICHKEITEN

Der Mediagnost **IGFBP-3 LIA**:

- ◆ Quantitativer Nachweis von **funktionalem bioaktivem (IGF-I bindenden) IGFBP-3: leicht durchzuführender "ELISA", ohne Probenvorbehandlung**
- ◆ nur **funktionales, bioaktives IGF-I-bindendes IGFBP-3** wird quantifiziert, proteolytische Fragmente ohne Bindungsaffinität zu den **natürlichen Liganden (IGF-I)** werden nicht erfasst.
- ◆ **Inter- / Intra Assay Variation** von $\leq 6.8\%$ bzw. $\leq 5.6\%$
- ◆ verlässlich, einfach und schnell: Verfahren wie in einem üblichen ELISA
- ◆ **Gesamt-IGFBP-3** integriert den sekretorischen Status vom Wachstumshormon (WH) über mehrere Tage, mit stabilen Serumkonzentrationen durch fehlende zirkadiane Schwankungen. Eine Einzelmessung ermöglicht daher eine Aussage über das Vorliegen von WH-Mangel oder WH-Überschuss: **die korrespondierende Bestimmung von Funktionalem-IGFBP-3** spiegelt das zugehörige Ausmaß von IGFBP-3-Fragmentierung wider, womit eine weitere Interpretation der Ergebnisse möglich ist.
- ◆ **Direkte Korrelation** zu quantitativen Werten des immunreaktiven Gesamt-IGFBP-3 mit dem analogen Mediagnost Kits (E03A, IGF-R10, IGF-R11). Retrospektive oder zeitgleiche Bestimmungen aus einer Probenverdünnung !
- ◆ Nur sehr kleine Probenvolumina nötig, daher ideal für die Pädiatrie

EINFÜHRUNG

IGFBP-3-BESTIMMUNGEN

Die bisherigen Immunoassays für IGFBP-3 Quantifizierungen nutzen die Bindung von IGFBP-3 spezifischen Antikörpern zur Signalentwicklung. Sie können dabei systembedingt nicht zwischen dem kompletten IGFBP-3 Molekül und dessen Fragmenten (z.B. aus proteolytischer Spaltung) unterscheiden. Unter Umständen fallen somit die gemessenen Werte zu hoch aus, denn aus intakten IGFBP-3 Molekülen können mehrere Fragmente entstehen. Es kann also nicht zwischen erhöhten IGFBP-3 Werten und hoher Fragmentierungsrate unterschieden werden.

Monoklonale Antikörper, die nur die intakte IGF-Bindungsstelle des IGFBP-3 erkennen sind grundsätzlich indirekt und ungenau, da durch Proteasen eine breite Palette von Fragmenten entstehen kann, von denen einzelne trotz fehlender IGF-Bindung von den Antikörpern erkannt werden können.

Der Mediagnost IGFBP-3 LIA ermöglicht jedoch die Messung **von real funktionalem und effektiv bioaktivem IGFBP-3**. Dabei wird funktional hier als Bindungsfähigkeit mit dem bedeutendsten natürlichen Liganden dem IGF-I definiert.

Das neue Testprinzip (Patent angemeldet DE19719001) verwendet immobilisierte anti-IGFBP-3 Antikörper und biotinyliertes IGF-I als Ligand. Der an der Mikrotiterplatte gekoppelte IGFBP-3 Antikörper bindet das IGFBP-3 aus der Probe und nur wenn IGFBP-3 gleichzeitig auch das biotinylierte IGF-I bindet, erfolgt in dem Test eine Signalentwicklung. Somit wird nur Funktionales-IGFBP-3 quantifiziert!

Das patentierte Testformat gewährleistet eine einfache und verlässliche Durchführung, wie mit einem herkömmlichen handelsüblichen ELISA Kit. Zeit- und laborintensive biochemische Analysen (z.B., Gelchromatographie oder Western Blots, usw.), die auch nur die Abschätzung der Konzentration ermöglichen, sind damit überflüssig geworden.

Gesamt-IGFBP-3

Insulin-like growth factors (IGF)-I und -II sind im Blutkreislauf an spezielle Bindungsproteine (IGFBPs) gebunden. Bisher wurden sieben verschiedene Bindungsproteine anhand ihrer Aminosäuresequenz identifiziert und als IGFBP-1, IGFBP-2, ..., IGFBP-7 klassifiziert (1/2). Im Blut überwiegt IGFBP-3. Im Gegensatz zu den anderen Bindungsproteinen hat IGFBP-3 die einzigartige Eigenschaft, neben IGF-I bzw. -II noch eine säurelabile Untereinheit (acid-labile subunit, ALS) zu binden (3-5). IGFBP-3 liegt fast vollständig in Form dieses hochmolekularen ternären Komplexes vor, nur in geringen Mengen ist freies IGFBP-3 im Blut zu finden (6,7).

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

So zeigen Patienten mit WH-Mangel subnormale IGFBP-3 Werte. Andererseits besitzen die meisten kleinwüchsigen Kinder mit normaler WH-Sekretion auch IGFBP-3 Werte im Normalbereich (Abb. 1).

Die beiden Gruppen sind durch die Messung der IGFBP-3 Konzentrationen 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, um WH-Therapien zu überwachen (19). 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).

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 zur Überwachung des Behandlungserfolgs. Bei frühreifen Kindern sind die IGFBP-3 Werte deutlich erhöht während sie sich bei Patientinnen mit verfrühter Thelarche im oberen Normalbereich bewegen (15).

Neben dem Wachstumshormon gibt es noch andere Faktoren, welche 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 keine zirkadianen Schwankungen (12,13). Für klinische Belange ist das Wachstumshormon ein wichtiger regulierender Faktor.

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 Werte im Tagesverlauf bei täglicher WH-Gabe (13) lassen die Vermutung zu, dass IGFBP-3 den WH-Sekretionsstatus über mehrere Tage widerspiegelt.

FRAGMENTIERTES IGFBP-3

Der ternäre IGFBP-3 Komplex ist das physiologische Depot für IGF-I. Durch proteolytische Spaltung wird IGF-I aus diesem Komplex freigesetzt, wonach es an Zellrezeptoren binden kann.

Verschiedene Proteasen wie Plasmin; PSA; MMPs; CathepsinD, Thrombin, gamma NGF sind in der Lage IGFBP-3 zu spalten.

Aus der Spaltung resultiert nicht nur die Freisetzung von IGF-I sondern auch die Entstehung von IGFBP-3 Fragmenten. Die Art der Fragmentierung ist abhängig von der/den aktiven Protease/n.

Bisher sind 22 Schnittstellen bekannt, die hauptsächlich in der variablen und in der N-terminalen Region lokalisiert sind, einige befinden sich jedoch auch im C-Terminus.

Die Existenz von Fragmenten mit einer Größe von ca. 30, 20 und 15 kDa wurde mittels Western Ligand Blotting nachgewiesen. Der korrespondierende Immunblot zeigte, dass nicht alle Fragmente in der Lage waren IGF-I zu binden. Dadurch ergibt sich aus der IGFBP-3 Spaltung zumindest eine partielle Reduktion der IGF-I Affinität (20).

IGFBP-3 Proteolyse kann in verschiedenen Körperflüssigkeiten, wie in Gelenkflüssigkeit, Amnionflüssigkeit, Samenflüssigkeit, interstitiellen Flüssigkeit, Peritonealflüssigkeit sowie in Lymphflüssigkeit und im Serum stattfinden. In allen Körperflüssigkeiten können unterschiedliche Proteasen aktiv sein und verschiedene Fragmentierungsmuster erzeugen, die sich in ihrer physiologischen Bedeutung unterscheiden können (21).

Während der Schwangerschaft liegt fast das gesamte IGFBP-3 im Serum fragmentiert vor. Auch bei einigen pathologischen Zuständen ist der Grad der IGFBP-3 Fragmentierung verändert.

Ein Anstieg in der IGFBP-3 Fragmentierung wird beobachtet bei:

- Wachstums Hormon Rezeptor Insensitivität (22, 23),
- Katabolischen Zuständen wie Sepsis, traumatischen und postoperativen Umständen (24-26),
- Nicht-Insulin-Abhängigen Diabetes (27),
- Verbrennungen (28),
- Krebs, z.B., Brustkrebs (29), Colonkarzinomen (30), Tumorerkrankungen von Kindern im Nervensystem (31).

Eine Abnahme der IGFBP-3 Fragmentierung wurde bisher nur im Gelenkwasser von arthritischen Patienten beobachtet (32).

In früheren Studien zur Bestimmung der Fragmentierung von IGFBP-3 waren anspruchsvolle und aufwendige biochemische Methoden nötig. In diesen Studien wurde in gesunden Probanden ca. 25 – 30% vom gesamten Serum IGFBP-3 fragmentiert gefunden. In Proben von IDDM und NIDDM sowie akromegalen Patienten, wurde ein deutlich höherer Anteil an fragmentiertem IGFBP-3 gefunden (33, 34).

METHODIK

Assay Eigenschaften und Validierung

Der Mediagnost LIA für Funktionales-IGFBP-3, ist ein so genannter Ligandbindender Immunoassay. Er benützt spezifische, hochaffine Antikörper, die auf die Mikrotiterplatte immobilisiert sind.

Der Ligand, biotinyliertes IGF-I, wird im Überschuss in die benötigten Vertiefungen gegeben. Die Probe wird extern mit einem speziellen Verdünnungspuffer (Probenpuffer PP) verdünnt, dabei werden die natürlicherweise gebundenen IGFs von den Bindungsproteinen gelöst. Nach den Zugaben der so verdünnten Probe mit freiem IGFBP-3 besetzt das im Überschuss vorliegende biotinylierte IGF-I alle existierenden spezifischen Bindungsstellen des IGFBP-3. Die immobilisierten Antikörper binden zeitgleich die IGFBP-3 Moleküle. Auf diese Weise kann, nach entsprechenden Waschschritten, spezifisch nur das gebundene Biotin-markierte IGF-I über ein Streptavidin-Peroxidase Konjugat nachgewiesen werden.

Damit ist gewährleistet, dass nur im Sinne von IGF-I Bindung Funktionales-IGFBP-3 detektiert wird.

Die Standards des LIA E04A sind **natives und funktionales humanes IGFBP-3** in Konzentrationen von **0,4; 2; 6; 15 und 30 ng/ml**.

Die **analytische Sensitivität** des LIA E04A beträgt **0.18 ng/ml** (zweifache Standardabweichung des Null-Standards in 16facher Bestimmung).

Der IGFBP-3 LIA E04A ist über einen sehr weiten Bereich **verdünnungsecht**. Die hervorragende Linearität von Serumverdünnungen ist in Tabelle 1 exemplarisch dargestellt.

Tabelle 1: Verdünnungslinearität

Verdünnung:	Probe 1 (rekalkuliert, ng/ml)
1:100	2817
1:200	2962
1:400	3094
1:600	3055
1:800	3229
1:1000	2951
1:1200	2908
1:1600	2989
MW / 1SA / VK%	3001 / 125 / 4.2

MW = Mittelwert **SD** = Standardabweichung **VK** = Variationskoeffizient%

Die **Inter-** und **Intra-Assay** Variationskoeffizienten sind kleiner als **6.8% bzw. 5.6%**. Beispielhafte Bestimmungen sind in Tabelle 2 und Tabelle 3 dargestellt.

Table 2 : Inter-Assay-Varianz (n=8)

	Mittelwert (ng/ml)	Standardabweichung (ng/ml)	VK (%)
Probe 1	1051	30	3.0
Probe 2	1891	129	6.8
Probe 3	2417	158	6.5

Table 3: Intra-Assay-Variation (n=16)

	Mittelwert (ng/ml)	Standardabweichung (ng/ml)	VK (%)
Probe 1	1061	26	2,5
Probe 2	1571	85	5.4
Probe 3	2660	148	5.6

KLINISCHE VALIDIERUNG

GESAMT-IGFBP-3

Die klinische Validierung gemäß der Normalwerttabelle (Tab.5) 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. 5; Abb. 1, 2, 3, 6 und 7).

Beruhend auf diesen Studien sind die entsprechenden Mediagnost Kits für die Bestimmung von humanem Gesamt-IGFBP-3 (z.B., E03A, IGF-R10, IGF-R11) in der klinischen Diagnostik zugelassen.

FRAGMENTIERTES IGFBP-3

Der human IGFBP-3 LIA E04A ist nur für Forschungszwecke!

Aufgrund der Neuentwicklung dieses Testsystems stehen zurzeit keine klinischen Daten zur Verfügung. Wir möchten unseren Kunden mit diesem Test ein Werkzeug zur Verfügung stellen, mit dem sie die Bedeutung von Funktionalem-IGFBP-3 erforschen können. Eine verbesserte Diagnostik könnte bspw. der Vergleich vom Gesamt-IGFBP-3 (tIGFBP-3) Werten mit Funktionalen-IGFBP-3 (fIGFBP-3) Werten in verschiedenen Subpopulationen von Patienten zeigen.

Erste, von Mediagnost durchgeführte Untersuchungen zeigen, dass es klare Unterschiede zwischen Gesamt-IGFBP-3 und Funktionalem-IGFBP-3 gibt.

So zeigt Tab. 4 Ergebnisse von vergleichenden Bestimmungen von Funktionalem-IGFBP-3 und Gesamt-IGFBP-3 in Seren von gesunden Blutspendern. Funktionales-IGFBP-3 wurde durchschnittlich 25% niedriger gefunden als das korrespondierende Gesamt-IGFBP-3 (Abb. 4, Tab. 4).

	Gesamt-IGFBP-3 min/max (ng/ml)	Funktionales-IGFBP-3 min/max (ng/ml)	Funktionales-IGFBP-3 (% vom gesamt)
Frauen	3568; 1752/5752	2506; 1102/4346	70,2
Männer	2752; 1258/4726	2332; 1337/4304	84,8
insgesamt	3160	2419	77,5

Tab. 4: Durchschnittliche Gesamt- und Funktionale-IGFBP-3 Serumwerte von Seren von 103 Frauen und 109 Männern von gesunden Blutspender (IGFBP-3 Konzentrationen in ng/ml). Das durchschnittliche Alter war 42 Jahre in jeder Gruppe.

Dabei konnte ein geschlechtsspezifischer Unterschied detektiert werden. Gesamt-IGFBP-3 Serumkonzentrationen von Männern wurden niedriger als die von Frauen gefunden. Die Konzentration von Funktionalem-IGFBP-3 wurde bei Frauen und Männern jedoch mit fast gleichen absoluten Werten gefunden.

In einer Untergruppe von Patientenseren von Spendern mit verschiedenen Erkrankungen sind die Konzentrationen von Funktionalem-IGFBP-3 deutlich reduziert (Abb. 5).

Weitere und ausführlichere Studien sind jedoch nötig, um die zugrunde liegenden Mechanismen aufzudecken und die diagnostische Wertigkeit von Funktionalem-IGFBP-3 zu bestimmen.

Proben: Eignung, Vorbereitung und Lagerung

Geeignet sind Serumproben sowie Heparin- und EDTA- Plasmaproben. Eine eventuelle Verdünnung der Probe durch das Antikoagulans muss berücksichtigt werden. Citrat-Plasma Proben werden nicht empfohlen, weil die Werte hier erniedrigt sind. Eine spezielle externe Probenvorbehandlung ist nicht nötig Leichte Hämolyse stört die Bestimmung nicht.

Generell sollten Proben so schnell wie möglich nach der Abnahme gekühlt werden. Falls zwischen Abnahme und Bestimmung ein längerer Zeitraum liegt, sollten die unverdünnten Proben bei -20°C oder kälter in fest verschließbaren Plastikgefäßen aufbewahrt werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen von Serum/Plasma sollte prinzipiell vermieden werden (gegebenenfalls subaliquotieren) einige Zyklen (3x) haben in unseren Versuchen jedoch auf die messbare IGFBP-3 Konzentration keine Auswirkungen gehabt.

Die hohe Sensitivität des Assays erlaubt IGFBP-3 Messungen in kleinen Probenvolumina. Für die meisten Untersuchungen (Serum- oder Plasmaproben bei denen keine Extremwerte zu erwarten sind) sollten **Verdünnungen von 1:505 in Probenpuffer PP geeignet** sein, damit ergibt sich ein Assay-Bereich von 0,2 bis 15,15 mg/l.

Gegebenenfalls kann, je nach erwarteten IGFBP-3-Werten, geringer oder stärker in **Probenpuffer PP** verdünnt werden. Die IGFBP-3 Konzentrationen in anderen humanen Körperflüssigkeiten und in Kulturüberständen können stark von den Serumwerten abweichen.

Vorschlag Verdünnungsprotokoll:

z.B. 1 ml **Probenpuffer PP** (grün gefärbt) in PE-/PP-Gefäße vorlegen (bei größeren Serien empfiehlt sich hierfür die Verwendung eines Multi-Steppers), dazu **10 µl** Serum- oder Plasma pipettieren (Verdünnung 1:101). In ein weiteres PE-/PP-Gefäß 400 µl Probenpuffer PP vorlegen und 100 µl von der gut durchmischten ersten Verdünnung geben (Verdünnung 1:5). Nach dem Mischen bitte innerhalb von 1 Stunde von dieser Lösung mit einer Endverdünnung von **1:505, 50 µl pro Bestimmung** im Assay einsetzen.

(Pipettierkontrolle = Blaufärbung der Lösung in der Mikrotiterplattenvertiefung).

MATERIALIEN

Inhalt der Testpackung

1)	MTP	Mikrotiterplatte , gebrauchsfertig, Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen , die in 12 abnehmbare Streifen à 8 Vertiefungen (einzel n abbrechbar) aufgeteilt ist. Die Platte ist mit einem Antikörper gegen humanes IGFBP-3 beschichtet
2)	CAL	Standards A-E, 1 ml lyophilisiert , enthalten natives humanes Funktionales-IGFBP-3. Die Standardkurve deckt einen Bereich von 0,4 - 30 ng/ml (0,4, 2, 6, 15 und 30 ng/ml) Funktionalem-IGFBP-3 ab . Die einzelnen Standards werden mit je 1 ml Probenpuffer PP rekonstituiert . Für den Assay werden jeweils 50 µl pro Vertiefung eingesetzt
3)	DILU	Vedünnungspuffer VP, 30 ml , gebrauchsfertig, für die Verdünnung von Ligandkonjugat LK und Enzymkonjugat EK verwenden.
4)	DILU	Probenpuffer PP, 120 ml , gebrauchsfertig, grün gefärbt, bitte für die Rekonstitution von Kontrolle und Standards , sowie für die Verdünnung von Proben und Kontrolle verwenden.
5)	Control	Kontrollseren KS1 and KS2, 250 µl , lyophilisiert, enthalten humanes Serum und müssen in 250 µl Probenpuffer PP rekonstituiert werden. Die Funktionale-IGFBP-3 Soll-Konzentrationen und die Schwankungsbereiche sind auf dem Etikett angegeben. Sie sollten im Assay in den gleichen Verdünnungen wie die jeweiligen Proben eingesetzt werden. Für den Assay werden jeweils 50 µl pro Vertiefung eingesetzt.
6)	Ligand	Ligandkonjugat LK, 100 µl , 101-fach Konzentrat, enthält biotinyliertes rekombinantes humanes IGF-I. Vor Gebrauch 1:101 mit VP verdünnen. Für den Assay werden jeweils 50 µl pro Vertiefung eingesetzt.
7)	CONJ	Enzymkonjugat EK, 140 µl , 101-fach Konzentrat, enthält POD (Meerrettich-Peroxidase)-markiertes Streptavidin. Vor Gebrauch 1:101 mit VP verdünnen. Für den Assay werden jeweils 100 µl pro Vertiefung eingesetzt.
8)	WASHBUF 20x	Waschpuffer WP, 50 ml , 20-fach konzentrierte Lösung, bitte vor Gebrauch 1:20 mit A.dest. oder entmineralisiertem Wasser verdünnen (z.B. den gesamten Flascheninhalt von 50 ml im Standzylinder auf 1000 ml auffüllen). Achtung: endverdünnt ist der Waschpuffer nur 4 Wochen haltbar, nur nach Bedarf ansetzen.
9)	SUBST	Substrat S, 12 ml , gebrauchsfertig, Meerrettich-Peroxidase-(POD)-Substrat, stabilisiertes H ₂ O ₂ -Tetramethylbenzidin
10)	H₂SO₄	Stopplösung SL, 12 ml , gebrauchsfertig, 0,2 M Schwefelsäure
11)		2x Abdeckfolie für die Mikrotiterplatte, selbstklebend

Zusätzlich benötigte Materialien

Destilliertes oder entmineralisiertes Wasser zum Verdünnen des Waschpuffers WP
Mikropipetten und Mehrkanal-Pipetten mit auswechselbaren Einmalspitzen
Vortex-Mischgerät
Mikrotiterplattenschüttler (350 rpm)
Mikrotiterplattenwasher (empfohlen)
Photometer für Mikrotiterplatten ("ELISA-Reader"), Filter bei 450 und ≥ 590 nm.
Polyethylen PE/ Polypropylen PP Röhrchen zum Verdünnen der Proben

TECHNISCHE HINWEISE

Reagenzien mit unterschiedlichen Lot-Nummern sollten nicht vermischt werden. Alle Reagenzien sind ungeöffnet, lichtgeschützt und bei 2° - 8°C gelagert mindestens haltbar bis zum Verfallsdatum (s. Etikett).

Bei sachgemäßer Handhabung ist die **Haltbarkeit der Reagenzien nach Öffnung** nicht beeinträchtigt. **Wiederholtes Einfrieren und Auftauen ist zu vermeiden.** Wenn mehrere unabhängige Messungen über eine längere Periode mit einem Kit geplant sind, wird vorherige Aliquotierung der Komponenten in passende Volumina empfohlen.

Alle Komponenten des Kits müssen **vor Gebrauch auf Raumtemperatur** gebracht werden, die evtl. in manchen Puffern vorhandenen Präzipitate müssen vor Gebrauch durch Mischen und Erwärmen wieder gelöst werden.

Inkubation bei Raumtemperatur bedeutet: Inkubation bei 20 - 25°C.

Die Inkubationen sollen geschüttelt bei mittlerer Umdrehungsfrequenz eines für Mikrotiterplatten geeigneten Schüttlers erfolgen. Wir empfehlen 350 rpm. Bauartbedingt können individuell Abweichungen von diesem Wert möglich sein, dann muss die Umdrehungsfrequenz angepaßt werden. Zu geringes Schütteln kann durch ungenügende Vermischung der Lösungen zu verringerten optischen Dichten, hohen Streuungen und/oder falschen Werten führen, zu starkes Schütteln dagegen zu erhöhten optischen Dichten und/oder falschen Werten.

Korrektes Waschen ist von grundlegender Bedeutung für den sicheren, richtigen und präzisen Ablauf des Testes. Ungenügendes Waschen ist eine häufige Ursache für nicht valide Testdurchführungen. Mögliche Folgen sind unkontrollierte unspezifische Variationen der gemessenen optischen Dichten, die zu falschen Ergebnisberechnungen der Proben führen können. Mögliche Hinweise darauf sind z.B. hohe Leerwerte und variabel streuende Messwerte.

Zum Waschen muss der mitgelieferte und auf Gebrauchskonzentration verdünnte Waschpuffer verwendet werden. Das Waschvolumen pro Waschzyklus und Vertiefung muss mindestens 300 μ l betragen.

Die mögliche Gefährdung durch den Umgang mit zumindest potentiell infektiösem Material muss beachtet werden.

Bei Gebrauch eines speziellen automatischen Mikrotiterplattenwashers ist unbedingt dessen Gebrauchsanweisung zu befolgen. Die Geräteeinstellungen müssen u.a. der Mikrotiterplattengeometrie und den Parametern der Waschspezifikation angepasst werden. Es ist zu beachten, dass die Dispensier- und Absaugkapillaren des Gerätes nicht die Oberfläche der Vertiefungen der Mikrotiterplatte beschädigen. Die verbleibende Restflüssigkeit nach jedem Absaugen muss minimiert werden. Nach Ende des gesamten Waschvorganges sollte die Menge der verbleibenden Restflüssigkeit überprüft und ggfs. verringert werden durch mehrmaliges Ausklopfen der Mikrotiterplatte auf nicht fuselndem Zellstoff.

Manuelles Waschen ist eine gute Alternativoption. Die Waschflüssigkeit kann dabei per Multistepper, Mehrkanalpipette oder auch mit einer Spritzflasche dispensiert werden. Die Waschflüssigkeit kann durch schwingvolles Ausschwenken der Mikrotiterplatte über einem Becken entfernt werden. Falls Absaugvorrichtungen eingesetzt werden, ist darauf zu achten, dass die Oberflächen der Vertiefungen der Mikrotiterplatte nicht beschädigt werden. Nach jedem einzelnen Waschzyklus sollte die

verbleibende Restflüssigkeit durch Ausklopfen der Mikrotiterplatte auf nicht fuselndem Zellstoff gründlich entfernt werden.

Standards und Kontrollen

Die Standards **A – E** und Kontrollen **KS1 und KS2** werden mit dem im Kit enthaltenen Probenpuffer **PP** rekonstituiert. Es empfiehlt sich, zum Rekonstituieren die Reagenzien 15 Minuten bei Raumtemperatur stehen zu lassen und sie anschließend kräftig mit einem Vortex-Mixer zu mischen. Schaumbildung sollte jedoch vermieden werden.

Rekonstituierte Komponenten (Standards A – E und Kontrollseren KS1/KS2) können bis **zu einer Woche** bei 2-8°C aufbewahrt werden. Falls eine längere Lagerungszeit benötigt wird, sollten die Komponenten bei -20°C (oder kälter) aufbewahrt werden, dies verlängert die Haltbarkeit auf **mind. 2 Monate**. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen sollte vermieden werden. Wenn mehrere unabhängige Funktionale-IGFBP-3 -Messungen über eine längere Periode mit einem Kit geplant sind, wird vorherige Aliquotierung der Komponenten in passende Volumina empfohlen.

Ligandkonjugat LK und Enzymkonjugat EK

Für die Verdünnung der Konzentrate des **Ligandkonjugates LK** und **Enzymkonjugates EK** wird der **Verdünnungspuffer VP** verwendet. Die gebrauchsfertig 1:101 verdünnte Lösungen sind nur begrenzt haltbar.

Waschpuffer

Der 1:20 gebrauchsfertig verdünnte Waschpuffer WP ist max. 4 Wochen bei 4°C haltbar, bitte nur nach Bedarf ansetzen.

Testplatte

Nicht verwendete Streifen der Testplatten sind zusammen mit dem Trockenkissen luftdicht in dem wiederverschließbaren Klipbeutel bei 2° - 8°C zu lagern. Die Haltbarkeit ist bei sachgerechter Lagerung nicht eingeschränkt.

Substrat

Die Substratlösung S, stabilisiertes H₂O₂-Tetramethylbenzidin, ist lichtempfindlich – Aufbewahrung und Inkubation bitte vor Licht geschützt.

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

Der Funktionale-IGFBP-3 LIA Kit E04A ist nur für in-vitro Gebrauch und nicht zur inneren Anwendung bei Mensch und Tier geeignet. Dieses Produkt darf nur exakt wie in der mitgelieferten Anleitung beschrieben eingesetzt werden. Mediagnost GmbH kann nicht für einen eventuellen Verlust oder Schaden haftbar gemacht werden, der durch Nichtbeachtung der Instruktionen entsteht, soweit keine gesetzliche Regelung anderes besagt.

Die gemessenen Extinktionen sind u.a. stark abhängig von der Temperatur, aber die berechneten Werte werden durch die Temperatur nicht beeinflusst.

Bitte benutzen Sie separate Pipettenspitzen für jede Probe, Kontrolle und Reagenz um Kreuzkontaminationen zu vermeiden. Bitte verwenden Sie Behältnisse nur für jeweils einzelne Reagenzien. Gießen Sie die Reagenzien nicht zurück in die Originalgefäße. Mischen Sie den Inhalt der jeweiligen Vertiefungen der Mikrotiterplatten gründlich. Verwenden Sie die Mikrotiterplattenvertiefungen nur jeweils einmal. Lassen Sie keine Vertiefung während des Assay-Vorgangs völlig austrocknen, sondern fügen Sie die jeweils folgenden Reagenzien sofort nach dem Abschluss des Waschvorganges dazu.

Angemessene Vorsichtsmaßnahmen und die Regeln der guten Laborpraxis müssen bei Lagerung, Gebrauch und Entsorgung der Bestandteile des Kits eingehalten werden. Die Entsorgung der Bestandteile des Kits muss nach den örtlichen Vorschriften erfolgen.

VORSICHT: Dieser Kit enthält Material humanen und/oder tierischen Ursprungs. Die Bestandteile des Kits sind so zu handhaben, als ob sie infektiös wären.

Menschliches Serum:

in folgenden Komponenten enthalten: **Standards A –E, KS1/KS2**

Das humane Material, das für die Präparation dieses Produktes verwendet wird, ist durch von der US-amerikanischen Arzneimittelzulassungsbehörde FDA empfohlene Nachweisverfahren auf die Präsenz von Antikörpern 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 gemäß den Vorgaben der Biosicherheitsstufe 2 gehandhabt werden.

5-Chloro-2-Methyl-2H-Isothiazolin-3-one and 2-methyl-2H-Isothiazol-3-one

in folgenden Komponenten enthalten: **LK, EK, VP, WP,PP**

< 0,01% (w/w) 5-chloro-2-methyl 2H isothiazol-3-one und 2-methyl-2H-isothiazol-3-one

R36/38	Reizend für Augen und Haut
R43	Kann bei Hautkontakt zur Sensibilisierung führen
S26	Im Falle von Augenkontakt sofort mit viel Wasser spülen und Arzt aufsuchen
S28.1	Im Falle von Hautkontakt sofort mit viel Wasser waschen

2-Methyl-4-Isothiazolin-3-one

in folgenden Komponenten enthalten: **LK, EK, VP,PP**

< 0,01% 2-methyl-2H-isothiazol-3-one

Substratlösung (S)

Das TMB-Substrat (S) enthält 3,3',5,5' Tetramethylbenzidin.

R20/21/R22	Gesundheitsschädlich bei Inhalation, Berührung mit der Haut und beim Verschlucken
R36/37/38	Reizend/Irritierend für Augen, Haut und Atmungssystem
S26	Im Falle von Augenkontakt sofort mit viel Wasser spülen und Arzt aufsuchen
S36/37	Geeignete Schutzhandschuhe und Schutzkleidung tragen

Stopplösung (SL)

Die Stopplösung enthält 0,2 M Schwefelsäure (H₂SO₄)

R36/38	Reizt die Augen und die Haut
S26	Im Falle von Augenkontakt sofort mit viel Wasser spülen und einen Arzt aufsuchen.
S36/37	Geeignete Schutzhandschuhe und Schutzkleidung tragen.

Erste-Hilfe Maßnahmen:

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

Nach Augenkontakt: Nach Berührung mit den Augen während mindestens 15 Minuten mit genügend Wasser spülen. Ausreichende Spülung durch Spreizung der Augenlider sicherstellen.

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

TESTDURCHFÜHRUNG

Bei der **Testdurchführung** sollten Standards **A-E**, Kontrollseren **KS1/KS2** und die jeweiligen Proben möglichst schnell pipettiert werden (z.B. in 15 Minuten). Das **Enzymkonjugat**, die Substratlösung **S** sowie die Stopplösung **SL** sollten jeweils in derselben Reihenfolge und in demselben Zeitintervall auf die Platte zugegeben werden. Dies verhindert Variationen in der Konzentrationsbestimmung durch unterschiedliche Inkubationszeiten.

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

- 1) Ligandkonjugat **LK 1:101** mit **Verdünnungspuffer VP** verdünnen (wenn die ganze Platte benutzt wird, wird 4.8ml benötigt. Bitte 60 µl konzentrierte LK mit 6 ml Verdünnungspuffer **VP verdünnen**).
- 2) In **alle Vertiefungen**, die benutzt werden sollen, **50 µl des 1:101 verdünnten Ligandkonjugates LK** pipettieren.
- 3) In die Positionen A1/2 je **50 µl Probenpuffer PP** geben (=Leerwert!)
- 4) In die Positionen B1/2 **50 µl je Standard A (0,4 ng/ml)**,
In die Positionen C1/2 **50 µl je Standard B (2 ng/ml)**,
In die Positionen D1/2 **50 µl je Standard C (6 ng/ml)**,
In die Positionen E1/2 **50 µl je Standard D (15 ng/ml)**,
In die Positionen F1/2 **50 µl je Standard E (30 ng/ml)**.
Zur Kontrolle der korrekten Durchführung des Tests können je **50 µl** der 1:505 in Probenpuffer **PP** (oder entsprechend der jeweiligen Verdünnung der Proben) verdünnten **Kontrollen KS1 und KS2** in die Positionen G1/2 und H1/2 gegeben werden.
In die restlichen Vertiefungen können je **50 µl der verdünnten Proben** (i.Allg. 1:505 in Probenpuffer **PP** verdünnt) pipettiert werden.
Die Verdünnungen bitte sofort nach Probenzugabe mischen und innerhalb von 60 Minuten verwenden.
- 5) Die Vertiefungen der Platte werden mit Klebefolie dicht abgedeckt und **2 Stunden** bei **Raumtemperatur** inkubiert (unter Schütteln 350 rpm).
- 6) Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Lösungen abgesaugt und die Platte mit **300 µl Waschpuffer WP** / Vertiefung **fünfmal** gewaschen.
- 7) Nach dem letzten Waschschrift werden **100 µl des 1:101 verdünnten Enzymkonjugates EK** / Vertiefung pipettiert (wenn die ganze Platte benutzt wird, wird 9.6 ml benötigt. Bitte 120 µl konzentrierte EK mit 12 ml Verdünnungspuffer **VP verdünnen**).
- 8) Die Vertiefungen der Platte werden mit Klebefolie dicht abgedeckt und **1 Stunde** bei **Raumtemperatur** inkubiert (unter Schütteln 350 rpm).
- 9) Nach Abschluss dieser Inkubation wird die Platte wie in Schritt 6) beschrieben gewaschen
- 10) In jede Vertiefung werden **100 µl der Substratlösung S** pipettiert.
- 11) Die Platte wird **30 Minuten im Dunkeln** bei **Raumtemperatur** inkubiert.
- 12) Nach Ablauf der Inkubationszeit wird in jede Vertiefung **100 µl Stopplösung SL** pipettiert.
- 13) Die Ausmessung der Farbreaktion erfolgt **innerhalb von 30 Minuten bei 450 nm** (**Referenzfilter ≥590 nm**).

AUSWERTUNG

Berechnung der Standardkurve

Zur Auswertung des Testes sollte gewährleistet sein, dass die Extinktionen des Leerwertes 0,25 Einheiten nicht überschreiten, Standard E sollte dagegen Extinktionen über 1,0 Einheiten erreichen.

Proben, die höhere Extinktionen als der Standard E erzielen, liegen außerhalb der Standardkurve, zur sicheren Bestimmung sollten diese Proben in einer zweiten Testdurchführung bei höherer Verdünnung nochmals bestimmt werden.

Die bereitgestellten Standards enthalten folgende Funktionale-IGFBP-3-Konzentrationen:

Standard	A	B	C	D	E
ng/ml	0,4	2	6	15	30

- 1) Ermittlung des **Mittelwerts** der optischen Dichte des Leerwertes aus den Doppelbestimmungen (Vertiefung A1/A2).
- 2) Von den Mittelwerten der optischen Dichte der Standardkonzentrationen und der Proben wird der mittlere Leerwert abgezogen.
- 3) Die Standardkonzentrationen (x-Achse) werden gegen die gemessene optische Dichte (y-Achse) aufgetragen.
- 4) Die Berechnung der Standardkurve sollte durch ein statistisches Programm erfolgen, da die Kurve i.Allg. nicht ideal durch eine lineare Regression beschrieben wird. **Ein höhergradiges Polynom, 4-Parameter-Anpassungen** oder **nicht-lineare Regression** sind zur Auswertung geeignet, in manchen Fällen kann eine Spline oder Punkt-zu-Punkt Anpassung angebracht sein.
- 5) Die Multiplikation des jeweiligen für die Proben berechneten Funktionalen-IGFBP-3-Gehaltes mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor der Proben ergibt IGFBP-3-Konzentration in ng/ml Division durch 1000 liefert die Werte in µg/ml bzw. gleichwertig mg/Liter (Bsp: ein Messwert wird mit 6 ng/ml gefunden, Probe war 1:505 verdünnt eingesetzt: $6 \times 505 = 3030$ ng/ml, oder 3,03 µg/ml bzw. 3,03 mg/L, je nach gewünschter Einheit).

NORMALWERTE GESAMT-IGFBP-3

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 Tabelle 5 durch Perzentilen angegeben. In Abb.6 und 7 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 ELISA aber kaum beeinflussen.

ERWARTUNGSWERTE VON FUNKTIONALEM-IGFBP-3

Es wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen Normalwerte für Funktionales-IGFBP-3 erstellt. Die angegebenen **Gesamt-IGFBP-3** Werte (Tab. 5) können für die Einschätzung von Erwartungswerten sowie wie für die Quantifizierung des **IGFBP-3 Fragmentierungsgrads in den Proben** benutzt werden.

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

PACKAGE INSERT ENGLISH

CLINICAL RELEVANCE

This Ligand-binding Immunoassay kit is suited for measuring human bioactive and functional - IGF-I binding - IGFBP-3.

In conjunction with correspondent measurements in the same samples of total IGFBP-3 (tIGFBP-3) with respective Mediagnost kits E03, IGF-R10, or, IGF-R11, the degree of fragmented IGFBP-3 can be determined.

TECHNICAL PROPERTIES AND APPLICATIONS

Mediagnost IGFBP-3 LIA E04A

- ◆ Quantitative determination of **functional bioactive (IGF-I binding) IGFBP-3: convenient "ELISA", no sample pretreatment**
- ◆ solely **functional bioactive IGF-I-binding IGFBP-3** is being quantified, proteolytic fragments without binding affinity to the **natural ligand IGF-I** are not measured
- ◆ **Inter-Assay variation** of max. **6.8%**, **Intra-Assay variation** of max. **5.6%**
- ◆ reliable, fast and simple: performance like a conventional ELISA
- ◆ **Total IGFBP-3** integrates the GH secretory state over days, with stable serum levels due to absence of circadian variation a single measurement is highly informative for diagnosis of GH deficiency or GH excess: **correspondent measurement of functional IGFBP-3** reflects the respective degree of fragmentation of IGFBP-3 and thus allows further interpretation of the results
- ◆ **Direct Correlation** to the quantitative results of the immune reactive total IGFBP-3 from the respective Mediagnost Kits (E03A, IGF-R10, IGF-R11). In retrospect, or, in simultaneous determinations out of the same sample dilution!
- ◆ Small sample requirement, thus ideal for pediatric patients

INTRODUCTION

MEASURING IGFBP-3

All currently existing IGFBP-3 immunoassays use the binding of specific anti-IGFBP-3 antibodies for signal generation and thus IGFBP-3 quantification. The failure of differentiation between complete IGFBP-3 molecules and their respective fragments (derived physiologically due to the different proteases activities) is unavoidable in this system. Because one molecule IGFBP-3 can be cleaved in several fragments often false high quantitative values are measured. Based on this methodology it is not possible to differentiate between high IGFBP-3 levels in fact, or, a high degree of fragmentation. The incidental attempts to use monoclonal antibodies with a binding region represented only by the intact IGFBP-3 molecule are indirect, imprecise and insufficient. The activities of all effective proteases, which have different sites of action and therefore generate different kind of fragments, are disregarded.

The Mediagnost IGFBP-3 LIA however enables to determine the **real functional and effective bioactive IGFBP-3**, functional in terms of binding ability of the mainly interesting natural ligand, namely IGF-I !

The new test principle (patent pending DE19719001) uses anti-IGFBP-3 antibodies immobilized on the microtitre plate and biotinylated IGF-I as ligand. The IGFBP-3 of the sample is bound to the microtitre plate, and only concomitant bound, by IGFBP-3, biotinylated IGF-I gives the specific signal of the test. Therefore only functional IGFBP-3 is quantified. The patented test format ensures an easy and reliable performance, simply like a conventional ELISA kit. Advanced and

time- as well as labor-intensive biochemical analysis (e.g., by size chromatography or Western Blots, etc.), which moreover only allows an estimation of concentrations, has become redundant.

TOTAL IGFBP-3

Insulin-like growth factors (IGF)-I and -II are bound to specific binding proteins (IGFBPs) in the circulation. To date, at least six binding proteins can be distinguished on the basis of their amino acid sequence. They are designated as IGFBP-1, IGFBP-2, ...IGFBP-6 (1). Lately the discovery of a new IGFBP-7 has been discussed (2). The predominating IGFBP in blood is IGFBP-3. In contrast to the other binding proteins, IGFBP-3 has the unique property to associate with an acid-labile non-binding subunit (ALS) after binding of either IGF-I or IGF-II (3-5). Most of the IGFBP-3 in plasma is present as the high molecular weight ternary complex, however, small amounts of free IGFBP-3 are also found (6, 7).

The development of specific immunoassays for IGFBP-3, those also recognizing the complete high molecular weight complex, provided new in-sights into its regulation (6-9). On the basis of these findings total serum IGFBP-3 has proved to be an additional useful test in the repertoire of diagnostic tools for evaluation of growth disorders (7, 8).

Patients with GH deficiency have subnormal total IGFBP-3 levels. In contrast, most of the small statured children with normal GH secretion have levels within the normal range (Figure 1).

The separation of these two groups is easy. A single measurement of the total IGFBP-3 concentration is sufficient for the diagnosis of GH deficiency with high accuracy (7, 18). In small statured children total IGFBP-3 levels rise to normal range within several days of GH administration and remain normal during continuous GH treatment (Figure 2). Therefore, total serum IGFBP-3 measurements are also suited for evaluating the potential of a patient to respond to GH and for GH therapy monitoring (19). In other patients of severe short stature, e.g. Ullrich-Turner syndrome or Silver-Russell syndrome, IGFBP-3 levels were found normal (8) reflecting normal GH secretion.

In normal tall children and adolescents without excessive GH secretion or in patients with Sotos syndrome, total IGFBP-3 levels are normal or slightly increased. In contrast, children with pituitary gigantism or adults with acromegaly have clearly elevated levels (Figure 3) (6, 15) that normalize on successful treatment. Therefore, total IGFBP-3 is also a useful parameter for the detection of excessive GH secretion and monitoring therapy efficacy. In precocious puberty, total IGFBP-3 levels are clearly increased by chronological age, whereas patients with premature thelarche have total IGFBP-3 levels in the upper normal range (15).

Several factors besides GH influence total IGFBP-3 levels: age including sexual development, nutrition, hypothyroidism, diabetes mellitus, liver function and kidney function. Total IGFBP-3 levels are decreased by malnutrition, although less than IGF-I, in hypothyroidism, in diabetes mellitus and in hepatic failure (6-8), but are obviously increased in chronic renal failure (6, 10, 11). Measurement over 24 hours revealed constant circadian levels (12, 13). For clinical practice, the most important regulatory factor is GH. Single total IGFBP-3 measurements correlate significantly with the logarithm of the integrated spontaneous GH secretion (8, 14). In patients with GH deficiency, total IGFBP-3 levels are subnormal and increase gradually to within the normal range after several days of GH administration (7, 8). The slow response to GH and constant circadian levels during chronic daily application of GH (13) suggest that IGFBP-3 reflects the GH secretory state over days.

FRAGMENTED IGFBP-3

By proteolytical cleavage of the ternary complex of IGFBP-3, the physiological storage of IGF-I in circulation, IGF-I is released and subsequently able to bind to its cellular receptor.

IGFBP-3 can be cleaved by several proteases: Plasmin; PSA; MMPs; CathepsinD, Thrombin, gamma NGF.

Cleavage results not only in free IGF-I but also in different IGFBP-3 fragments. Dependent on the active protease, 22 cleavage sites are known, mostly located in the variable and the N-terminal region but some also in the C-terminal part. Fragments of about 30, 20 and 15 kDa can be generated by proteolysis. Their existence was proven by western ligand blotting. The corresponding immunoblot demonstrated that not all fragments are able to bind IGF-I any more. So cleavage of IGFBP-3 results in at least partial loss of IGF-I affinity (20).

IGFBP-3 proteolysis can be found in a number of body fluids, like synovial fluid, amnion fluid, seminal fluid, interstitial fluid, peritoneal fluid, lymph and serum, of course. In all these body fluids different proteases can be activated resulting in a different fragmentation pattern of IGFBP-3 of different relevance for physiology (21).

Beside pregnancy, where nearly all serum IGFBP-3 is fragmented, several pathological conditions are known where the fragmentation level of IGFBP-3 is changed.

An increase in IGFBP-3 fragmentation is seen in:

Growth Hormone Receptor Insensitivity (22, 23),

Catabolic States like sepsis, traumatic and postoperative states (24-26),

Non-Insuline-Dependent Diabetes (27),

Burns (28),

Cancer, i.e., breast cancer (29), colorectal cancer (30), tumor of the nervous system of children (31).

A decrease in IGFBP-3 fragmentation is seen in the synovial fluid of arthritic patients (32).

In certain previous studies for determining the degree of fragmentation of IGFBP-3 more sophisticated and laborious biochemical methods were involved. In these studies, in healthy individuals around 25 – 30% of serum total IGFBP-3 was found to be proteolyzed, this part was quantified more elevated in samples of acromegalic, IDDM and NIDDM patients (33, 34).

Assay Characteristics

It utilizes specific and high affinity antibodies for IGFBP-3, the antibodies are immobilized on the microtitre plate. The ligand, biotinylated IGF-I is pre-dispensed in excess into the needed wells. The sample is diluted outside within a special dilution buffer (Sample Buffer PP); all naturally bound IGFs are thereby released from their binding proteins. By adding an aliquot of such diluted sample with free IGFBP-3 to the ligand containing wells, the biotinylated IGF-I occupies all existing specific binding sites of the IGFBP-3. All IGFBP-3 molecules are bound afterwards to the microtitre plate, however by using a Streptavidin-Peroxydase-(POD)-Conjugate only the complexes of IGFBP-3/biotinylated IGF-I are involved in signal generation (in the closing POD-substrate reaction), thus, only functional IGFBP-3 is being quantified !

The standards of the LIA E04A are made of **native and functional human IGFBP-3** in concentrations of **0.4, 2, 6, 15 and 30 ng/ml**.

The **analytical sensitivity** of the LIA E04A has been determined with **0.18 ng/ml** (2 SD of zero standard in 16fold determination).

The Mediagnost IGFBP-3 LIA E04A is over a very wide range dilution true. The **Linearity of the dilution of sera** is excellent (s. Table 1).

Table 1: The linearity of the sample dilution

Dilution:	Sample 1 (recalculated, ng/ml)
1:100	2817
1:200	2962
1:400	3094
1:600	3055
1:800	3229
1:1000	2951
1:1200	2908
1:1600	2989
AV / SD / VC%	3001 / 125 / 4.2

AV = Average Value, **SD** = Standard deviation **VC** = Variation Coefficient%

The **Inter-** and **Intra-Assay** variation coefficients were found lower than **6.8%** and **5.6%**. Exemplary determinations are shown in table 2 and table 3.

Table 2: Inter-Assay-Variation (n=8)

	Mean Value (ng/ml)	Standard Deviation (ng/ml)	VC (%)
Sample 1	1051	30	3.0
Sample 2	1891	129	6.8
Sample 3	2417	158	6.5

Table 3: Intra-Assay-Variation (n=16)

	Mean Value (ng/ml)	Standard Deviation (ng/ml)	VC (%)
Sample 1	1061	26	2,5
Sample 2	1571	85	5.4
Sample 3	2660	148	5.6

Clinical Validation

TOTAL IGFBP-3

Clinical validation was achieved by determination of total immunoreactive IGFBP-3 levels in a large number of normal children and adults, normal short statured children without GH deficiency, girls with Ullrich-Turner Syndrome, children with Silver-Russell Syndrome, patients with GH deficiency, children with familial tall stature, Sotos-Syndrome, patients with acromegaly, children with premature thelarche and precocious puberty (Tab. 5; Fig. 1, 2, 3, 6 und 7). Based on these studies the respective Mediagnost kits for measurement of total human immunoreactive IGFBP-3 (i.e., E03A, IGF-R10, IGF-R11) are CE-approved for the clinical diagnostic use.

FRAGMENTED IGFBP-3

The results determined with the human IGFBP-3 LIA E04A are only for research use! Due to the new developed test system there are at present no concrete and specific clinical data available. Instructive might be the comparison of total IGFBP-3 values versus functional IGFBP-3 values in different subsets of samples.

Figure 4 shows results of comparative determinations of sera of healthy blood donors with the functional IGFBP-3 LIA E04A for functional IGFBP-3 and for total immunoreactive IGFBP-3 with Mediagnost kits, respectively. Functional IGFBP-3 values were found consistently lower on average compared with the corresponding total IGFBP-3.

Thereby a slight gender difference was obvious. Total IGFBP-3 serum concentrations of males were found lower than those of females. Functional IGFBP-3 concentrations of females and males however were found with nearly equal absolute values. Functional IGFBP-3 serum concentrations were found on average 25 % lower (Tab. 4; Fig 4).

Tab. 4: Mean total and functional IGFBP-3 values of sera of 103 female and 109 male healthy blood donors (IGFBP-3 concentrations in ng/ml). Average age was 42 years in each subset.

	Total IGFBP-3; min/max (ng/ml)	Functional IGFBP-3; min/max (ng/ml)	Functional IGFBP-3 (% of total)
Females	3568; 1752/5752	2506; 1102/4346	70,2
Males	2752; 1258/4726	2332; 1337/4304	84,8
overall	3160	2419	77,5

In a subset of pathological sera of donors suffering from different diseases substantially lower functional IGFBP-3 concentrations were obvious (Fig. 5). Further and more detailed studies however are necessary to reveal the underlying mechanisms and, from this to develop new diagnostic insights and processes.

WARNINGS AND PRECAUTIONS

The functional **IGFBP-3 LIA, E04A** is for in-vitro use only!. **For professional use only.**

Before starting the assay, read the instructions completely and carefully. Use the valid version of the package insert provided with the kit. Be sure that everything is understood. The Mediagnost GmbH is not liable for any loss or harm caused by non-observance of the instructions, as far as no law withstands.

Temperature WILL affect the absorbance readings of the assay. However, values for the patient samples will not be affected.

The shelf life of the components after opening is not affected, if used appropriately.

Do not use expired reagents.

Use separate pipette tips for each sample, control and reagent to avoid cross contamination. Use reservoirs only for single reagents. This especially applies to the substrate reservoirs. Using a reservoir for dispensing a substrate solution that had previously been used for the conjugate solution may turn solution colored. Do not pour reagents back into vials as reagent contamination may occur. Mix the contents of the microplate wells thoroughly to ensure good test results. Do not reuse microwells. Do not let wells dry during assay; add reagents immediately after completing the rinsing steps.

Caution: This kit contains material of human and/or animal origin.

Human Serum

Contained in following components: **Control Seren KS1 und KS2**

The source of human serum was tested by FDA recommended methods and found non-reactive for Hepatitis-B surface antigen (HBsAg), Hepatitis C virus (HCV), and Human Immunodeficiency Virus 1 and 2 (HIV) antibodies. No known test methods can offer total assurance of the absence of infectious agents; therefore all components and patient's specimens should be treated as potentially infectious.

Stop solution contains 0.2 M Sulphuric Acid (H₂SO₄)

R36/38 Irritating to eyes and skin
S26 In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice
S28.1 After contact with skin, wash immediately with plenty of water
S36/37 Wear suitable protective clothing and gloves

2-Methyl-4-Isothiazolin-3-one

contained in following components: **AK, VP, PP**

< 0.01% 2-Methyl-4-isothiazolin-3-one Solution

R34 Irritating to eyes and skin
R43 Sensibilisation through skin contact possible
S26 In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice
S36/37 Wear suitable protective clothing and gloves
S45 In case of accident or if you feel unwell seek medical advice

5-chloro-2-methyl 2H isothiazol-3-one and 2-methyl-2H-Isothiazol-3-one

contained in following components: **AK, VP, WP, PP**

< 0.01% (w/w) 5-chloro-2-methyl 2H isothiazol-3-one and 2-methyl-2H-Isothiazol-3-one Solution

R36/38 Irritating to eyes and skin
R43 Sensibilisation through skin contact possible
S26 In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice
S28.1 After contact with skin, wash immediately with plenty of water

TMB-Substrate (S) contains 3,3',5,5' Tetramethylbenzidine.

R20/21/R22 Harmful by inhalation, in contact with skin and if swallowed
R36/37/38 Irritating to eyes, respiratory system and skin
S26 In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice
S28.1 After contact with skin, wash immediately with plenty of water
S36/37 Wear suitable protective clothing and gloves

General first aid procedures:

Skin contact: Wash affected area thoroughly with water. Discard contaminated cloths and shoes.

Eye contact: In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water at least 15 minutes.

In order to assure an effectual rinsing spread the eyelids.

Ingestion: If swallowed, wash out mouth thoroughly with water. Immediately see a physician.

Do not eat, drink or smoke in these areas.

Never pipette the materials with the mouth.

Spilled material must be wiped off immediately and should become disinfected. Clean contaminated areas and equipment with a suitable detergent.

REAGENTS PROVIDED

1)	MTP	Microtiter plate , ready for use, Microtiter plate with 96 wells, divided up in 12 strips à 8 wells (separately breakable). Coated with an antibody against human IGFBP-3.
2)	CAL	Standards A-E, 1 ml , lyophilised, contain native human functional IGFBP-3. Standard values are between 0.4 - 30 ng/ml (0.4, 2, 6, 15 and 30 ng/ml) functional IGFBP-3. Standards are to be reconstituted with 1 ml Sample Buffer PP each. Use 50 µl per well in the assay.
3)	DILU	Dilution Buffer VP, 30 ml , ready for use, please use for the dilution of the Ligand Conjugate LK and the Enzyme Conjugate EK
4)	DILU	Sample Buffer PP, 120 ml , ready for use, green colored, please use for reconstitution of Standards and Control and for dilution of the Samples and Control .
5)	Control	Control Seren KS1 and KS2, 250 µl , lyophilised, contain human Serum and should be reconstituted in 250 µl Sample Buffer PP. The functional IGFBP-3 target values and the respective ranges are given on the vial labels. The dilutions should be according to the dilution of the respected samples. Use 50 µl per well in the assay.
6)	Ligand	Ligand Conjugate LK, 100 µl , 101-fold Concentrate, contains biotinylated recombinant human IGF-I. Before use dilute 1:101 with VP. Use 50 µl per well in the assay.
7)	CONJ	Enzyme Conjugate EK, 140 µl , 101-fold Concentrate, contains HRP (Horseradish-Peroxidase)-labelled Streptavidin. Before use dilute 1:101 with VP. Use 100 µl per well in the assay.
8)	WASHBUF 20x	Washing Buffer (WP), 50 ml , 20 X concentrated solution. Washing buffer has to be diluted 1:20 with A.dest. or demineralised water before use (e.g. add the complete contents of the flask 50 ml into graduated flask and fill with A.dest to 1000 ml). Attention: After dilution, the Washing Buffer is only 4 weeks stable, please dilute only according to requirements.
9)	SUBST	Substrate (S), 12 ml , ready for use, horseradish-peroxidase-(HRP)-substrate, stabilised H ₂ O ₂ Tetramethylbencidine.
10)	H ₂ SO ₄	Stopping Solution (SL), 12 ml , ready for use, 0.2 M sulphuric acid, Caution acid!
11)		Sealing tape for covering of the microtiter plate, 2 x, adhesive.

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

Precision pipettes and multichannel pipettes with disposable plastic tips
 Distilled or deionized water for dilution of the Washing Buffer (WP)
 Vortex-mixer
 Microtiter plate shaker (350 rpm)
 Microtiter plate washer (recommended)
 Micro plate reader ("ELISA-Reader") with filter for 450 and ≥590 nm
 Polyethylen PE/Polypropylen PP tubes for dilution of samples

TECHNICAL NOTES

The assay has to be conducted strictly according the test protocol herein.

Reagents with different lot numbers cannot be mixed. The microtiterplate and reagents are stable until the indicated expiry, if stored unopened and protected from sunlight at 2 – 8°C.

The shelf life of the components after opening is not affected, if used appropriately.

Bring all reagents to room temperature (20 - 25°C) before use. Possible precipitations in the buffers have to be resolved before usage by mixing and / or warming.

Incubation at room temperature means: 20-25°C

The incubation steps should be performed at mean rotation frequency of a particularly suitable microtitre plate shaker. We are recommending 350 rpm. Due to certain technical differences deviations may occur, in case the rotation frequency must become adjusted. Insufficient shaking may lead to inadequate mixing of the solutions and thereby to low optical densities, high variations and/or false values, excessive shaking may result in high optical densities and/or false values.

Proper washing is of basic importance for a secure, reliable and precise performance of the test. Incomplete washing is common and will adversely affect the test outcome. Possible consequences may be uncontrolled unspecific variations of measured optical densities, potentially leading to false results calculations of the examined samples. Effects like high background values or high variations may indicate washing problems.

All washing must be performed with the provided washing buffer diluted to usage concentration. Washing volume per washing cycle and well must be 300 µl at least.

The danger of handling with potentially infectious material must be taken into account.

When using an automatic microtitre plate washer, the respective instructions for use must be carefully followed. Device adjustments, e.g. for plate geometry and the provided washing parameters, must be performed. Dispensing and aspirating manifold must not scratch the inside well surface. Provisions must be made that the remaining fluid volume of every aspiration step is minimized. Following the last aspiration step of each washing cycle, this could be controlled, and possible remaining fluid could then be removed, by inverting the plate and repeatedly tapping it dry on non fuzzy absorbent tissue.

Manual washing is an adequate alternative option. Washing Buffer may be dispensed via a multistepper device, a multichannel pipette, or a squirt bottle. The fluid may be removed by dynamically swinging out the microtitre plate over a basin. If aspirating devices are used, care has to be taken that the inside well surface is not scratched. Subsequent to every single washing step, the remaining fluid should be removed by inverting the plate and repeatedly tapping it dry on non fuzzy absorbent tissue.

Standards and Control

The Standards **A – E** and **Control Sera KS1 and KS2** are reconstituted with the **Sample Buffer PP** provided in the Kit. It is recommended to keep the reconstituted reagents at room temperature for 15 minutes and then to mix them thoroughly but gently (no foam should result) with a Vortex mixer.

Reconstituted components (Standards (A – E) and Control Sera (KS1/KS2)) should be stored at 2-8°C for up to 1 week. If longer storage time is needed, store the components frozen at -20°C or below. Freezing extends the expiry at least 2 months. Avoid repeated freeze-thaw cycles. In case you plan to perform multiple independent IGFBP-3 determinations over a longer period with one kit, you should aliquot the components prior to freezing into suitable smaller volumes. This is strongly recommended.

Ligand and Enzyme Conjugate

Use the Dilution Buffer **VP** for the dilution of Ligand Conjugate **LK** and Enzyme Conjugate **EK** concentrates. The diluted solutions are only limited stable at 2-8°C.

Washing Buffer

The required volume of washing buffer is prepared by 1:20 dilution of the provided 20-fold concentrate with deionised water. The diluted Washing Buffer is stable for max. 4 weeks at 2-8°C.

Substrate Solution

The **Substrate Solution S**, stabilised H₂O₂-Tetramethylbencidine, is photosensitive – store and incubate in the dark.

Microtiterplate

Store the once unused microtiter strips and wells together with the desiccant in the tightly closed clip lock bag at 2-8°C use in the frame provided. The labelled expiry is not influenced in case of proper storage.

SPECIMEN COLLECTION, PREPARATION AND STORAGE

Serum samples as well as Heparin- and EDTA-Plasma samples are suited. Possible dilution of the sample by the anticoagulant must be considered. Citrate-Plasma samples are not recommended, values are reduced. A special external sample preparation prior to assay is not required.

Slight Hemolysis of the samples obviously doesn't disturb the determination. An external sample preparation prior to assay is not required (see below). Samples should be handled as recommended in general: collected and refrigerated as fast as possible. In case there will be a longer period (>24 hours) between the sample withdrawal and determination, store the undiluted samples frozen at -20°C or below in tightly closable plastic tubes. Avoid on principal repeated freeze-thaw cycles of serum/plasma (if required, please sub-aliquot) although functional IGFBP-3 levels were found to be unaffected by a few cycles, (3x) in our experiments. The high sensitivity of the assay allows the functional IGFBP-3 measurement in small sample volumes.

In most determinations (e.g., Serum- or Plasma samples and no extreme values expected) the dilution of **1:505 with Sample Buffer PP is suitable**, thus the respective covered **assay range is 0.2 to 15.15 mg/l**. Where required, depending on the expected IGFBP-3-values, the dilution with **Sample Buffer PP** can be higher or lower. The IGFBP-3 concentrations maybe completely different in body fluids of human origin other than serum or in cell culture supernatants.

Suggestion for dilution protocol:

Pipette **1 ml Sample Buffer PP** (green colored) in PE-/PP-Tubes (application of a multi-stepper is recommended in larger series), add **10 μl Serum- or Plasma** (dilution 1:101). Add 400 μl Sample Buffer **PP** in an other PE-/PP-tube and 100 μl of the thoroughly mixed first dilution (dilution 1:5). After mixing use **50 μl** of this 1:505 diluted solution within 1 hour **per determination** in the assay (pipetting control = blue coloring of the solution in the wells).

ASSAY PROCEDURE

NOTES: All determinations (Standards, Control Serum and samples) should be assayed in duplicate. For optimal results, accurate pipetting and adherence to the protocol are recommended.

When performing the assay, the Standards, Control Sera and the samples should be pipette as fast as possible (e.g. <15 minutes). To avoid distortions due to differences in incubation times, the **Enzyme Conjugate**, the **Substrate Solution S** as well as the **Stop Solution SL** should be added to the plate in the same order and in the same time interval each, respectively.

- 1) Please dilute the Ligand Conjugate LK 1:101 with **Dilution Buffer VP** (for use of the entire Microtitre Plate you may need 4.8 ml, thus you may dilute 60 μl of concentrated **LK** with 6 ml of buffer **VP**).
- 2) Add in every needed well **50 μl** of the already 1:101 diluted **Ligand Conjugate LK**
- 3) Add **50 μl Sample Buffer PP** in positions A1/2 (=blank wells!)
- 4) Pipette in positions B1/2 **50 μl** each **Standard A (0.4ng/ml)**,
pipette in positions C1/2 **50 μl** each **Standard B (2 ng/ml)**,
pipette in positions D1/2 **50 μl** each **Standard C (6 ng/ml)**,
pipette in positions E1/2 **50 μl** each **Standard D (15 ng/ml)**,
pipette in positions F1/2 **50 μl** each **Standard E (30 ng/ml)**.

To control the correct test accomplishment **50 μl** of the 1:505 (or in respective dilution rate of the sample) in Sample Buffer **PP** diluted **Control Sera KS1** and **KS2** can be pipetted in positions G1/2 and H1/H2.

Pipette **50 μl each** of the **diluted sample** (generally 1:505 diluted in Sample Buffer **PP**) in the rest of the wells, according to requirements. Please mix the dilutions immediately after sample addition and use within 60 minutes.

- 5) Cover the wells with the sealing tape and incubate the plate for **2 hours** at **room temperature** (shake at 350 rpm).
- 6) After incubation aspirate the contents of the wells and wash the wells **5 times** with **300 µl Washing Buffer WP**.
- 7) Following the last washing step, pipette **100 µl** of the **1:101 Enzyme Conjugate EK** in each well (for use of the entire Microtitre Plate you may need 9.6 ml, thus you may dilute 120 µl of concentrated **EK** with 12 ml of buffer **VP**).
- 8) Cover the wells with the sealing tape and incubate **1 hour** at **room temperature** (shake at 350 rpm).
- 9) After incubation wash the wells **5 times** with **Washing Buffer WP** as described in step 6
- 10) Pipette **100 µl of the TMB-Substrate solution S** in each well.
- 11) Incubate the plate for **30 Minutes in the dark** at **room temperature**.
- 12) After incubation pipette **100 µl Stop Solution SL** in each well.
- 13) Measure the absorbance **within 30 minutes at 450 nm (Reference filter ≥590 nm)**.

QUALITY CONTROL

Good laboratory practice requires that controls be run with each calibration curve. A statistically significant number of controls should be assayed to establish mean values and acceptable ranges to assure proper performance. The test results are only valid if the test has been performed following the instructions. Moreover the user must strictly adhere to the rules of GLP (Good Laboratory Practice) or other applicable federal, state or local standards/laws. All standards and kit controls must be found within the acceptable ranges as stated on the QC Certificate. If the criteria are not met, the run is not valid and should be repeated. Each laboratory should use known samples as further controls.

CALCULATION OF RESULTS

Establishing the Standard Curve

For the evaluation of the assay it is preconditioned that the absorbance values of the blank should be 0.25, these of standard E should be above 1.0.

Samples, which yield higher absorbance values than Standard E, are beyond the standard curve, for reliable determinations these samples should be tested anew with a higher dilution.

The standards provided contain the following concentrations of functional IGFBP-3:

Standard	A	B	C	D	E
ng/ml	0.4	2	6	15	30

- 1) Calculate the **mean absorbance** value for the blank from the duplicated determination (well A1/A2).
- 2) Subtract the mean absorbance of the blank from the mean absorbances of all other values.
- 3) Plot the standard concentrations on the x-axis versus the mean value of the absorbance of the standards on the y-axis.
- 4) Recommendation: Calculation of the standard curve should be done by using a computer program, because the curve is in general (without respective transformation) not ideally described by linear regression. **A higher-grade polynomial, or four parametric logistic (4-PL) curve fit or non-linear regression** are usually suitable for the evaluation (as might be spline or point-to-point alignment in individual cases).
- 5) The functional IGFBP-3 concentration in ng/ml of the samples can be calculated by multiplication with the respective dilution factor, Division by 1000 converts the values in µg/ml or, equal mg/Litre (Example: a measured value was 6 ng/ml, Sample was 1:505 diluted: $6 \times 505 = 3030$ ng/ml, or 3,03 µg/ml or 3,03 mg/L, according the requested unit).

EXPECTED VALUES TOTAL IGFBP-3

IGFBP-3-levels are strongly age-dependent in children, less so in adults. The normal ranges in various age-groups which were log-normally distributed are given in **table 5** by the percentiles. A graphic presentation is shown in **Fig. 6 and 7**. It is recommended for each laboratory to establish its own normal range.

LIMITATIONS

IGFBP-3 levels are strongly dependent on GH secretion. However, a number of factors influence its plasma concentration and should be taken into account for appropriate interpretation. Plasma levels decrease during fasting (more than 1 day), in malnutrition, malabsorption, cachexia, impaired hepatic function, hypothyroidism, and diabetes mellitus. They may also be decreased in chronic inflammatory disease and malignancy. Levels are increased in states of impaired renal function and precocious puberty. In clinical situations with hyperprolactinemia or in patients with craniopharyngeoma, normal levels may be observed despite GH deficiency. In certain physiological (e.g. pregnancy) and pathological states, IGFBP-3 may be degraded to smaller molecular size compounds (16, 17) by specific proteases which affect IGFBP patterns.

EXPECTED VALUES FUNCTIONAL IGFBP-3

It is recommended for each laboratory to establish its own normal range for functional IGFBP-3. The given total IGFBP-3 normal values (Tab.5) might be used for an estimation of the expected values as well as for quantifying the degree of **IGFBP-3 fragmentation** in samples. In case of comparative studies of the ratio total to functional IGFBP-3 concentrations they are the basis for the total immunoreactive part of IGFBP-3.

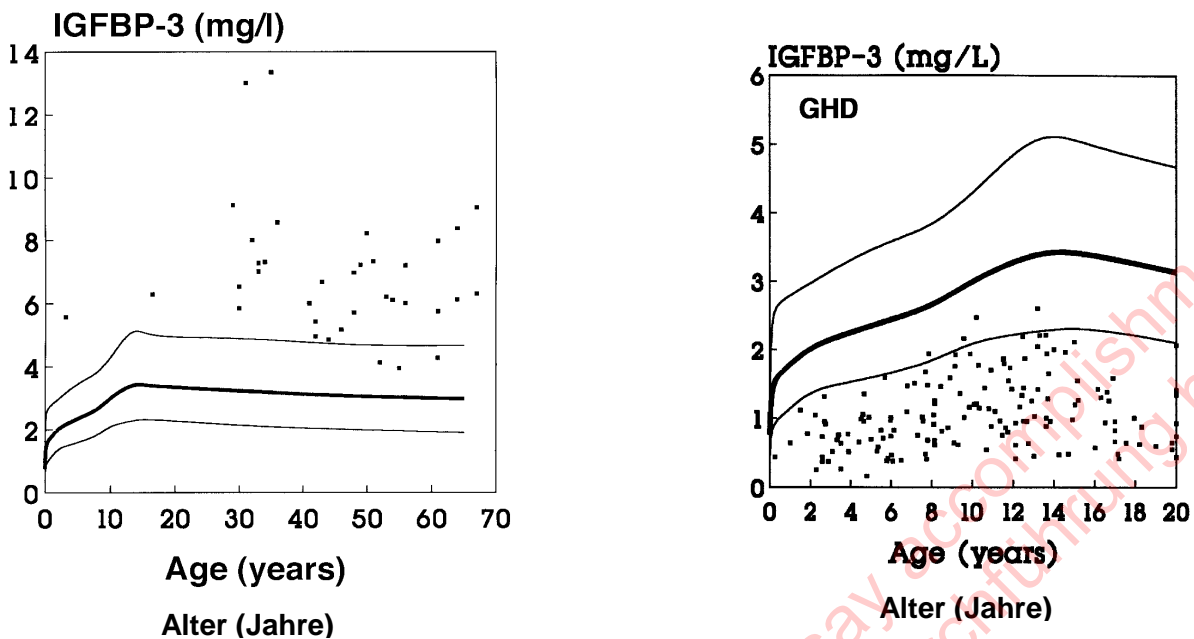


Figure 1: Total serum IGFBP-3 levels in patients with short stature without GH deficiency (SS: constitutional delay of growth and adolescence, familial short stature, intra-uterine growth retardation) and in idiopathic or organic GH deficiency (GHD). The normal range is given by the 5th, 50th and 95th percentile.

Abb. 1: Gesamt-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.

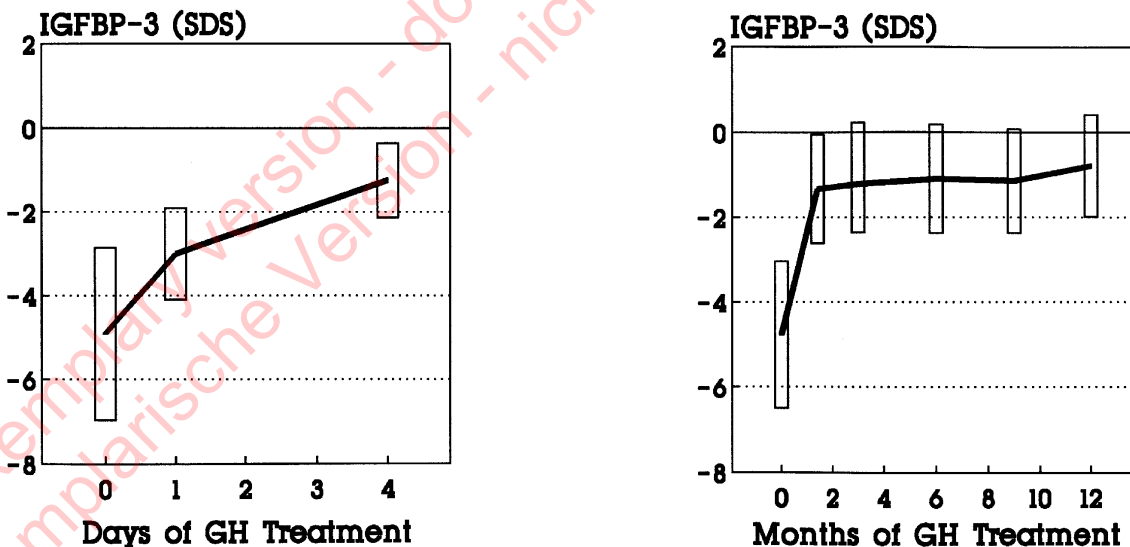


Figure 2: Total IGFBP-3 levels in GH deficient children before and during GH treatment. Because of the age-dependence, values are given as the mean of standard deviation scores (SDS).

Abb.2: Gesamt-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.

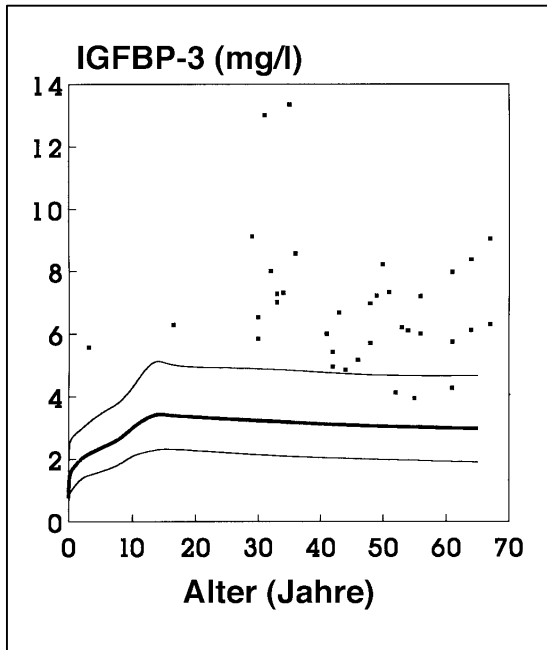


Figure 3: Total serum IGFBP-3 levels in acromegaly. The normal range is given by the 5th, 50th and 95th percentile.

Abb. 3: Gesamt-IGFBP-3 Serumwerte bei Akromegalie. Der Normalbereich ist durch die 5., 50. und 95.

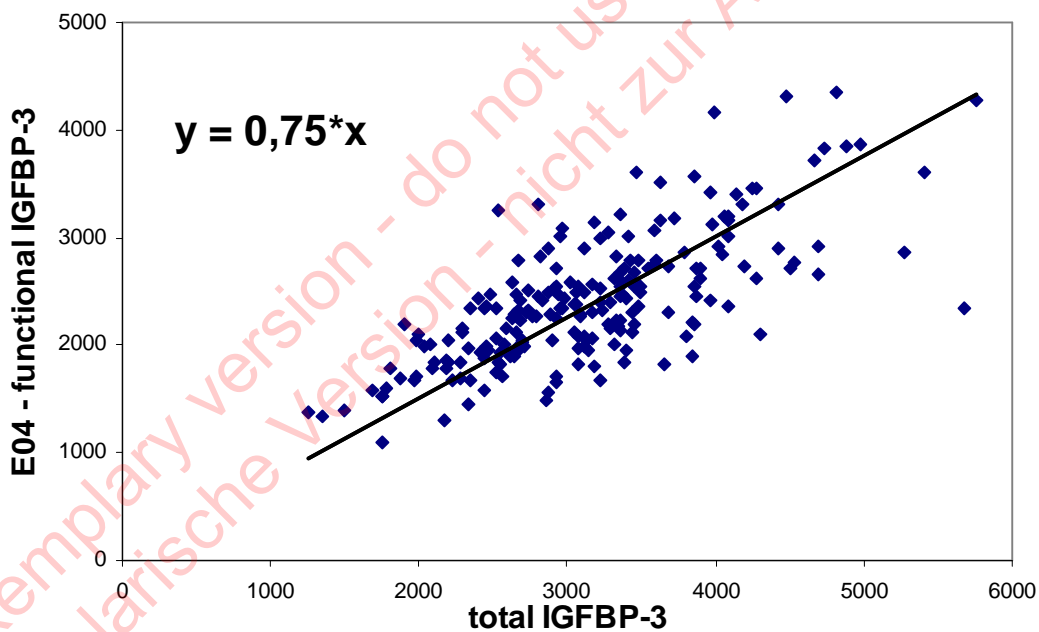


Figure 4: Plot of functional IGFBP-3 values against total IGFBP-3 values of sera from 212 healthy blood donors (IGFBP-3 concentrations in ng/ml).

Abb. 4: Plott von Funktionalen-IGFBP-3 Werten im Vergleich zu Gesamt-IGFBP-3 Werten von Seren von 212 gesunden Blutspendern (IGFBP-3 Konzentrationen in ng/ml).

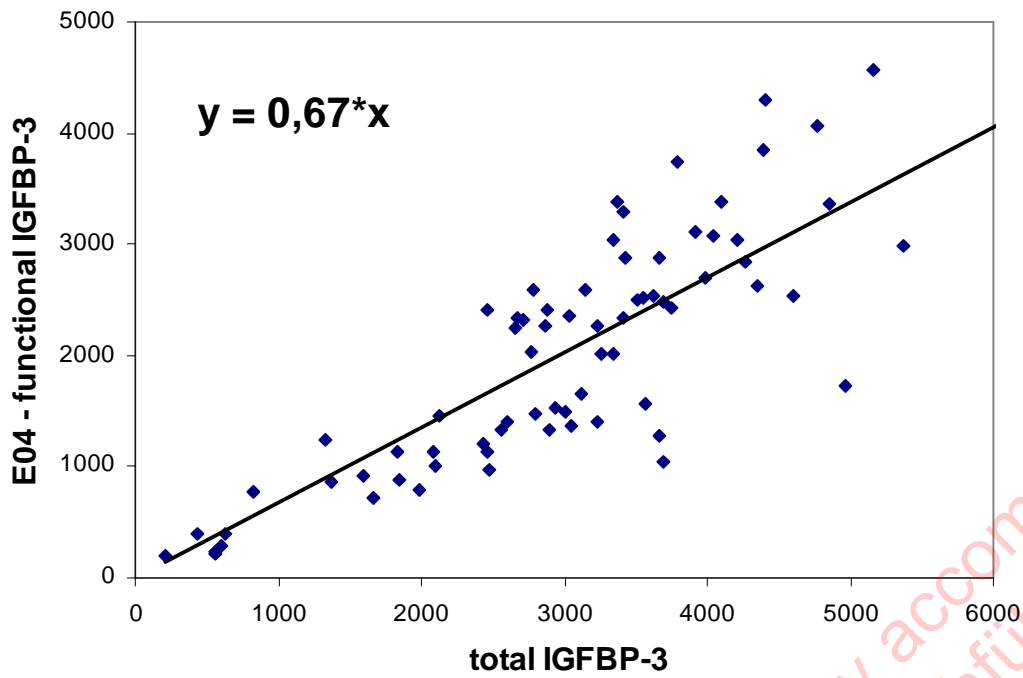


Fig. 5: Plot of functional IGFBP-3 values against total IGFBP-3 values of sera from 72 sickened donors (IGFBP-3 concentrations in ng/ml; sera of several growth disorders, cancers and liver diseases).

Abb. 5: Plot von Funktionalen-IGFBP-3 Werten gegen Gesamt-IGFBP-3 Werte von Seren von 72 erkrankten Spendern (IGFBP-3 Konzentrationen in ng/ml; Serum von Patienten mit verschiedenen Wachstumstörungen, Krebs und Leberkrankheiten).

Exemplary version - do not use for any accomplishment!
 Exemplarische Version - nicht zur Assay-Führung benutzen!

Tab. 5: Serum levels of total immunoreactive IGFBP-3 in healthy subjects at various ages. Individuals between 7 and 17 years of age were classified according to gender, as the pubertal peak occurs almost 2 years earlier in girls than in boys.

Tab. 5: 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		Percentiles / Perzentilen													
Age group		0.1	1	5	10	20	30	40	50	60	70	80	90	95	99
0-1 week		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 weeks		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 months		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 months		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 months		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 years		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 years		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 years		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 y.	boys	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
	girls	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 y.	boys	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
	girls	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 y.	boys	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
	girls	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 y.	boys	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
	girls	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 y.	boys	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
	girls	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 y.		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 y.		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 y.		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 y.		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 y.		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 y.		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 y		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 y		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

Serum levels are given as mg/L
 Die Serumkonzentrationen sind in mg/L angegeben
 week = Woche; months = Monate
 y. = years; =Jahre

Determined with IGFBP-3 RIA (Blum et al. 1990)
 Mit IGFBP-3-RIA gemessen (Blum et al. 1990)
 The values above 70 years are extrapolated.
 Die Werte für über 70-Jährige sind extrapoliert.

Serum conc. according to age
Serum Konz. nach Alter

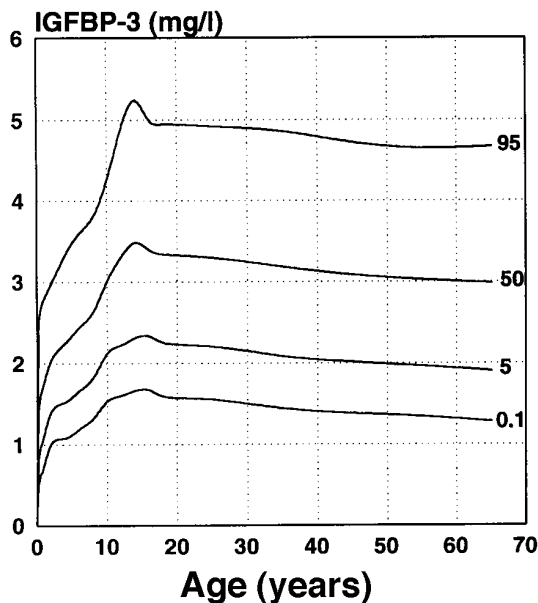


Fig. 6 : Age-dependant normal values of IGFBP-3 (presented as 0.1., 5., 50., and 95. percentile)

Children and adolescents
Kinder und Jugendliche

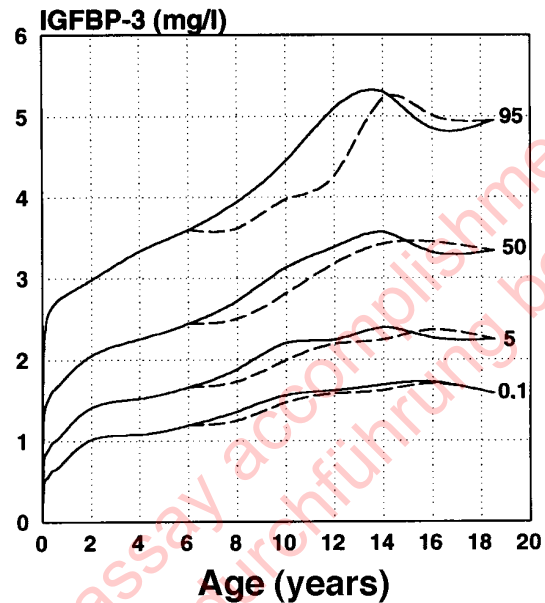


Fig. 7 : Normal values of children and adolescents (girls — boys - - -)

Abb. 6 : Altersabhängiger Normalbereich der IGFBP-3 Spiegel (dargestellt als 0,1., 5., 50 und 95. Perzentile)

Abb. 7 : Normalbereich bei Kindern und Jugendlichen (Mädchen — , Jungen - - -)

REFERENCES

- 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(Abtract)
- 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; 55:115-124
- 20) Binoux M, L.C., Mohseni-Zadeh S. Biological Actions of Proteolytic Fragments of the IGF Binding Proteins. in *The IGF System* (ed. Rosenfeld R, R.C.) (Humana Press Inc, Totowa NJ, 1999).
- 21) Maile LA, C.A., Holly JMP. IGF Binding Protein Prtealysis in Various Clinical States. in *The IGF System* (ed. Rosenfeld R, R.C.) 633-649 (Humana Press Inc, Totowa, NJ, 1999).
- 22) Fielder PJ, G.-A.J., Rosenbloom AL, Carlsson L, Hintz RL, Rosenfeld RG. Expression of serum insulin-like growth factors, insulin-like growth factor binding proteins, and the growth hormone binding protein in heterozygote relatives of Ecuadorian growth hormone receptor deficient patients. *J Clin Endocrinol Metab* 74, 743-750 (1992).
- 23) Cotterill AM, H.J., Taylor AM, Davies SC, Coulson VJ, Preece MA, Wass JAH, Savage MO. The insulin-like growth factor (IGF-)binding proteins and IGF bioactivity in Laron-type dwarfism. *J Clin Endocrinol Metab* 74, 56-63 (1992).
- 24) Davies DC, W.J., Ross RJM, Cotterill AM, Buchanan CR, Coulson VJ, Holl JMP. The induction of a specific protease for insulin-like growth facotr binding protein-3 in the circulation during severe illness. *J Endocrinol* 130, 469-473 (1991).
- 25) Cwyfan Hughes SC, C.A., Molloy AR, Cassel TMB, Braude N, Hinds CH, Wass JAH. The induction of specific proteases for insulin-like growth factor binding proteins following major heart surgery. *J Endocrinol* 135, 135-145 (1992).
- 26) Timmins AC, C.A., Hughes SCC, HOLly JMP, Ross RJM, Blum W, Hinds CJ. Critical illness is associated with low circulating concentrations of insulin-like growth factor I and growth factor II, alterations in insulin-like growth factor binding -proteins and induction of an insulin -like growth factor binding-protien-3 proatease-. *Crit Care Med* 24, 1460-1466 (1996).
- 27) Bang, P., Brismar K, Rosenfeld RG, Hall K. Fasting affects serum insulin-like growth factors (IGFs) and IGF binding proteins differently in patients with non-insulin dependent diabetes versus healthy non-obese and obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 78, 960-967 (1994).
- 28) Lang CH, F., Frost RA, Gelato MC, Sakurai Y, Herndon DN, Wolfe RR. Regulation of the insulin-like growth factor system by insulin burn patients. *J Clin Endocrinol Metab* 81, 2474-2480 (1996).
- 29) Frost VJ, H.S., Lonning PE, van der Stappen J, HOLly JMP. Effects of treatment with megestrol acetate, aminoglutethimide or formestane on insulin-like growth factor (IGF) I and II and IGF-binding proteins (IGFBPs) and IGFBP-3 protease status in patients with advanced breast cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 81, 2216-2221 (1996).
- 30) Renehan AG, K.K., Diamandi A, O'Dwyer ST, Shalet SM. Quantification of serum IGFBP-3 proteolysis in patients with colorectal cancer. *Growth Horm IGF Res* 13, 217 (2003).
- 31) Muller HL, O.Y., Gargosky SE, Lehrnbecker T, Hintz RL, Rosenfeld RG. Concentrations of insulin-like growth factor (IGF) binding protien- 3 (IGFBP-3), IGF and IGFBP-3 protease activity in cerebrospinal fluid of children with leukemia, central nervous system tumor or meningitis. *J Clin Endocrinol Metab* 77, 113-1119 (1993).
- 32) Fernihough JK, B.M., Cwyfan-Hughes S, Holly JMP. Local disruption of the insulin-like growth factor system in the arthritic joint. *Arthritis Rheum* 39, 1556-1565 (Local disruption of the insulin-like growth factor system in the arthitic joint.).
- 33) Lassarre C, M. Binoux. Measurement of intact Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein-3 in human plasma using a ligand immunofunctional assay. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 1260-1266 (2001)
- 34) Lassarre C, F. Duron, M. Binoux. Use of the Ligand Immunofunctional Assay for human Insulin-like growth factor (IGF) binding protein-3 (IGFBP-3) to analyze IGFBP-3 proteolysis and IGF-I bioavailability in Healthy adults, GH-deficient and acromegalic patients, and diabetics. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 1942-1952 (2001)
- 35) Langkamp M. Weber K., Kirschner M., Pridzun L., Ranke M.B. Validation of Fuctional insulin-Like Growth Factor Binding Protein-3 measurement by a Ligand Immunoassay. *Clin Lab.* 11+12/2010, 56; 535-542

KURZANLEITUNG – Funktionaler-IGFBP-3 LIA E04A

Rekonstitution/ Verdünnung von Reagenzien		
Standards A-E	Rekonstitution in Probenpuffer PP (grün)	Je 1 ml
Kontrollseren KS1&KS2	Rekonstitution in Probenpuffer PP (grün)	250 µl
Liganden Konjugat LK	Verdünne LK und EK 1:101 jeweils in Verdünnungsbuffer VP (z.B. 60 µl LK plus 6 ml VP)	1:101
Enzyme Konjugat EK	(z.B. 120 µl EK plus 12 ml VP)	
Waschpuffer WP	Verdünne in A. dest. (z.B. die gesamte Menge von 50 ml im Standzylinder auf 1000 ml auffüllen)	1:20
Probenverdünnung + Kontrollseren KS1 und KS2 : 1:505 in Probenpuffer PP (grün gefärbt; z.B. 10 µl in 1 ml PP), sofort mischen und in max 60 min. verwenden		
Davon 50 µl per Bestimmung einsetzen (Pipettierkontrolle =Blaufärbung)		
Vor der Testdurchführung alle Reagenzien auf Raumtemperatur bringen.		

Testdurchführung Doppelbestimmung (Vorschlag)

Pipettieren	Reagenzien	Position
50 µl	verdünnte Liganden Konjugate LK	in alle benötigten Vertiefungen pipettieren
50 µl	Probenpuffer PP als Leerwert	A1 und A2
50 µl	Standard A (0,4 ng/ml)	B1 und B2
50 µl	Standard B (2 ng/ml)	C1 und C2
50 µl	Standard C (6 ng/ml)	D1 und D2
50 µl	Standard D (15 ng/ml)	E1 und E2
50 µl	Standard E (30 ng/ml)	F1 und F2
50 µl	verdünntes Kontrollserum KS1	G1 und G2
50 µl	verdünntes Kontrollserum KS2	H1 und H2
50 µl	Verdünnte Proben	In die Vertiefungen nach Bedarf
Mit Klebefolie die Vertiefungen dicht abdecken.		

Inkubation: 2 h bei RT, 350 rpm

5x 300 µl	Absaugen und die Platte 5x mit je 300 µl Waschpuffer WP/ Vertiefung waschen	In jede Vertiefung
100 µl	Verdünnte Enzymkonjugat EK	In jede Vertiefung

Inkubation: 1 h bei RT, 350 rpm

5x 300 µl	Absaugen und die Platte 5x mit je 300 µl Waschpuffer WP /Vertiefung waschen	In jede Vertiefung
100 µl	Substratlösung S	In jede Vertiefung

Inkubation: 30 min im Dunklen bei RT

100 µl	Stopplösung SL	In jede Vertiefung
Ausmessung innerhalb von 30 min bei 450 nm (≥590 nm Referenz)		

SUMMARY – Functional IGFBP-3 LIA E04A

Reconstitution/ Dilution of Reagents:		
Standards A-E	Reconstitution in Sample Buffer PP (green)	1 ml each
Control Seren KS1 & KS2	Reconstitution in Sample Buffer PP (green)	250 µl
Ligand Conjugate LK	Dilute LK and EK 1:101 each in Dilution Buffer VP (e.g. 60 µl LK plus 6 ml VP each)	1:101 each
Enzyme Conjugate EK	(e.g. 120 µl EK plus 12 ml VP each)	
Washing Buffer WP	dilute in A. dest. (e.g. add the complete contents of the flask 50 ml into a graduated flask and fill with A.dest. to 1000 ml)	1:20
Sample Dilution + Control Sera KS1 & KS2: 1:505 in Sample Buffer PP (green colored), mix directly and use within max. 60 min.		
Use 50 µl per determination (pipetting control= blue coloration)		
Before assay procedure bring all reagents to room temperature		

Proposal of Assay Procedure for Double Determination:

Pipette	Reagents	Well Positions
50 µl	diluted Ligand Conjugate LK	Pipette in <u>all</u> required number of wells
50 µl	Sample Buffer PP as Blank	A1 and A2
50 µl	Standard A (0.4 ng/ml)	B1 and B2
50 µl	Standard B (2 ng/ml)	C1 and C2
50 µl	Standard C (6 ng/ml)	D1 and D2
50 µl	Standard D (15 ng/ml)	E1 and E2
50 µl	Standard E (30 ng/ml)	F1 and F2
50 µl	diluted Control Serum KS1	G1 and G2
50 µl	diluted Control Serum KS2	H1 and H2
50 µl	diluted Samples	Pipette samples in the rest of the wells according to requirements
Cover the wells with the sealing tape		

Incubation: 2 h at RT, 350 rpm

5x 300 µl	Aspirate the contents of the wells and wash 5x with 300 µl each WP/ well	each well
100 µl	diluted Enzyme Conjugate EK	each well

Incubation: 1 h at RT, 350 rpm

5x 300 µl	Aspirate the contents of the wells and wash 5x with 300 µl each WP/ well	each well
100 µl	Substrate Solution S	each well

Incubation: 30 min in the dark at RT

100 µl	Stop Solution SL	each well
Measure the absorbance within 30 min at 450 nm (≥590 nm Reference)		

REF E04A



International Test description

CAL A-E	STD A -E	Rec in 1ml PP	
Control	KS1 & KS2	Rec in 250 µl PP	1:505 DILU PP
LIGAND	LK		1:101 DILU VP
CONJ	EK		1:101 DILU VP
WASHBUF 20x	WP		1:20 DILU A. dest.

SPE	1:505 DILU PP
°C 20-25 °C	

50 µl	LK (1:101 DILU VP)	A1 - End
50 µl	PP	A1/2
50 µl	CAL A (0.4 ng/ml)	B1/2
50 µl	CAL B (2 ng/ml)	C1/2
50 µl	CAL C (6 ng/ml)	D1/2
50 µl	CAL D (15 ng/ml)	E1/2
50 µl	CAL E (30 ng/ml)	F1/2
50 µl	CONTROL KS1 1:505 DILU PP	G1/2
50 µl	CONTROL KS2 1:505 DILU PP	H1/2
50 µl	SPE 1:505 DILU PP	
TAPE		

2 h °C 20-25 350 rpm

5x300 µl	5x WASHBUF WP
100 µl	EK (1:101 DILU VP)
TAPE	

1 h °C 20-25 350 rpm

5x300 µl	5x WASHBUF WP
100 µl	SUBST TMB S

0.5 h °C 20-25

100 µl	H₂SO₄ SL
MEASURE	